

Universidad de Salamanca

Departamento de Fisiología y Farmacología



**EXPRESIÓN DE ENDOGLINA TRAS LA
OBSTRUCCIÓN URETERAL
UNILATERAL EN LA RATA**

Marta Prieto Vicente

2001

D. José Juan García Marín, Director del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

CERTIFICA:

Que la Memoria titulada **“EXPRESIÓN DE ENDOGLINA TRAS LA OBSTRUCCIÓN URETERAL UNILATERAL EN LA RATA”** presentada por D^a. Marta Prieto Vicente para optar al Grado de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección del Doctor Fernando Pérez Barriocanal en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expido y firmo la presente certificación en Salamanca, a 26 de Noviembre de 2001.

Fdo: José Juan García Marín

D. Fernando Pérez Barriocanal, Profesor titular del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

CERTIFICA:

Que la Memoria titulada **“EXPRESIÓN DE ENDOGLINA TRAS LA OBSTRUCCIÓN URETERAL UNILATERAL EN LA RATA”** presentada por D^a. Marta Prieto Vicente para optar al Grado de Salamanca, ha sido realizada bajo su dirección, en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expido y firmo la presente certificación en Salamanca, a 26 de Noviembre de 2001.

Fdo: Fernando Pérez Barriocanal

RELACIÓN DE ABREVIATURAS

Ag I: Angiotensina I

Ag II: Angiotensina II

AT1: Receptor de angiotensina 1

AT2: Receptor de angiotensina 2

BSA: Albúmina bovina sérica

Clc: Aclaramiento renal de creatinina

Co: Concentración de creatinina en orina

Cp: Concentración de creatinina en plasma

DEPC: Dietil-pirocarbonato

DO: Densidad óptica

ECA: Enzima convertidora de angiotensina

EEM: Error estándar de la media

EGF: Factor de crecimiento del endotelio

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos

FSR: Flujo sanguíneo renal

FU: flujo urinario

Hcto: Hematocrito

HHT1: Telangiectasia hemorrágica hereditaria tipo 1

ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular-1

IECA: Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina

I κ B: Inhibidor del NF- κ B

IL: Interleucina

IRC: Insuficiencia renal crónica

Kf: Coeficiente de filtración

L: Riñón ligado

Lc: Longitud del capilar sanguíneo ocupado por células

Lt: Longitud total del capilar sanguíneo ocupado por la muestra de sangre (células y plasma)

MCP-1: Péptido quimioatrayente de monocitos-1

NF- κ B: Factor nuclear κ B
NL: Riñón no ligado
NO: Óxido nítrico
OOU: Obstrucción ureteral unilateral
PAD: Presión arterial diastólica
PAF: Factor activador de las plaquetas
PAM: Presión arterial media
PAS: Presión arterial sistólica
PBS: Solución salina tamponada con fosfatos
PCB: Presión hidrotática en la cápsula de Bowman
PCG: Presión hidrostática en el capilar glomerular
PDGF: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PECAM-1: molécula de adhesión celular de las plaquetas/endotelial 1
PEF: Presión efectiva de ultrafiltración
 π CB: Presión oncótica en la cápsula de Bowman
 π CG: Presión oncótica en los capilares glomerulares
RD: Riñón derecho
RI: Riñón izquierdo
SDS: Dodecil sulfato sódico
SQ: Simulación quirúrgica
SRA: Sistema renina-angiotensina
SSC: Solución salina concentrada
TCA: Ácido tricloroacético
TGF- β : Factor de crecimiento transformante β
TFG: Tasa de filtración glomerular
TFGN: tasa de filtración glomerular por nefrona
TNF- α : Factor de necrosis tumoral α
TTBS: Solución salina con Twin y tamponada con Tris base
TXA₂: Tromboxano A₂
VCAM-1: Molécula de adhesión de células vasculares-1

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| EL RIÑÓN | 2 |
| ESTRUCTURA DE LOS RIÑONES Y SISTEMA URINARIO | 2 |
| LA NEFRONA | 3 |
| El corpúsculo renal | 4 |
| El túbulo | 7 |
| RIEGO SANGUÍNEO DE LA NEFRONA | 8 |
| APARATO YUXTAGLOMERULAR | 9 |
| PROCESOS RENALES BÁSICOS | 9 |
| FILTRACIÓN GLOMERULAR | 9 |
| La membrana glomerular y la permeabilidad glomerular | 9 |
| Composición del filtrado glomerular | 10 |
| Tasa de filtración glomerular | 11 |
| Fuerzas participantes en el proceso de filtración glomerular | 11 |
| Tasa de filtración glomerular por nefrona | 12 |
| REABSORCIÓN Y SECRECIÓN TUBULAR | 13 |
| FUNCIONES DEL RIÑÓN | 13 |
| INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA | 16 |
| MODELO DE OUU | 17 |
| FIBROSIS TÚBULOINTERSTICIAL | 18 |
| INFLAMACIÓN DEL INTERSTICIO | 19 |
| APOPTOSIS | 20 |
| FISIOPATOLOGÍA DE LA OUU | 22 |
| MOLÉCULAS IMPLICADAS EN EL DAÑO RENAL | 23 |
| ANGIOTENSINA II | 24 |

