

1

¿ PUEDE LA DIETA RICA EN ACEITE DE OLIVA MEJORAR LA RESPUESTA VASODILATADORA ENDOTELIO-DEPENDIENTE ?

E. González-Fernández, I. Millás, L. Sánchez de Miguel, T. De Frutos, J.A. Rodríguez-Feo, M. García-Durán, M. Arriero, S. Casado, A. López-Farré. Laboratorio de Nefrología, Hipertensión e Investigación Cardiovascular. Fundación Jiménez Díaz. Madrid, España.

La grasa de la dieta desempeña un papel importante en la génesis de la arterosclerosis. Los cambios en la composición en ácidos grasos de la dieta pueden influir en las propiedades de las membranas de las células que forman la pared vascular y, por tanto, podrían afectar la funcionalidad de estas células.

Se estudiaron 50 conejos New Zealand White machos (2,5-3 kg de peso). Se establecieron dos grupos: a) conejos alimentados con dieta estándar, y b) conejos alimentados con dieta estándar enriquecida en un 10 % en peso de aceite de oliva. Los conejos fueron sacrificados después de cuatro semanas de dieta. Se analizó el perfil lipídico y la composición en ácidos grasos de la pared vascular y del suero de los conejos. La expresión de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (NOSe) se midió en la pared mediante Western blot.

Objetivo.- Analizar si las dietas con distinta composición en ácidos grasos pueden modificar la capacidad de las células de la pared vascular de generar óxido nítrico (NO). Resultados.- Se observaron cambios correlativos en la composición de los ácidos grasos tanto de la pared como del plasma. Este efecto se acompañó de una mayor respuesta vasodilatadora a la acetilcolina (tabla). El nivel de colesterol total en los animales tratados con la dieta rica en aceite aumentó significativamente (72 ± 18 a 103 ± 34 , $p < 0,05$), pero a costa del colesterol HDL (37 ± 10 y 62 ± 25 , $p < 0,05$). La dieta enriquecida en aceite de oliva aumentó la expresión de la NOSe en la pared vascular.

DOSIS	CONTROL	OLIVA
0.0005	0	0
0.002	26.9	38.5
0.008	41.7	46.2
0.032	48.2	51.7
0.064	53.3	56.6

Las dosis se calcularon como μg de acetilcolina por kilo de peso. Unidades: porcentaje de disminución de la presión arterial media.

En conclusión, estos resultados sugirieron que la dieta enriquecida en ácidos grasos monoinsaturados (aceite de oliva) cambia la composición en ácidos grasos de la pared y podría afectar a la expresión de la NOSe y a la función vasodilatadora endotelio dependiente.

3

CISTATINA C COMO NUEVO MARCADOR DEL FILTRADO GLOMERULAR

E. Coll, A. Botey, L. Alvarez*, C. Piera, E. Poch, A. Saurina, A. Darnell** Servicios de Nefrología, Bioquímica* y Medicina nuclear** del Hospital Clínic i Provincial. Barcelona.

La cistatina C es una proteína plasmática básica no glicada de 13 KD, inhibidor de proteasa, que está producida de forma constante por todas las células nucleadas investigadas y se elimina casi exclusivamente por filtrado glomerular. Debido a que sus niveles séricos no dependen de edad, sexo, ni masa muscular, se ha propuesto como marcador más exacto que la medida de la creatinina plasmática.

Se determinaron los valores de normalidad en 15 voluntarios sanos (6 hombres y 9 mujeres, de edades comprendidas entre 22 y 66 años) con filtrados glomerulares superiores a $80 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ medidos por iodoalamato. Posteriormente se determinó la cistatina C en 13 pacientes con diferentes grados de insuficiencia renal: 11 hombres y 2 mujeres de edades comprendidas entre 35 y 81 años, con filtrados glomerulares inferiores a $80 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ por iodoalamato y se comparó con marcadores habituales del filtrado glomerular (creatinina, aclaramiento de creatinina) y se usó el iodoalamato como patrón de referencia. La cistatina C sérica se midió mediante inmunofluorimetría (reactivo N-Latex cystatin C de Behring), la creatinina sérica y urinaria mediante el método de Jaffe, y el filtrado glomerular mediante el aclaramiento plasmático de iodoalamato corregido por la superficie corporal (extracción de 10 muestras a lo largo de 4 horas, a los 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 y 240 minutos de la inyección del radiofármaco).

Los valores de normalidad para la cistatina C sérica van de $0,56$ a $0,88 \text{ mg/l}$, con una media de $0,70 \pm 0,10 \text{ (DS)}$ $n = 15$. Los pacientes con distintos grados de insuficiencia renal, con una creatinina sérica con una media de $3,78 \pm 2,77 \text{ (DS)}$ (rango de $1,2$ a $8,7 \text{ mg/dl}$) y un aclaramiento de creatinina con una media de $40 \pm 29,90 \text{ (DS)}$ (rango de 5 a 96 ml/min) $n = 13$, la correlación entre el aclaramiento de iodoalamato y la cistatina C sérica ($r = 0,8262$; $p < 0,0001$) fue significativamente superior a la correlación con la creatinina plasmática ($r = 0,6294$; $p < 0,0012$) y a la correlación con el aclaramiento de creatinina ($r = 0,7841$; $p < 0,0001$).

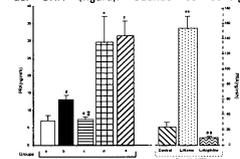
Los resultados de dicho estudio sugieren que la cistatina C sérica puede ser un marcador del filtrado glomerular más exacto que la creatinina plasmática o incluso que el aclaramiento de creatinina en pacientes con distintos grados de insuficiencia renal, obviando además los errores de recogida de orina, estado nutricional, e interferencias analíticas.

2

EFFECTOS SISTEMICOS Y RENALES DE LA INHIBICION AGUDA Y PROLONGADA DE LA SINTESIS DE OXIDO NITRICO (NO). INTERACCION SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA (SRA)-SISTEMA NO

J.C. Rodríguez Pérez, A. Losada, A. Anabitarte, Z. Sanchez, F. Rodríguez Esparragón, L. Palop y C. Plaza. Unidad de Investigación-Servicio de Nefrología, Hospital Universitario Ntra. Sra. del Pino, Las Palmas de Gran Canaria.