| | |
|---|----|
| DECORINA | 25 |
| PROTEÍNAS 53 Y 21 (WAF-1) | 25 |
| TNF- α | 26 |
| NF κ B | 27 |
| TGF- β | 27 |
| Receptores de TGF- β | 29 |
| LA ENDOGLINA | 31 |
| OBJETIVOS | 33 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 35 |
| ANIMALES EXPERIMENTALES: DIETA Y CONDICIONES AMBIENTALES | 36 |
| GRUPOS EXPERIMENTALES | 37 |
| PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL DE OUU | 37 |
| ANESTESIA | 37 |
| PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO | 38 |
| ESTUDIOS FUNCIONALES <i>IN VIVO</i> | 38 |
| MEDIDA DE PRESIÓN ARTERIAL Y FRECUENCIA CARDÍACA | 38 |
| OBTENCIÓN DE SANGRE Y DETERMINACIONES EN PLASMA | 39 |
| HEMATOCRITO | 39 |
| EXTRACCIÓN DEL PLASMA | 40 |
| CREATININA EN PLASMA | 40 |
| PROTEÍNAS EN PLASMA | 41 |
| PERFUSIÓN Y EXTRACCIÓN DE ÓRGANOS | 42 |
| ESTUDIOS HISTOLÓGICOS | 42 |
| MORFOLOGÍA: TINCIÓN CON TRICRÓMICO DE MASSON | 42 |
| MORFOMETRÍA: TINCIÓN CON ROJO SIRIO | 43 |

| | |
|---|----|
| INMUNOHISTOQUÍMICA | 46 |
| ANÁLISIS POR NORTHERN BLOT DE RNAm | 47 |
| EXTRACCIÓN DE RNA | 47 |
| NORTHERN BLOT | 47 |
| ANÁLISIS POR WESTERN BLOT DE PROTEÍNAS | 49 |
| EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS | 49 |
| WESTERN BLOT | 50 |
| TRATAMIENTO ESTADÍSTICO | 52 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 53 |
| EFECTOS FISIOLÓGICOS DE LA OUU EN RATAS | 54 |
| INCREMENTO DEL PESO CORPORAL | 54 |
| RELACIÓN PESO RENAL/ PESO CORPORAL | 55 |
| PRESIÓN ARTERIAL MEDIA | 57 |
| FRECUENCIA CARDIACA | 58 |
| HEMATOCRITO | 59 |
| PROTEÍNAS EN PLASMA | 60 |
| CREATININA EN PLASMA | 61 |
| DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i> | 62 |
| MODIFICACIONES HISTOLÓGICAS DE LOS RIÑONES LIGADOS Y CONTRALATERALES | 65 |
| ESTUDIOS MORFOLÓGICOS | 65 |
| ESTUDIOS MORFOMÉTRICOS | 68 |
| INMUNOHISTOQUÍMICA | 70 |
| EXPRESIÓN DE COLÁGENO I, COLÁGENO IV, TGF- β Y ENDOGLINA | 75 |

| | |
|--|----|
| COLÁGENO | 75 |
| TGF- β 1 | 75 |
| ENDOGLINA | 76 |
| DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS HISTOLÓGICOS, INMUNOHISTOQUÍMICOS Y DE NORTHERN Y WESTERN BLOT | 83 |
| CONCLUSIONES | 86 |
| BIBLIOGRAFÍA | 88 |

INTRODUCCIÓN

EL RIÑÓN

ESTRUCTURA DE LOS RIÑONES Y SISTEMA URINARIO

Los riñones son dos vísceras de color pardo-rojizo que tienen como función fundamental mantener la homeostasis del medio interno. Se localizan fuera de la cavidad peritoneal adosados a la pared abdominal posterior, uno a cada lado de la columna vertebral. Están tapizados por una delgada cápsula conjuntiva. En el borde medial de cada riñón hay una concavidad, denominada hilio, por la cual pasan los vasos y nervios renales, y en la que está situada la pelvis renal que continúa en forma de embudo prolongándose hasta el extremo superior del uréter. El borde convexo exterior de la pelvis renal se divide en cálices mayores, cada uno de los cuales se subdivide en cálices menores. Estos últimos rodean en forma de copa el ápice que sobresale de una masa de tejido en forma de cono, denominada pirámide renal.

En una sección longitudinal se distinguen dos regiones: una interna, médula renal, y una externa, corteza renal. La médula está formada por varias pirámides renales. Los ápices de éstas se proyectan dentro de los cálices menores. El extremo de un ápice se denomina papila. Cada pirámide medular, coronada por una región de corteza renal constituye un lóbulo sencillo.

Un examen macroscópico permite distinguir que la corteza tiene un aspecto ligeramente granular que no se observa en la médula y que cada pirámide medular puede dividirse en una zona exterior (adyacente a la corteza) y una zona interior que incluye la papila (Bulger y Dobyan, 1982; Tisher, 1981). La estructura del riñón se representa en la figura 1.

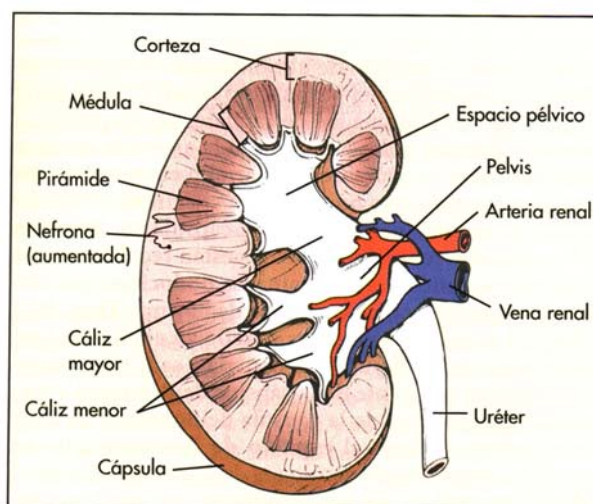


Figura 1. Corte de un riñón humano (Berne y Levy, 2001).

LA NEFRONA

La nefrona es la unidad anatómica y funcional del riñón. El riñón humano está formado por cerca de un millón y medio de nefronas. Cada una de ellas consta de un elemento filtrante denominado corpúsculo renal, y un segmento tubular que se extiende por fuera del corpúsculo renal, en el cual se realizan los procesos de secreción y reabsorción (Madsen y Tisher, 1986).

Las nefronas se clasifican según la longitud del asa de Henle en:

- nefronas corticales : tienen las asas de Henle cortas.
- nefronas yuxtamedulares: tienen las asas de Henle largas, en las que el inicio de la rama ascendente gruesa del asa marca el límite entre la médula externa e interna.

La diferencia entre estos dos tipos de nefronas puede observarse en la figura 2.

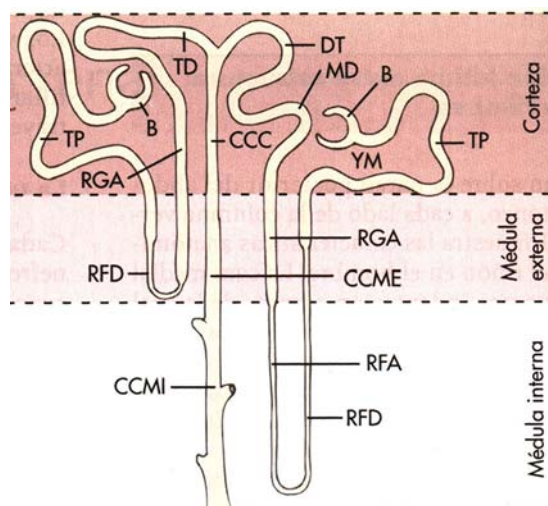


Figura 2: Tipos de nefronas por su localización en la corteza (Berne y Levy, 2001). A la izquierda se representa una nefrona cortical y a la derecha una nefrona yuxtamedular (YM). El asa de Henle comprende la porción recta del túbulo proximal (TP), la rama fina descendente (RFD), la rama fina ascendente (RFA) y la rama gruesa ascendente (RGA). B, cápsula de Bowman; CCC, conducto colector cortical; CCME, conducto colector medular externo; CCMI, conducto colector medular interno; MD, mácula densa; TD, túbulo distal.

El corpúsculo renal

Está compuesto por un ovillo apretado de asas capilares interconectadas, el glomérulo, que está rodeado por una cápsula hueca de forma globosa, la cápsula de Bowman. Existe un espacio dentro de la cápsula (el espacio urinario o el espacio de Bowman) hacia donde pasa el líquido filtrado procedente del glomérulo. La estructura del glomérulo se representa en la figura 3.

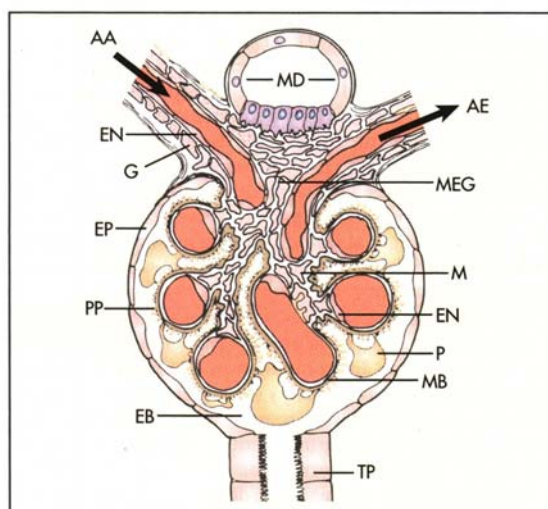


Figura 3: Glomérulo renal y estructuras asociadas (Berne y Levy, 2001). *MD*, mácula densa; *MEG*, células mesangiales extraglomerulares; *G*, células granulares; *AA*, arteriola aferente; *AE*, arteriola eferente; *EB*, espacio de Bowman; *EN*, célula endotelial; *EP*, epitelio parietal; *M*, células mesangiales; *MB*, membrana basal; *P*, cuerpo celular del podocito; *PP*, prolongaciones del podocito; *TP*, células del túbulo proximal.