La síntesis de óxido nítrico (NO) desde la L-arginina es un amplio proceso llevado a cabo por una familia de NO-sintasas (NOS). El propósito del estudio es analizar el papel del NO en el mantenimiento de la hemodinámica sistémica y renal a través de la administración aguda y prolongada del inhibidor de la síntesis del NO, L-NAME y su relación con el eje renina-angiotensina. Se utilizaron 61 ratas Sprague-Dawley ($293 \pm 6 \text{ gr}$). Estas fueron distribuidas de la siguiente manera: Experimento agudo: a: $50 \mu\text{g/kg/min}$ de L-NAME ($n=9$); b: $10 \mu\text{g/kg/min}$ ($n=9$); c: $1 \mu\text{g/kg/min}$ ($n=5$); d: $0,1 \mu\text{g/kg/min}$ ($n=5$); e: control ($n=5$). Experimento crónico: control: ($n=8$); L-NAME 100 mg/L oral/3 semanas ($n=13$) y L-NAME (100 mg/L oral) + L-arginina (2 gr/L): ($n=7$). Determinación de gasto cardíaco (CO), resistencias vasculares sistémicas (TPR), presión arterial (MAP) y volumen sistólico (SV), GFR (inulina 10%), RPF (paraaminohipurato sódico 20%), UNa.V, UK.V, volumen de diuresis, HTO, PNa, PK y PRA. Anestesia con thiopental sódico 60 mg/kg i.p. Cateter de CO (PTH-01-Cardiostar) en art. carót. izda, PE-50 en ambas yugulares y en art. femoral izda. para MAP. En el experimento agudo se encontraron incrementos de las resistencias vasculares renales (RVR) antes de presentar efectos presores a nivel sistémico, detectándose mas sensibilidad del lecho renal a los efectos de L-NAME. Con las dosis mas bajas, se obtuvo aumento del GFR, UNa.V y UV. Con dosis de $1 \mu\text{g/kg/min}$ ya el RPF comenzó a mostrar disminuciones significativas sin cambios en la MAP y en el GFR. El GC y las TPR no se modificaron con dosis subpresoras de L-NAME. El efecto en el UV y UNa.V puede estar relacionado con la discreta expansión de volumen, efecto tubular directo o estímulo de otros factores como el natriurético auricular etc. La administración aguda de dosis elevadas de L-NAME provoca modificaciones hemodinámicas sistémicas y renales, disminución del CO, y del SV con aumento de la MAP y TPR como resultado de un incremento de la postcarga cardíaca. Se acompañó de disminución del RPF, GFR y aumento de las RVR (aumento de resistencias vasculares preglomerulares) y UNa.V (presión-natriuresis). Cambios todos ellos reflejo de las modificaciones producidas en la hemodinámica sistémica. Los niveles de PRA se relacionaron inversamente con las dosis de L-NAME utilizadas, lo que no descarta una hiperactivación inicial del SRA (figura). Cuando se consiguió una inhibición prolongada de la síntesis de NO,



los parámetros hemodinámicos sistémicos y renales se asemejaron a los obtenidos en el experimento agudo. Los niveles de PRA en el grupo de animales tratados con L-NAME fué seis veces el de los controles lo que explicaría una participación mas activa del SRA y una mayor interacción con la actividad del NO. Esto induciría a pensar que pudiera ser este el mecanismo (aumento de la ANG II), responsable de la nefroangiosclerosis y de la HVI encontrada en un grupo elevado de ratas a las que se les ha inhibido crónicamente el sistema L-arginina-NO. En resumen, el perfil hemodinámico y renal es diferente según el grado de participación del sistema NO. El lecho vascular renal es mas sensible a la inhibición de la síntesis de NO que otros lechos vasculares. En el modelo experimental utilizado, se sugiere que el mecanismo patogénico de la inhibición aguda y prolongada de la síntesis de NO es diferente como puede derivarse de la activación-participación del SRA.

- Aceptado Póster
- Aceptado Presentación Oral

4

POSIBLE PAPEL DE LA SOMATOSTATINA (ST) EN LA REGULACION FISIOLOGICA DE LA FUNCION RENAL.

G. Torrecillas, R.J. Bosch, M.L. Díez-Marqués, S. López-Ongil, M. Rodríguez-Puyol.

Dpto. Fisiología. Universidad de Alcalá de Henares. Madrid.

En el riñón la somatostatina modula funciones fisiológicas importantes, incluyendo contracción de las células mesangiales, síntesis glomerular de prostaglandinas, y excreción de sodio, agua y fosfatos. Sin embargo, no está claro si estas acciones, efectos farmacológicos o el peptido pueden tener un papel como un mediador local. Aunque, estudios previos han señalado la posibilidad de que la ST pueda ser sintetizada en el riñón y la presencia de receptores de ST (RST) en las estructuras renales ha sido propuesta, un cuidadoso analisis de estos aspectos no ha sido realizado. Así, los presentes experimentos han sido diseñados para analizar el sistema de la ST en el riñón humano. Corteza renal humana (CR) y células mesangiales humanas en cultivo (CMH) expresan el ARNm de pre-pro-somatostatina (analisis por RT-PCR, confirmado por Southern-blot), y fue posible demostrar la presencia de el peptido en las mismas estructuras por western-blot. En CMH, la síntesis del peptido ensayada por RIA fue de $427 \pm 8 \text{ pg/mg}$ proteina. Con respecto a los RST, el subtipo 1 y 2 fueron demostrados por RT-PCR en CR, además solamente el subtipo 1 estaba presente en CMH (en cada caso, la especificidad de la amplificación por RT-PCR fue confirmada por Southern-blot). También otro efecto previamente demostrado para ST en riñón humano fue analizado y se observó un efecto proliferativo dosis dependiente, en células tratadas con ST-14 en un medio sin suero. En conclusión, nuestros resultados demuestran que las células renales producen somatostatina y sugieren que la somatostatina derivada del riñón puede regular la función renal de una forma autocrina/paracrina.

5

EFEECTO DE LA INFUSION DE L-ARGININA EN LA INDUCCION DE MICROALBUMINURIA EN INDIVIDUOS NORMALES

E. Bello*, C Caramelo*, MD López*, E Ruiz*, MJ Soldevilla*, FR Gonzalez-Pacheco*, JM Alcazar**, N Martell[†], LM Ruilope**, RM Gazapo*, A Rovira*, S Casado*. Servicios de Nefrología Fundación Jiménez Díaz*, Hospital Doce de Octubre** y Hospital Clínico de San Carlos[†]. Madrid. España.

La microalbuminuria (EAU) es en muchos casos el único marcador de daño en la fase precoz de enfermedades con afectación glomerular. En pacientes con masa renal reducida se puede provocar un aumento de la EAU con una sobrecarga de aminoácidos que se ha atribuido al mecanismo de hiperfiltración/hipertensión intraglomerular. Sin embargo, no se conoce la relación entre los cambios en la hemodinámica renal producidos por una infusión de aminoácidos y EAU en individuos sin enfermedad renal. Con el objetivo de estudiar esta relación realizamos una infusión i.v. de L-arginina a diez adultos sanos (41,0±4,2 años), a una dosis media de 0,28±0,019 g/Kg de peso. Los resultados mostraron que esta infusión indujo un incremento en el filtrado glomerular (FG, C_{IN}) y en el flujo plasmático renal (FPR, C_{PAH}), que fueron paralelos a un aumento significativo de la EAU. La media±EEM para la EAU fue de 13,1±3,8 (rango 4,1- 21 µg/min) antes de la infusión y de 53,3±11,1 (rango 14,5-133 µg/min) después de la infusión (p<0.005). La EAU tuvo una correlación significativa con el FG (r=0,738, p=0,014) y con el FPR (r=0,931, p<0,0001). Encontramos diferencias significativas (p<0.01) entre la pendiente de regresión lineal para ΔEAU vs ΔC_{PAH} [Y=-16.2+(6,83x)] y ΔEAU vs ΔC_{IN} [Y=36,1+ (0,921x)]. En conclusión, nuestro estudio señala que los cambios en la hemodinámica renal producidos por una infusión de L-arginina inducen un aumento significativo de la EAU en individuos normales. Estos hallazgos son potencialmente útiles para el conocimiento de la respuesta renal a aminoácidos y proteínas y demuestran que la aparición de microalbuminuria secundaria a cambios hemodinámicos ocurre en condiciones no patológicas.

7

ALTERACIONES DEL TRANSPORTE DE OXIGENO (O₂) EN LA INSUFICIENCIA RENAL CRONICA TERMINAL.

JM.Campistol, E.Sala, R.Marrades, EA.Noyszewski, S.Dreha, J.Beers, JV.Torregrosa, PD.Wagner, JA.Barbera, R.Rodríguez-Roisin, J.Roca. Unidad de Trasplante Renal y Servicio de Pneumología, Hospital Clinic, Barcelona; Dept. de Radiología, U. de Pensilvania, Philadelphia, USA; y Dept. de Fisiología, U. de California, USA.

La alteración del transporte de O₂ en la microcirculación del músculo esquelético de los pacientes con insuficiencia renal crónica terminal (IRCT) parece constituir un factor importante para explicar la limitación de su tolerancia al ejercicio físico. Para examinar dicha hipótesis se estudiaron 6 pacientes (25,3 ± 6 (SD) años) con IRCT en tratamiento con eritropoyetina y 6 controles sedentarios (C) (24,2 ± 6 años). Se determinó la PO₂ arterial, la PO₂ de la vena femoral (P_{IV}O₂) y el flujo sanguíneo femoral para calcular el transporte (QO₂) y el consumo de O₂ (VO₂ pico) durante un ejercicio incremental limitado al músculo cuádriceps. Mediante la técnica de espectroscopia de H⁺ con Resonancia Nuclear Magnética se determinó la saturación de mioglobina para calcular la PO₂ intracelular. Los ejercicios se realizaron durante un mismo día con diferentes F_IO₂ (0,13, 0,21, y 1,0).

En los pacientes con IRCT, el VO₂ pico fue proporcional al QO₂, a la P_{IV}O₂ y a la presión capilar media de O₂ (PCO₂) para cada F_IO₂, indicando una dependencia del consumo respecto al aporte de O₂ que no se objetivó en los C. Durante el ejercicio con una F_IO₂ del 0,21, el grupo IRCT presentó valores significativamente menores de QO₂ (643 vs 787 mL.min⁻¹), de VO₂ pico (467 vs 570 mL.min⁻¹) y de PO₂ intracelular (1,7 vs 3,5 mmHg) (p< 0,05, cada uno) respecto a los C. Cuando el grupo IRCT respiró una F_IO₂ de 1,0 alcanzó el mismo QO₂ y VO₂ pico que C respirando una F_IO₂ de 0,21. Sin embargo, en esta situación, la presión capilar media (47,9 vs 38,2 mmHg, p<0,01) y el gradiente de presión de O₂ entre capilar y mitocondria (40,7 vs 34,4 mmHg, p<0,03), fueron significativamente mayores en IRCT respecto al C indicando una mayor dificultad para la transferencia de O₂ desde el capilar a la célula.

Concluimos que la menor capacidad de transferencia muscular de O₂ limita el consumo de O₂ en la IRCT mientras que en el grupo C, el factor limitante del VO₂ pico es la capacidad oxidativa mitocondrial. (FIS 97-2102, SGR 1995-0446, NIH RR 02305)

6

EXISTENCIA DE UNA PROTEÍNA CITOSÓLICA DE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES QUE DEGRADA EL RNA MENSAJERO (RNAm) DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA ENDOTELIAL (NOS_e) DISMINUYENDO LA CAPACIDAD DEL ENDOTELIO DE EXPRESAR LA ENZIMA NOS_e

L. Sánchez de Miguel, J. Alonso, M. Montón, T. de Frutos, J.I. Guerra, L. Rico, A. Celdrán, O. Frierio, S. Casado, A. López Farré. Laboratorio de Nefrología, Hipertensión e Investigación Cardiovascular. Fundación Jiménez Díaz. Madrid.

En estos últimos años se viene demostrando que en los procesos patológicos de isquemia-reperusión así como en la hipertensión existe un importante componente inflamatorio donde participan distintas citoquinas liberadas por la pared vascular además de observarse una disminución en la respuesta vasodilatadora óxido nítrico dependiente. La vida media del RNAm de la NOS_e es elevada pero disminuye en presencia de citoquinas como el factor de necrosis tumoral (TNF-α). El RNAm de la NOS_e tiene una región 3' que no se traduce a proteína (UTR-3'). El objetivo de este trabajo fue analizar el papel de la UTR-3' en la regulación del RNAm de la NOS_e. Se expresaron in vitro distintas regiones comprendidas dentro de la UTR-3' y se las hizo interactuar con extractos celulares obtenidos a partir de células endoteliales bovinas (CE) mediante ensayos de cambio en la movilidad electroforética del complejo RNAm-proteína. Utilizando toda la región UTR-3' (UTR-L, 393 bases) se observó la formación de un complejo RNAm-proteína que se inhibía con un competidor específico UTR-L y que no se formaba utilizando un RNAm no relacionado. Este complejo también se formó utilizando un fragmento más pequeño de 261 bases de la UTR-3' (UTR-S). Analizando esta región, se observó que estaba formada por una región rica en Cs en el extremo 5' y una región rica en AUUUU en el extremo 3'. El complejo proteína-RNAm se observó con región rica en Cs, (UTR-C, 126 bases), pero no con la región rica en AU, (UTR-AU, 132 bases). Mediante cross-linking y SDS-PAGE, se observó que existía una proteína de 60 Kda que participaba en la formación del complejo. También se observó que cuando se incubaban las CE con TNF-α, se aumentaba la formación del complejo de la proteína con la región UTR-3' y UTR-C-3'. Esto coincidió con un descenso en la vida media del RNAm de la NOS_e. En conclusión, una región rica en Cs de la UTR-3' del RNAm de la NOS_e interacciona con una proteína de 60 Kda que podría desempeñar un importante papel en la regulación de este mensajero y como consecuencia en la expresión de la NOS_e en la pared vascular. Este mecanismo podría explicar la falta de respuesta endotelio dependiente observada en patologías como la hipertensión o en los procesos de isquemia-reperusión.