La barrera de filtración del corpúsculo renal (membrana glomerular), cuya estructura se observa en la figura 4, consta de tres capas: el endotelio de los capilares glomerulares, la membrana basal y una capa de células epiteliales especializadas. La capa endotelial está perforada por amplios agujeros. La membrana basal es una red relativamente homogénea de glicoproteínas y mucopolisacáridos. Las células epiteliales que descansan sobre la membrana basal son muy diferentes de las células simples y aplanadas que revisten el resto de la cápsula de Bowman y se las denomina podocitos; tienen un gran número de extensiones podálicas (pedicelos), integradas en la membrana basal. Los pedicelos de podocitos adyacentes muestran una gran interdigitación. Existen hendiduras entre pedicelos adyacentes que constituyen la vía por la que pasa el filtrado una vez atravesadas las células endoteliales y la membrana basal para penetrar en el espacio de Bowman. Sin embargo, hay dos razones por las que estas hendiduras no ofrecen una vía completamente libre:

1) Las extensiones podálicas están revestidas por una gruesa capa de material extracelular (glicoproteínas) que ocluyen parcialmente las hendiduras.

2) En la superficie de la membrana basal hay finos diafragmas que se extienden en forma de puente sobre las hendiduras.



Figura 4: Microfotografía electrónica de la barrera de filtración de un capilar glomerular. *Las flechas señalan el diafragma que cierra el suelo de las hendiduras de filtración. LC, luz capilar, CB, cuerpo celular de un podocito.*

El significado funcional de esta estructura anatómica es que la sangre que fluye por el capilar glomerular sólo está separada del espacio de Bowman por un delgado conjunto de membranas que permiten que el líquido de los capilares filtre al interior de este espacio. La cápsula de Bowman se conecta, en el lado opuesto del glomérulo, con la primera porción del túbulo proximal hacia la cual fluye el líquido filtrado (Tisher, 1981).

Además de las células endoteliales capilares y de los podocitos hay un tercer tipo de células en el corpúsculo renal: las células mesangiales, que se encuentran en la parte central del glomérulo entre las asas capilares, a veces penetrando en ellas, de forma que contactan íntimamente con la célula endotelial. Las células mesangiales tienen las siguientes funciones:

- 1) Contráctil: La capacidad de contracción debida a los miofilamentos de actina y miosina es la principal función de estas células. De esta manera se regula el coeficiente de ultrafiltración, en respuesta a distintos agonistas.
- 2) Capacidad fagocítica.
- 3) Capacidad de síntesis y degradación de su propia matriz extracelular.

4) Síntesis de determinados autacoides y factores de crecimiento que pueden actuar de forma autocrina o paracrina.

El túbulo

En todo su trayecto, está constituido por una sola capa de células epiteliales que descansan sobre una membrana basal. La estructura y función de esas células epiteliales varía mucho de un segmento a otro del túbulo, pero tienen una característica común: la presencia de uniones estrechas entre células adyacentes.

El segmento de túbulo donde drena la cápsula de Bowman se denomina túbulo proximal, el cual inicialmente forma varias espiras (túbulo contorneado) y a continuación va seguido por un segmento recto que desciende hacia la médula.

El siguiente segmento, en el cual drena el túbulo recto proximal, es la rama fina descendente del asa de Henle. Esta rama termina en horquilla y entonces comienza un ascenso paralelo a la rama descendente. En las nefronas yuxtamedulares a este segmento se le llama rama fina ascendente del asa de Henle y a continuación se encuentra la rama gruesa ascendente del asa de Henle. En el caso de nefronas corticales, no hay rama ascendente delgada y la gruesa parte directamente de la horquilla del asa.

Cerca del extremo de cada rama gruesa ascendente, el túbulo pasa entre las arteriolas que riegan su corpúsculo renal de origen. Ese segmento del túbulo se conoce como mácula densa. Un poco más arriba de la mácula densa termina la rama gruesa ascendente y empieza el túbulo contorneado distal. A continuación se encuentra el túbulo conector, que conduce al tubo colector cortical. La porción inicial de unos diez túbulos colectores corticales se une para formar un solo conducto colector cortical de mayor diámetro. Todos los túbulos colectores corticales llegan a la médula renal para convertirse en túbulos colectores medulares externos, y después en túbulos colectores medulares internos. Estos últimos se unen para formar varios cientos de conductos mayores, cuya porción final se denomina túbulo colector papilar, el cual vacía su contenido en cada uno de los cálices de la pelvis renal. Los distintos segmentos del túbulo están representados en la figura 2.

La pelvis se continúa con el uréter, y éste con la vejiga urinaria, donde la orina se almacena de manera transitoria y de la cual se elimina en forma intermitente. Después de penetrar a un cáliz, la orina ya no sufre alteraciones. A partir de ese punto, el resto del sistema urinario sirve sólo como tubo conductor.

Como ya se mencionó, el epitelio tubular tiene una célula de espesor en todo su trayecto. Hasta el túbulo contorneado distal las células de cualquier segmento son homogéneas y características de cada segmento. Sin embargo, casi al final del túbulo contorneado distal pueden mezclarse varios tipos de células dentro de un segmento dado, o incluso estos tipos de células pueden estar en diferentes porciones en varios segmentos. Los dos tipos de células más importantes en los conductos colectores son las células principales y las células intercalares. Las primeras son las más abundantes y tienen por función la reabsorción de sodio y la reabsorción o secreción de potasio. Las intercalares se encargan de la acidificación de la orina (Bulger y Dobyan, 1982; Tisher, 1981).