8

ALTERACIONES DE LA HEMOSTASIA Y DEL SISTEMA OXIDO NITRICO EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA RENAL CRONICA

X. Borrellas, *J. Monasterio, **Ll. Armadans, ***M. Mourelle, J. Bartolomé, J. Fort, J. Camps, J.A. Rodríguez, A. Olmos, Ll. Piera. Servei de Nefrologia. *Unitat de Recerca d' Hemostàsia. **Servei de Medicina Preventiva i Epidemiologia. ***Servei de Digestiu. Hospital Vall d'Hebron. Barcelona.

La diátesis hemorrágica de los pacientes con insuficiencia renal crónica frecuentemente coexiste con un estado trombofílico. El óxido nítrico (ON) juega un papel en la hemostasia y la alteración de la vía del ON puede estar implicada en el síndrome urémico. Nosotros hemos estudiado *in vivo* si en los pacientes con IRC el sistema L-arginina:óxido nítrico está relacionado con las alteraciones de la hemostasia. Se extrajeron muestras para la determinación de las concentraciones plasmáticas de: fibrinógeno, FVII, complejos trombina-antitrombina (TAT), D-dímero, α₂ antiplasmina (α₂AP), albúmina, activador tisular del plasminógeno (tPA) y del inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1) en 16 pacientes urémicos no dializados y 33 pacientes en hemodiálisis crónica. Simultáneamente se evaluó la agregación en plaquetas lavadas en respuesta a colágeno y ADP, la actividad enzimática plaquetar óxido nítrico sintetasa, isoformas constitutiva (NOS_c) e inducible (NOS_i) valoradas como la producción de ³H-citrulina desde ³H-arginina en tampón y sin calcio respectivamente, y las concentraciones plasmáticas de L-arginina y de nitritos y nitratos (NOx). También se recogieron muestras de 15 sujetos sanos que sirvieron como controles. Después del análisis de componentes principales se obtuvieron tres componentes: función plaquetar, riesgo vascular relacionado con la hemostasia (correlacionado principalmente con fibrinógeno, FVII, PAI-1 y TAT) y actividad fibrinolítica (tPA y α₂AP). En el análisis de la varianza se observó que los pacientes urémicos tenían función plaquetar disminuida (p< 0,001) y el riesgo vascular relacionado con la hemostasia aumentado (p<0,001) comparados con los controles. En el análisis de la regresión lineal múltiple la actividad NOS_i se asoció con la disfunción plaquetar y los NOx con el riesgo vascular relacionado con la hemostasia. Estos datos indican que las alteraciones en el metabolismo del óxido nítrico pueden, por lo tanto, intervenir en el estado inflamatorio crónico asociado a la uremia influyendo en el funcionalismo plaquetar y, quizás, soportando alteraciones fisiopatológicas asociadas a daño vascular.

9

EFFECTO PROTECTOR DE UN ANTAGONISTA DEL PAF SOBRE LA NEFROPATIA CRÓNICA INDUCIDA POR LA COMBINACION DE ISQUEMIA RENAL CALIENTE Y REDUCCION DE MASA NEFRÓNICA.
M Riera, JM Cruzado, J Torras, E Condom, M Merlos, I Herrero, N Lloberas, J Alsina, JM Grinyó. Servicios de Nefrología y Patología, Hospital de Bellvitge, Universidad de Barcelona y Uriach SA, Barcelona, España.

Introducción. El objetivo del estudio fue investigar en un modelo de nefropatía crónica inducida por isquemia y reducción del 50% de masa renal, por tanto, en ausencia de alorespuesta, los efectos funcionales y patológicos a largo plazo del antagonista del PAF, UR-12670, administrado siguiendo diferentes esquemas terapéuticos.

Material y métodos Ratas macho Sprague-Dawley fueron sometidas a 60 min de isquemia renal caliente y nefrectomía contralateral. El periodo de seguimiento fue de 52 semanas. Los animales se dividieron en 4 grupos: IK: riñón isquémico (n=11); IK 0-7: riñón isquémico, UR a partir del día 0 al día 7 (n=8); IK 0-E: riñón isquémico, UR a partir del día 0 a la semana 52 (n=9); IK 8-E: riñón isquémico, UR a partir del día 8 a la semana 52 (n=9). El UR 12670 fue administrado diariamente, mediante cánula esofágica, a dosis de 20 mg/Kg. Como controles se utilizaron ratas monorrenas, cuyos riñones no habían sufrido isquemia (NIK, n=7). Los valores de proteinuria (mg/24h) y de creatinina sérica (mg/dl) se determinaron cada 4 semanas. Al final del estudio se obtuvieron los valores de GFR y RPF (aclaramientos de inulina y PAH, ml/min) para cada uno de los animales. El porcentaje de glomerulosclerosis (focal y global) se estimó contando 100 glomerulos como mínimo. Además, se estimó mediante escala semicuantitativa, el infiltrado y fibrosis intersticial, así como la esclerosis vascular.

Resultados Respecto a los grupos IK y UR 8-E, los grupos UR 0-7 y UR 0-E mostraron una reducción de la mortalidad durante la 1ª semana después del insulto isquémico. A partir de la semana 12 el grupo IK presentó proteinuria progresiva que llegó a rango nefrótico. La aparición de proteinuria en los grupos tratados con UR se retardó hasta la semana 20 y fue siempre significativamente inferior respecto al grupo IK. Los resultados a 52 semanas fueron los siguientes (*p < 0.05 vs IK, S-p ns vs IK):

	IK	UR 0-7	UR 0-E	UR 8-E	NIK
Creatinina	2.2±0.7	1.5±0.55	1.0±0.06*	0.9±0.02*	0.8±0.02*
GFR	0.99±0.1	1.5±0.45	2.1±0.3*	2.4±0.2*	2.6±0.2*
RPF	3.8±0.7	5.3±1.25	7.0±0.7*	7.4±0.4*	8.2±1.0*
Infil Inters	1.5±0.1	1.1±0.25	0.7±0.1*	0.7±0.1*	0*
Fibr Inters	1.1±0.2	0.7±0.35	0.5±0.1*	0.25±0.2*	0*
Escl Vasc	1.2±0.1	0.6±0.2*	0.3±0.1*	0.2±0.1*	0*
GS global	36.1±8.2	10.6±3.1*	14.6±4.4*	9.9±2.8*	1.7±0.5*
GS focal	76±8	42±8S	32±6*	24±3*	14±4*

Conclusion. La administración de un PAF antagonista es capaz de atenuar la nefropatía crónica inducida por la lesión de isquemia reperusión y reducción de masa nefrónica. El efecto beneficioso del UR 12670, cuando su administración es iniciada a la semana del insulto isquémico, y la lesión de isquemia-reperusión se ha producido realmente, sugiere que el PAF participa en los mecanismos de progresión del daño renal crónico.

11

ASOCIACION DE LOS POLIMORFISMOS GENETICOS DEL ENZIMA CONVERTIDOR DE ANGIOTENSINA (ECA) Y DEL RECEPTOR DE ANGIOTENSINA (AT1) CON EL RIESGO CARDIOVASCULAR

Alvarez R, Peces R, Diaz Corte C, Reguero JR, Batalla A, Iglesias Cubero G, Cortina A, Alvarez Grande J, Alvarez V, Coto E. Servicios de Nefrología, Cardiología y Genética. Instituto Reina Sofia de Investigación. Hospital Central de Asturias. Oviedo.

Los componentes del sistema renina-angiotensina (angiotensinógeno, ECA y AT1) están implicados en el mantenimiento del tono vascular, en el remodelado cardiovascular y en la regulación fisiológica de la presión arterial. Estas moléculas están sometidas a variaciones en sus niveles circulantes, o en sus niveles de expresión celular y/o afinidad por el ligando. Las variaciones interindividuales se deben en parte a la existencia de variantes génicas (polimorfismos). En el gen del ECA existe un polimorfismo bialélico (I/D) y los homocigotos DD presentan niveles de ECA más elevados que los ID o los II. En el gen del receptor de angiotensina AT1 (A/C) hay también varios polimorfismos. Se analizó el papel de los polimorfismos del ECA (genotipos D/D, I/D y I/I) y del AT1 (A/C) en el desarrollo de enfermedad coronaria. Para ello se estudió la frecuencia de los distintos genotipos de los dos genes, en 181 pacientes menores de 50 años con enfermedad coronaria (33% con HTA y 10% diabéticos) y en 240 controles sanos de edades comparables. Se encontró que el genotipo DD fue más frecuente en los pacientes coronarios (50%) que en los controles sanos (41%). No hubo diferencias en la frecuencia de los genotipos de AT-1 entre ambos grupos. Sin embargo, se observó una asociación significativa entre ECA-DD y AT1-CC con enfermedad coronaria precoz. Así, entre los pacientes coronarios con el genotipo CC el 58% fueron DD, mientras que en los controles este porcentaje fue sólo del 21% (p < 0,02). Estos resultados indican que existe una asociación sinérgica entre los polimorfismos del ECA y de AT1 sobre el riesgo de padecer enfermedad coronaria. El genotipaje de ambos polimorfismos puede servir para la identificación de los individuos con un riesgo elevado y la instauración precoz de tratamiento preventivo.

10

NIVELES PLASMATICOS ELEVADOS DE ADRENOMEDULINA EN PACIENTES HEMODIALIZADOS CON HIPOTENSION CRONICA
N. Esforzado, A.Cases, J.Lopez-Pedret, F. Rivera, A. Darnell, W. Jimenez. Servicios de Nefrología y Hormonología. Hospital Clinic. Barcelona 08036

En los pacientes hemodializados (HD) con hipotensión crónica se ha observado una activación del sistema nervioso simpático y del sistema renina-angiotensina, así como una respuesta vascular disminuida al estímulo presor. Por ello se ha postulado que la producción aumentada de sustancias vasodilatadoras podrían jugar un papel en la disminución de resistencias vasculares periféricas descrito en estos pacientes. El objetivo de este estudio ha sido valorar el posible papel de la adrenomedulina en la fisiopatología de la hipotensión crónica en pacientes HD. Se incluyeron 9 pacientes HD con hipotensión crónica (HHD) (edad media 51 a, tiempo medio en HD 12.1 a) y 8 pacientes HD normotensos (edad media 44 a, tiempo medio en HD 8.5 a). En ambos grupos se determinaron niveles de actividad renina plasmática (ARP), y niveles plasmáticos de catecolaminas, angiotensina II (AII), NO₂/NO₃ (para estimar la producción de óxido nítrico) y adrenomedulina.

La presión arterial media (PAM) era inferior en los pacientes HHD que en los NHD (71±7 vs 93±6 mmHg, p<0.05). Los niveles plasmáticos de ARP, AII y catecolaminas eran superiores en los pacientes HHD que en los pacientes NHD, aunque sin alcanzar diferencias significativas. Los niveles plasmáticos de NO₂/NO₃ estaban aumentados en ambos grupos de pacientes respecto a los controles sanos, aunque no habían diferencias significativas entre los dos grupos de pacientes (HHD 104±36 vs NHD 99±50 nmol/ml). Los niveles plasmáticos de adrenomedulina estaban aumentados en ambos grupos, respecto a los controles sanos (C) (HHD 368±76, NHD 224±24, C 127±58 pg/ml, p<0.05 vs C). Los niveles de adrenomedulina eran significativamente superiores en los pacientes HHD respecto a los NHD (p<0.05). Los niveles plasmáticos de adrenomedulina se correlacionaron inversamente con los niveles de PAM (r= -0.58, p<0.02). Los niveles plasmáticos de adrenomedulina están aumentados en los pacientes hemodializados, respecto a los sujetos sanos. Los mayores niveles plasmáticos de este potente vasodilatador en pacientes HHD respecto a los NHD y su estrecha correlación con la presión arterial media sugieren que la adrenomedulina podría jugar un papel en la fisiopatología de la hipotensión crónica en pacientes HD.

12

EXPRESION DEL ANTIGENO CD69 TRAS EL TEST DE ESTIMULO LINFOCITARIO IN VITRO: UN METODO PARA CUANTIFICAR DEFECTOS EN LA RESPUESTA INMUNE LINFOCITARIA.