RIEGO SANGUÍNEO DE LA NEFRONA

La sangre llega a cada riñón por medio de una arteria renal que se va subdividiendo en ramas cada vez de menor calibre: arterias interlobares, arcuatas y por último corticales radiales. Cada arteria cortical radial durante su curso hacia la superficie renal emite una serie de arteriolas aferentes paralelas, en ángulo recto a sí misma; cada una de ellas se dirige a un glomérulo.

En condiciones normales, sólo un 20 % del plasma que llega al glomérulo se filtra de los capilares hacia el interior de la cápsula de Bowman. El resto de la sangre abandona el glomérulo a través de una sola arteriola eferente, que pronto se subdivide en un segundo grupo de capilares. Estos capilares peritubulares se distribuyen por todas las porciones del túbulo, al cual están íntimamente adheridos; esta disposición permite el movimiento de solutos y agua entre la luz del túbulo y los capilares. Después los capilares peritubulares se reúnen para formar las venas por las cuales sale la sangre del riñón (Beeuwkes, 1980).

APARATO YUXTAGLOMERULAR

El aparato yuxtaglomerular lo forma el área de la mácula densa, es decir, la porción

del final de la rama gruesa ascendente, situado en todas las nefronas entre las arteriolas aferentes y eferentes hacia el hilio del glomérulo de su propia nefrona (Barajas, 1979). Su localización y estructura se representa en las figuras 2 y 3.

Está formado por tres tipos de células:

- Células granulares: son células diferenciadas del músculo liso situadas en las paredes de las arteriolas, en particular, de las aferentes. Estas células son las que segregan la renina.
- Células mesangiales extraglomerulares: son similares morfológicamente a las células mesangiales intraglomerulares, pero su función es menos clara.
- Células de la mácula densa: Contribuyen a controlar la secreción de renina y la velocidad de filtración glomerular.

PROCESOS RENALES BASICOS

FILTRACIÓN GLOMERULAR

La membrana glomerular y la permeabilidad glomerular

El líquido que filtra a través del glomérulo hacia la cápsula de Bowman recibe el nombre de ultrafiltrado glomerular y se realiza a través de la membrana glomerular, cuya estructura ya se ha detallado.

El ultrafiltrado atraviesa tres capas distintas antes de entrar en la cápsula de Bowman, pero la permeabilidad de cada una de ellas es varios cientos de veces superior a la de las membranas capilares habituales, lo que determina la gran cantidad de filtrado glomerular que se forma con el tiempo. No obstante, a pesar de su gran permeabilidad, la membrana glomerular tiene una gran selectividad en función del tamaño de las macromoléculas que pasan a través de ella.

La permeabilidad de la membrana glomerular está condicionada en parte por los pesos moleculares de las sustancias: así, para un peso molecular de 5200 Da (Inulina) la permeabilidad es del 100 %, prácticamente como el agua. Sin embargo, de una proteína de

peso molecular 69000 Da sólo se filtra el 0.5 %. El peso molecular de la proteína plasmática más pequeña, la albúmina, es de 69000 Da, luego la membrana glomerular es prácticamente impermeable a todas las proteínas plasmáticas pero muy permeable al resto de las sustancias disueltas en el plasma normal.

Las razones básicas para la alta selectividad de la membrana glomerular son el tamaño y la carga de los poros. Los poros de la membrana son suficientemente grandes como para permitir el paso de moléculas con diámetros de hasta 8 nm. El diámetro molecular de la albúmina es 6 nm, algo menor que el tamaño de los poros. La albúmina no pasa por el segundo factor, ya que la membrana basal glomerular está recubierta por una red de proteoglicanos cargados negativamente. Las proteínas también tienen carga negativa. Así pues, la repulsión electrostática de las moléculas con las paredes de los poros evita prácticamente que todas las proteínas con peso molecular igual o mayor a 69000 pasen a su través. Otro factor que influye es la presión de perfusión, sobre todo cuando atendiendo a los factores anteriores la molécula estuviera en el límite de paso (Guyton, 1992).

Composición del filtrado glomerular

El filtrado glomerular tiene la misma composición que el líquido que se filtra desde el extremo arterial de los capilares hacia el líquido intersticial. No contiene hematíes y su concentración de proteínas es del orden de 0.03 %, es decir, unas 1/240 veces el contenido proteico del plasma.

La composición de electrolitos y otros solutos es muy parecida a la del líquido intersticial. Sin embargo, debido a la escasez de proteínas cargadas negativamente en el filtrado, el efecto Donnan determina que la concentración de iones negativos no proteicos, incluyendo el cloruro y el bicarbonato, sea un 5% superior en el filtrado glomerular que en el plasma; con respecto a los iones positivos, su concentración es aproximadamente un 5% inferior.

Por tanto, la composición del filtrado glomerular es la misma que la del plasma, excepto por la ausencia de proteínas de alto y medio peso molecular (Guyton, 1992).