Gascón, A. Ortao, A*. Berisa, F. Belvis, JJ. Iglesias, E. Ciudad, J*. López, A*. S. Nefrología, Hospital Obispo Polanco. Teruel; S. Citometría. Universidad de Salamanca*. España.

El estado de inmunodeficiencia descrito en los pacientes en hemodiálisis (HD) se asocia con un estado de preactivación linfocitaria T. El CD69 es un antígeno de activación linfocitaria cuya rápida expresión (menos de 4 horas postactivación) permite una detección precoz de un estado de activación celular. La expresión del CD69 en linfocitos CD4 de pacientes VIH+, tras un test de estimulación linfocitaria, permite identificar pacientes con inadecuada capacidad de respuesta linfocitaria a estímulos antígenicos. El objetivo del presente trabajo se centra en analizar en sangre periférica (SP), mediante citometría de flujo y empleando un triple marcaje, el nivel de expresión del CD69 en células T CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD3+CD8+ (T_Hδ) y células natural killer CD3-CD8+. Se realiza estudio funcional incubando muestras de SP durante 4 horas, a 37°C, con un anticuerpo monoclonal frente a los antígenos CD2/CD2R, y lectura posterior en el citómetro de flujo (Test para determinar activación linfocitaria policlonal). Se estudian once pacientes en HD (edad media 69 años), y un grupo control de diez sujetos sanos.

Resultados en % de células: basalmente y posterior al Test.

	HD	Controles	p
%CD69+CD3+CD4+	0,9±1,4	0,9±0,5	NS
%CD69+CD3+CD4+ Test	34,8±9,3	24,3±9,6	<0,02
%CD69+CD3+CD8+	0,8±0,6	0,4±0,2	<0,04
%CD69+CD3+CD8+ Test	12,6±7,5	12,5±8,5	NS
%CD69+CD3+CD8+	0,3±0,3	0,2±0,2	NS
%CD69+CD3+CD8+ Test	10,8±6,7	2,2±1,2	<0,001
%CD69+CD3-CD8+	1,1±1,6	0,3±0,2	NS
%CD69+CD3-CD8+ Test	6,4±4,3	11,8±8,3	NS

Los resultados muestran que estos pacientes en HD responden a la activación linfocitaria de forma similar, si no mejor, que los controles sanos. Indican la existencia de una capacidad aceptable de respuesta inmune en estos pacientes. El CD69 puede ser un útil marcador para una valoración rápida de posibles defectos en la respuesta inmune linfocitaria de pacientes en HD.

13
..

ACTIVACIÓN DEL MÚSCULO LISO VASCULAR POR RADICALES LIBRES DE OXÍGENO (RLO): PAPEL DE LA FOSFOLIPASA C GAMMA (PLC γ). F.R. González Pacheco, M.V. Alvarez Arroyo, R. Bragado, M.A. Castilla, J. Arias*, E. Teixeira, O. Martín, C. Caramelo. Fundación Jiménez Díaz y *Hospital Clínico Universitario, Madrid.

La activación de las células de músculo liso vascular (CMLV) por radicales libres de O₂ (RLO) es de importancia relevante en la isquemia/reperfusión, el fracaso renal agudo hemodinámico y en procesos arterioscleróticos e hipertensivos. Sin embargo, no se conocen con exactitud los mecanismos intracelulares por los que los RLO activan las CMLV. En el presente estudio, la exposición de CMLV a moléculas generadoras de RLO, como H₂O₂ (250 μ M), causó un aumento rápido (pico en < 10 seg) en la concentración de Ca²⁺ citosólico ([Ca²⁺]_i), e indujo simultáneamente un cambio significativo en la forma y área de las CMLV (19.8 % de cambio de forma de CMLV, p <0.01). Estos cambios fueron dependientes de concentración, en un rango desde 50 a 500 μ M de H₂O₂. Como hallazgo central, encontramos que tanto el pico de [Ca²⁺]_i como el cambio conformacional de las CMLV inducido por H₂O₂ fue dependiente de fosforilación de tirosinas, a juzgar por el bloqueo (96 % del pico de [Ca²⁺]_i y 84 % del cambio de forma de CMLV, ambos p<0.01) al tratar estas células con el inhibidor de tirosina quinasas, genisteína (100 μ M). Basados en estos resultados, hallamos mediante Western blot con anticuerpos específicos que la exposición a H₂O₂ (30 seg-5 min) indujo la fosforilación en tirosinas de PLC γ , activando la liberación y aumento de [Ca²⁺]_i. Fenomenológicamente, el componente inicial (pico) de la respuesta de [Ca²⁺]_i fue dependiente de liberación desde los depósitos intracelulares, tal como demostró su inhibición (98%, p<0.01) por el bloqueante de movilización del Ca²⁺ citosólico, dantrolene (50 μ M); el dantrolene no afectó el componente tardío de la elevación de [Ca²⁺]_i. El presente estudio revela por primera vez que los RLO activan la PLC γ en CMLV vía fosforilación de tirosinas y que esta activación tiene un papel principal en las acciones contráctiles rápidas de los RLO en este tipo de células. Estos resultados tienen implicaciones inmediatas en la patogenia y posible terapéutica de las lesiones renales por isquemia/reperfusión y otras situaciones de hipercontractilidad vascular potencialmente ligadas a RLO.

15
.

TRETINOINA INDUCE MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS EN CÉLULAS MESANGIALES GLOMERULARES HUMANAS EN CULTIVO

Moreno Manzano, V.; Torrecillas, G; Rodriguez Puyol, M; Rodriguez Puyol, D; Lucio Cazaña, J. Departamento de Fisiología. Universidad de Alcalá. Madrid.

Tretinoína, o ácido retinoico todo trans (AR-t), es uno de los metabolitos activos de la vitamina A, que actúa como mensajero intracelular modulando la diferenciación celular empleando receptores nucleares que actúan como factores de transcripción controlando la expresión de genes específicos. Además, los retinoides incluyendo AR-t, probablemente ejercen otros efectos importantes como es influir sobre elementos específicos del sistema inmune, estimulando la fagocitosis, modulando la síntesis de citoquinas o induciendo apoptosis (muerte celular programada). En nuestro sistema, células mesangiales glomerulares humanas en cultivo, entre pase 15-20, observamos que Tretinoína, empleando una dosis máxima de 50 μ M induce lenta y progresivamente muerte celular por apoptosis tras 72 horas de incubación en condiciones de quiescencia, 0.5% de suero de ternera fetal. La identificación de la apoptosis se realizó en primer lugar mediante procedimientos morfológicos, mediante microscopía óptica, en células teñidas con Giemsa, o mediante microscopía de fluorescencia en células teñidas con una mezcla de naranja de acridina y bromuro de etidio. Otra prueba realizada fue la puesta de manifiesto de la activación de la endonucleasa dependiente de calcio que rompe el DNA en fragmentos múltiples de 123 pares de bases al someter a electroforesis, en gel de agarosa al 2%, el DNA de células incubadas con AR-t que separa dichos fragmentos asemejándose a los peldaños de una escalera. Finalmente una prueba más concluyente, inmunohistoquímica, fue la basada en el procedimiento del TUNEL (Tdt-mediated dUTP nick end labeling) y cuyo fundamento es la identificación de los restos 3OH' libres del DNA de células apoptóticas.