Tasa de filtración glomerular (TFG)

La TFG se define como la cantidad de filtrado glomerular que se forma por minuto en todas las nefronas de ambos riñones.

Más del 95% del filtrado se reabsorbe normalmente en los túbulos y el resto se elimina en forma de orina (Vander, 1993).

Fuerzas participantes en el proceso de filtración glomerular

El proceso de filtración glomerular está condicionado por la suma neta de las diferentes fuerzas que se originan en los capilares glomerulares y en la cápsula de Bowman, y que son las siguientes (Vander, 1993):

- Presión hidrostática en el capilar glomerular (PCG): Es la presión media en los capilares glomerulares. Induce la filtración a través de la membrana glomerular.
- Presión hidrostática en la cápsula de Bowman (PCB): Es la presión que ejerce el líquido filtrado en la cápsula de Bowman. Se opone a la filtración.
- Presión oncótica de las proteínas en los capilares glomerulares (π CG): Debido a que la quinta parte del plasma que atraviesa los capilares se filtra hacia la cápsula de Bowman, la concentración de proteínas aumenta aproximadamente un 20% a medida que la sangre pasa desde el extremo arterial al venoso de los capilares glomerulares. Esta presión se opone a la filtración.
- Presión oncótica de las proteínas en la cápsula de Bowman (π CB): Favorece la filtración; sin embargo la concentración de proteínas en la cápsula de Bowman es tan pequeña que este factor es despreciable y se considera igual a cero.

Tasa de filtración glomerular por nefrona (TFGN)

La TFGN es la cantidad de filtrado glomerular que se forma en una nefrona por unidad de tiempo (Vander, 1993).

La presión efectiva de ultrafiltración (PEF) se define como la diferencia entre la presión que favorece la filtración (PCG) y las que se oponen (PCB y π CG).

$$PEF = PCG - (PCB + \pi CG)$$

El coeficiente de filtración (Kf), es el producto de la permeabilidad hidráulica de la membrana por el área disponible para la filtración. En función de estos factores, se define la TFGN:

$$TFGN = Kf \times PEF$$

Es decir, que la TFGN es directamente proporcional a la PEF, siendo Kf el coeficiente de proporcionalidad.

Por tanto, los factores de los que depende la TFGN son los siguientes (Vander, 1993):

- Kf: Si aumenta o disminuye la superficie glomerular por relajación o contracción de las células mesangiales del glomérulo, aumenta o disminuye respectivamente la TFGN.
- PCG: El aumento de presión arterial renal, la disminución de la resistencia arteriolar aferente y el aumento de la resistencia arteriolar eferente aumentan TFGN.
- PCB: El aumento de presión intratubular causado por obstrucción en los túbulos o en el sistema urinario extrarrenal disminuye TFGN.
- π CG: El aumento o disminución de la presión oncótica en el plasma modifica la TFGN.

REABSORCIÓN Y SECRECIÓN TUBULAR

El filtrado glomerular pasa a través de todo el segmento tubular. El epitelio tubular reabsorbe y secreta de forma selectiva distintas sustancias, de forma que el líquido que resulta de este proceso entra en la pelvis renal como orina.

El papel de la reabsorción es mucho mayor que el de la secreción en la formación de la orina, pero la secreción es muy importante para determinar las cantidades finales urinarias de potasio, hidrogeniones y algunas otras sustancias.

Habitualmente, más del 90% del agua contenida en el filtrado glomerular se reabsorbe a nivel tubular. De esta forma, si algunos de los solutos contenidos en el filtrado glomerular no se reabsorben en el trayecto tubular, la reabsorción de agua hace que se concentren de forma muy importante aumentando su concentración unas 99 veces. Por otra parte, algunos componentes del filtrado, como la glucosa, los aminoácidos y el sodio se reabsorben casi por completo, de forma que la concentración disminuye hasta ser prácticamente igual a cero en la orina. Así, los túbulos separan las sustancias que deben ser eliminadas por la orina de las que deben ser conservadas por el organismo sin perder una cantidad excesiva de agua (Guyton, 1992).

FUNCIONES DEL RIÑÓN

1. Regulación del equilibrio hidroeléctrico

La función primaria de los riñones es lograr un equilibrio entre el agua corporal y los iones inorgánicos para mantener estable la concentración de esas sustancias en el líquido extracelular, es decir, en el medio interno. Dicho equilibrio se logra mediante cambios en la composición de la orina excretada.

Algunas de las sustancias del medio interno reguladas en gran parte por los riñones son el agua, sodio, potasio, cloro, calcio, magnesio, sulfato, fosfato e ión hidrógeno.

No obstante, los riñones no son los únicos reguladores de las sustancias inorgánicas esenciales. Así, el equilibrio de oligoelementos como el zinc, el hierro o el calcio se regula mediante la absorción gastrointestinal de estos o controlando la secreción biliar. Sin embargo, también hay excreción renal de estos elementos, aunque sea mínima.

De igual manera, los riñones también participan en la regulación de algunos nutrientes orgánicos, como son la glucosa, aminoácidos, proteínas, urea, ácido úrico... (Vander, 1993).