En un intento de clarificar el mecanismo por el cual AR-t induce a la apoptosis éstas células estudiamos la posible implicación del sistema del glutatión, y observamos que efectivamente los niveles de GSH aumentan desde cortos periodos de incubación hasta la culminación del proceso apoptótico. Lo que nos hace pensar que la apoptosis disparada por Tretinoína podría depender del efecto de esta sobre los niveles de glutatión.

14
.

DIFERENTE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE MATRIZ EXTRACELULAR Y DEL FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE β_1 (TGF β_1) EN CÉLULAS MESANGIALES HUMANAS EN FUNCIÓN DEL SOPORTE DE CULTIVO

Iglesias de la Cruz MC, Ruiz Torres MP, Serrano Ramirez MC, Luis Martín R, Rodríguez Puyol D. Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. Universidad de Alcalá. Madrid.

Las células mesangiales glomerulares juegan un papel determinante en la función renal. Estas células son capaces de contraerse ante determinados estímulos fisiológicos y fisiopatológicos, determinando así en parte la tasa de filtración glomerular. Además, diversas evidencias sugieren que estas células son responsables de la producción de la matriz mesangial. El componente predominante de dicha matriz es el colágeno tipo IV. Sin embargo, en una gran variedad de procesos fisiopatológicos como la diabetes, diversas glomerulonefritis o el envejecimiento, aparece una expresión incrementada de colágenos intersticiales, los colágenos tipo I y III. El objetivo de este estudio fue examinar la influencia de un componente de matriz extracelular anormal, el colágeno tipo I, comparándola con el colágeno "fisiológico", el tipo IV y con el soporte de cultivo estándar en plástico. Para ello, se cultivaron células mesangiales humanas sobre plástico, colágeno tipo I y colágeno tipo IV. Se analizó la expresión de los ARNm del TGF β_1 , cadena α_1 del colágeno I [α_1 (I)], cadena α_1 del colágeno III [α_1 (III)], cadena α_1 del colágeno IV [α_1 (IV)] y fibronectina por Northern Blot. Comparado con el plástico o con el colágeno tipo IV, la presencia de colágeno tipo I indujo un incremento en los niveles de ARNm de α_1 (I) y de α_1 (IV) de 2 veces, así como de fibronectina (1.75 veces) y de TGF β_1 (2 veces). Sin embargo, la expresión de α_1 (III) fue completamente inhibida por la presencia de colágeno tipo I. Estos resultados muestran una posible modulación de las proteínas de matriz extracelular y del TGF β_1 por la presencia de colágenos intersticiales ausentes en el riñón normal, lo cual podría explicar el desarrollo de algunas enfermedades renales con esclerosis glomerular e intersticial.

16
..

EFFECTO DEL LPS EN LA APOPTOSIS DE CELULAS MONONUCLEARES

J. Carracedo, R. Ramírez, A.R. Benot, M. Rodríguez, A. Martín-Malo, y P. Aljama Servicio de Nefrología. Hospital Reina Sofía. Córdoba.

La hemodiálisis (HD) se ha asociado con la activación en células mononucleares. La molécula CD14 se considera un marcador de activación para estas células. Esta molécula, es el receptor de alta afinidad para el lipopolisacárido bacteriano (LPS). Durante la HD, la contaminación con LPS se ha asociado con la activación de células mononucleares. En modelos in vitro, la adición de LPS induce activación e incrementa la supervivencia de células mononucleares humanas, rescatándolas de la muerte por apoptosis. Nuestro grupo ha demostrado previamente que las membranas de HD bioincompatibles como cuprofan (CU) pueden inducir activación y apoptosis en células mononucleares de sujetos sanos. Como continuación de estos trabajos hemos analizado el efecto que la adición de LPS tiene sobre la activación y apoptosis en células mononucleares humanas cultivadas con CU.

Las células mononucleares humanas fueron separadas mediante gradiente de Ficoll a partir de 20ml de sangre periférica de 10 sujetos sanos y 10 pacientes con insuficiencia renal crónica (aclaramiento de creatinina <15 ml/min). Tras su separación, las células se resuspendieron en medio de cultivo suplementado con aminoácidos y antibióticos y un 10% de FCS descomplementarizado a razón de 5x10⁵ cels/ml. En estas condiciones, las células se depositaron por triplicado en una placa de cultivo, cuyos pocillos se habían cubierto previamente con la membrana de CU y en los pocillos problema se añadió LPS (1 ng/ml), y se cultivaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 48h. De forma periódica y utilizando un citómetro de flujo determinamos la expresión de CD14, la unión de LPS marcado, el ciclo celular y la muerte celular por apoptosis. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla siguiente:

	Expresión CD14		% LPS-binding		% Apoptosis	
	Sano	Urémico	Sano	Urémico	Sano	Urémico
Control	669±5	707±6 a	-	-	6±3	30±7 a
CU	707±6 a	715±7 ab	-	-	25±5 a	39±8 ab
LPS	705±7 a	717±6 ab	32±10	64±6 c	7±10 a	22±2 ab
LPS + CU	725±9 a	738±8 ab	76±8 c	87±7 cd	12±7 a	24±6 ab

a p<0,02 vs control sano, b p<0,02 vs control urémico, c p<0,02 vs sano, d p<0,02 vs urémico

Estos datos sugieren que LPS incrementa la activación inducida por CU en células mononucleares tanto de sujetos normales como de pacientes urémicos. Al igual que ocurre en otros modelos experimentales, en células mononucleares de sujetos sanos, LPS inhibió la muerte celular por apoptosis inducida por CU. En sujetos urémicos, LPS redujo tanto la apoptosis espontánea como la apoptosis inducida por CU. Estos datos sugieren que el LPS modula de forma relevante la apoptosis inducida por CU.

INFLUENCIA DE LA MATRIZ EXTRACELULAR SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS COMPONENTES DEL SISTEMA DEL TGF-β1 EN CÉLULAS MESANGIALES HUMANAS

Luis-Martin, R.; Igleias de la Cruz, M.C.; Lucio-Cazaña, J.; González, L.; Moreno-Manzano, V.; Díez-Marqués, L. Departamento de Fisiología. Universidad de Alcalá de Henares, Madrid.

Es bien conocida la importancia y el papel del sistema de TGF-β1 como causa principal de la deposición de matriz en la glomeruloesclerosis que cursa con fibrosis en el riñón enfermo, así como regulador de la proliferación de las células residentes en el glomerulo. En la transmisión de la señal del TGF-β1, mediante la unión a sus receptores, intervienen múltiples moléculas, entre ellas la Endogлина, glicoproteína homodimérica de membrana que une con gran afinidad TGF-β 1 y 3. Actúa como un receptor no señalizante y su función parece ser el bloqueo de la acción de esta citoquina. Otra molécula implicada es la Decorina, proteoglicano que se encuentra en la matriz extracelular e inhibe la acción del TGF-β1, por último la molécula necesaria para que se transmita la señal es el receptor II. Estas tres moléculas van a ser el objetivo de nuestro estudio.

Por otro lado se sabe que las células mesangiales humanas presentan un comportamiento diferente dependiendo del tipo de matriz extracelular sobre el que son cultivadas. Por ello nos propusimos evaluar si un tipo de colágeno patológico, como es el colágeno I, no presente en un glomérulo sano, influye sobre la expresión de alguno de los componentes del sistema del TGF-β1, frente a un colágeno habitual en la membrana basal y en el mesangio, como es el colágeno IV.

Lo primero que se hizo fue comprobar la existencia de Endogлина en las células mesangiales mediante Western y Northern blot. Una vez confirmado esto, se cultivaron células mesangiales humanas sobre COL I y COL IV. Mediante Northern blot se analizaron las posibles diferencias de la expresión del mRNA de Endogлина, Decorina y el Receptor II entre las dos matrices diferentes.

Los resultados revelaron un aumento significativo en los niveles del mRNA del Receptor II de células cultivadas sobre el COL I, frente a la matriz de COL IV (COL IV: 100%; COL I: 183% ± 8%*, p< 0.01 frente al COL IV). Respecto a la Endogлина, a la cual se le podría asignar un papel "secuestrante" de TGF-β1, y la Decorina, inactivador de TGF-β, se observa también un ligero aumento en colágeno I respecto al COL IV, pero éste no es significativo. Estos resultados podrían hacernos pensar que la aparición en el glomérulo de colágeno I incrementando la expresión del receptor II, favorecería la acción del TGF-β sobre la síntesis de matriz.

ENDOTELINAS 1 Y 3 EN EL ENVEJECIMIENTO RENAL. MODELO EXPERIMENTAL EN RATA

O'Valle E, Rodríguez Puyol M¹, Rodríguez Puyol D¹, Masseroli M, Arrebola F, Aguilar M, Olmo A, Reguero ME, Aguilar D, del Moral RG. Depto. de Anatomía Patológica. Hospital Universitario San Cecilio. Granada. Dpto. de Fisiología-Farmacología¹ y Sección de Nefrología² H. Universitario Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares, Madrid.

1. INTRODUCCIÓN: Las endotelinas (Et) han sido implicadas en la patogenia de enfermedades renales agudas y crónicas; no obstante hay pocos datos sobre su expresión e impacto en la función renal normal renal y sus modificaciones con el envejecimiento. Está demostrado que la expresión de receptores EtA y EtB es edad-dependiente, disminuyendo y aumentado respectivamente. Previamente hemos demostrado que las ratas envejecidas presentan alteraciones funcionales como proteinuria progresiva e importantes alteraciones morfológicas que incluyen arterioesclerosis, hipertrofia, esclerosis y quistificación glomerular, cilindros intratubulares y fibrosis intersticial. La intención de este estudio definir la expresión y localización de Et1 y Et3 en ratas jóvenes y viejas para establecer la posible relación con otros factores y fenómenos morfológicos presentes en la glomeruloesclerosis y daño tubulo-intersticial en el envejecimiento.

2. MATERIAL Y MÉTODOS: Fueron estudiadas las alteraciones morfológicas en muestras renales de ratas Wistar macho normotensas de 3 meses (n=10) y 24 meses (n=10) y la distribución de Et1 y Et3 valorados por métodos inmunohistoquímicos (IIQ), los niveles de mRNA de preproEt1 y Et3 mediante Northern-blotting (NB) y la expresión de TGFβ1 por RT-PCR. Igualmente fue cuantificada la fibrosis renal mediante la aplicación de análisis de imagen Fibrosis IR.

3. RESULTADOS: La expresión de Et1 (mRNA y proteína) incrementa con la edad de forma significativa (p<0.001, t de Student) (Tabla 1), por el contrario no se produce modificación significativa de Et3. La distribución renal de Et1 en ratas jóvenes se restringe a las células tubulares y sólo en ratas viejas se detecta por IIQ en elementos glomerulares. Et3 se expresa fuertemente en ratas de 3 meses en células tubulares y glomérulo. La cantidad de Et3 es significativamente mayor (p<0.001) tanto a los 3 como a los 24 meses que Et1. Esta última se correlaciona con la expresión de TGFβ1 (r=0.879, test de Pearson) mientras que lo hace débilmente con Et3 (r=0.248). Ambas Ets se correlacionan con las lesiones morfológicas halladas (hipertrofia glomerular, presencia de cilindros y fibrosis glomérulo-intersticial).

Tabla 1	Endotelina 1		Endotelina 3	
	3 meses	24 meses*	3 meses	24 meses
Northern blot (preproEt)	0.041±0.02	0.196±0.06	0.084±0.03	0.239±0.145
IIQ cél. Tubulares	1.50±0.57	2.14±0.89	2.25±0.5	1.86±0.77
IIQ cél. mesangiales	0±0	1.43±0.97	1.87±0.85	2.36±0.71
IIQ capilares	0±0	0.57±0.78	2.50±0.70	2.14±0.63
IIQ cápsula Bowman	0±0	0.28±0.48	1.75±0.5	2.14±0.53

* p<0.001 de Student

4. CONCLUSIÓN: El patrón de distribución celular de Et1 y Et3 en ratas envejecidas es semejante; pero Et1 incrementa con la edad y Et3 no sufre cambios. A pesar ambos se relacionan con las lesiones morfológicas renales la mayor expresión de Et3 y su evolución diferente permiten especular que poseen una función distinta en el envejecimiento.