2. Excreción de catabolitos

Consiste en retirar los productos metabólicos de la sangre y excretarlos por la orina. Entre estos productos de desecho que son eliminados se encuentran la urea (producida por el catabolismo de proteínas), el ácido úrico (catabolismo de ácidos nucleicos), la creatinina (metabolismo del músculo), la bilirrubina (desdoblamiento de la hemoglobina), metabolitos de hormonas...

Algunos de ellos son relativamente inocuos, pero la acumulación de otros cuando la función renal está dañada causa algunos de los trastornos de las funciones corporales observadas en las nefropatías graves (Vander, 1993).

3. Excreción de sustancias extrañas

Los riñones tienen otra función excretora general: eliminación de sustancias químicas extrañas, fármacos, pesticidas, aditivos de alimentos... (Vander, 1993).

4. Regulación de la presión arterial

Los riñones participan estrechamente en la regulación de la presión arterial mediante varios mecanismos:

□ Alteración de la excreción de sodio: el equilibrio del sodio es un factor determinante crítico del gasto cardíaco. El aumento del balance positivo de sodio aumenta el volumen extracelular. Cuando se acumula mucho líquido extracelular en el organismo la presión arterial aumenta debido al mayor volumen sanguíneo, que eleva la presión media de llenado circulatorio y el retorno venoso de sangre hacia el corazón. En consecuencia aumenta el gasto cardíaco y a su vez la presión arterial. De esta manera, cuando hay exceso de sal en el cuerpo, se incrementa la osmolaridad de los líquidos corporales, lo que conlleva a la ingesta de agua adicional para diluir la sal extracelular hasta su concentración normal. Así se incrementa el volumen de líquido extracelular y con él la presión arterial. El aumento de la osmolaridad del líquido extracelular estimula también la secreción de hormona antidiurética, que hace que el riñón reabsorba cantidades elevadas de agua de la orina, lo que contribuye también a aumentar el líquido extracelular.

Además, el equilibrio del sodio tal vez sea también un factor determinante de la resistencia arteriolar durante periodos prolongados (Knox y Granger, 1987; Guyton, 1992; Vander, 1993).

□ Sistema renina-angiotensina (SRA): el riñón funciona como glándula endocrina en el SRA, un complejo hormonal de enzimas, proteínas y péptidos importantes en la regulación de la presión arterial.

La renina es una enzima proteolítica segregada a la sangre por los riñones, específicamente por las células granulares del aparato yuxtaglomerular. Una vez en la corriente sanguínea la renina cataliza el desdoblamiento de la angiotensina I (Ag I), derivada de una proteína plasmática denominada angiotensinógeno, a su vez segregada por el hígado y casi siempre presente en el plasma en concentración elevada. La enzima convertidora de angiotensina (ECA) separa los dos aminoácidos terminales de la poco activa Ag I para producir la angiotensina II (Ag II), muy activa. En el plasma se encuentra una cierta cantidad de ECA, pero la mayor parte está en el endotelio de los vasos sanguíneos, en particular, en los capilares pulmonares. No obstante, como los riñones producen renina y el tejido renal también contiene angiotensinógeno y ECA, la reacción generadora de Ag I y II ocurre en cierta medida dentro de los riñones.

La Ag II ejerce muchos efectos sobre diversos tejidos, pero el objetivo final de gran parte de ellos es incrementar la presión arterial. Habitualmente el angiotensinógeno y ECA están presentes en el suero en concentración casi constante, por tanto, el determinante primario de la velocidad de formación de Ag II es la concentración plasmática de renina, fisiológicamente regulada por la secreción de la misma (Dzau y cols., 1988; Vander, 1993).

□ Otras sustancias vasoactivas: es muy probable que los riñones segreguen a la sangre o retiren de ella otras sustancias vasoactivas diferentes a la renina. Así, los riñones pueden sintetizar varios eicosanoides de acción vasodilatadora o vasoconstrictora. De la misma manera se segregan lípidos vasodilatadores (Vander, 1993).

5. Secreción de eritropoyetina

Los riñones segregan esta hormona relacionada con el control de la producción de eritrocitos en la médula ósea, siendo el estímulo de la producción la hipoxia de los riñones. La nefropatía puede reducir la secreción de la misma, con la consecuente producción de anemia (Vander, 1993).

6. Secreción de 1,25-dihidroxitamina D₃

Los riñones producen 1,25-dihidroxitamina D₃, la forma activa de la vitamina D, la cual interviene en el metabolismo del calcio (Vander, 1993).

7. Gluconeogénesis

Durante el ayuno prolongado los riñones sintetizan glucosa a partir de aminoácidos y otros precursores y la liberan a la sangre. Por tanto, el riñón es un órgano gluconeogénico (Vander, 1993).

INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA (IRC)

La IRC, a diferencia de la insuficiencia renal aguda (IRA), es una lesión renal de naturaleza mantenida que se caracteriza por no ser reversible y conducir a la destrucción progresiva de la masa de nefronas. Muchas formas de lesión renal progresan inexorablemente hacia IRC. La reducción de la masa renal funcionante produce hipertrofia estructural y funcional de las nefronas restantes, en las que además se produce aumento del flujo sanguíneo y del filtrado glomerular por nefrona debido a la disminución de la resistencia de las arteriolas, sobre todo de las aferentes. Esto puede ser el origen de un aumento de la presión capilar intraglomerular, y, en consecuencia, de la presión neta de filtración. La hipertrofia compensadora se debe a la hiperfiltración adaptativa. Sin embargo, en última instancia estas adaptaciones no son efectivas dado que predisponen a la esclerosis glomerular y a un aumento de la carga funcional sobre los glomérulos menos afectados que, a su vez, conducen a su destrucción final.

El volumen glomerular suele aumentar, así como la longitud y el diámetro de los túbulos, especialmente en el segmento túbulo proximal, lo que se acompaña de un aumento

de la reabsorción proximal, de manera que se mantiene un balance glomérulo-tubular. Con estos mecanismos adaptativos estructurales, el riñón es capaz de mantener un equilibrio normal de algunos solutos, incluso en fases avanzadas de la IRC, como ocurre con el agua, sodio y potasio. Sin embargo, con otras sustancias el riñón sólo puede llevar a cabo una regulación parcial, como sucede con el equilibrio ácido base y el fósforo.

Las causas más comunes de IRC son la glomerulonefritis, diabetes mellitus, y la hipertensión arterial. La IRC se acompaña de uremia, malnutrición, alteración del metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas, así como de defectuosa utilización de la energía (Esteller y Cordero, 1998).

La mayoría de las formas de IRC tienen en común la progresión hacia un estado final de fibrosis renal, la cual se caracteriza por la acumulación de matriz extracelular en el glomérulo (glomeruloesclerosis) y en el espacio túbulo-intersticial (fibrosis túbulo-intersticial). Muchos estudios sugieren que es la severidad de la fibrosis túbulo-intersticial la que mejor se correlaciona con el grado de daño renal producido y con el riesgo de progresión (Bohle y cols., 1996). La obstrucción ureteral unilateral (OUU) es un modelo experimental que produce fibrosis túbulo-intersticial en el riñón obstruido.

MODELO DE OBSTRUCCIÓN URETERAL UNILATERAL

El intersticio tubular (que ocupa el 80% del volumen renal) es la parte del riñón que más se ve afectada por los daños ocurridos en este modelo, ya que el glomérulo apenas es dañado, al menos en las primeras fases. La OUU produce fibrosis e inflamación en el intersticio tubular, así como apoptosis de las células tubulares. Muchos estudios indican que estos daños sufridos en el espacio túbulo intersticial después de la obstrucción ureteral, se correlacionan con una disminución en la TFG, y contribuyen a la progresión de la IRC (Striker y cols., 1970; Schainuck y cols., 1970).

FIBROSIS TÚBULO-INTERSTICIAL

La fibrosis túbulointersticial que se genera en el modelo experimental de OUU se debe al acúmulo de proteínas de la matriz extracelular en este espacio, en especial de colágeno, pero también otras como fibronectina y proteoglicanos. Mientras en el intersticio se acumulan colágenos de los tipos I, III y IV, en la membrana basal de las células tubulares se deposita mayoritariamente colágeno tipo IV. La deposición de estos componentes supone un incremento en el volumen intersticial (Kaneto y cols., 1994).

Las células tubulares renales son las responsables de la producción y deposición de colágenos, tanto en la membrana basal como en el intersticio. Además, los macrófagos y linfocitos T infiltrados segregan una serie de citoquinas que actúan como quimioatrayentes y estimulantes de la producción de fibroblastos. Estos fibroblastos también son capaces de producir colágenos. El incremento de colágenos tipos I, III, y IV encontrado en el intersticio del riñón obstruido, se relaciona por tanto con el aumento de celularidad, debida a la proliferación y migración de fibroblastos, así como a la infiltración de células mononucleadas (Kuncio y cols., 1991).

Sin embargo, los niveles de colágeno en los glómerulos no cambian tras la obstrucción ureteral, lo que confirma el hecho de que este modelo no produce lesiones glomerulares, y en el caso de que estas aparezcan son siempre secundarias a los daños túbulointersticiales (Kaneto y cols., 1994).

La fibrosis túbulointersticial generada en este modelo provoca la aparición de atrofia tubular por la pérdida progresiva de células epiteliales tubulares (Chevalier, 1996), así como una disminución en el número de capilares peritubulares. Como consecuencia de estos daños se desencadenan alteraciones en la función tubular.

INFLAMACIÓN DEL INTERSTICIO

La inflamación túbulointersticial que se genera tras la OUU es debida a la masiva infiltración de macrófagos y linfocitos (Klahr, 1998).

Los pocos macrófagos que hay en el riñón en condiciones normales están principalmente en los glomérulos de la corteza renal, mientras que en la médula no se aprecian prácticamente macrófagos residentes. Sin embargo, en un riñón que presenta obstrucción, las células mononucleadas (macrófagos y linfocitos) aparecen tanto en la corteza como en la médula renal (Schreiner y cols., 1988).

Las células más abundantes en el infiltrado de leucocitos son los macrófagos. Estos ya se detectan a las 4 horas de producirse la obstrucción, y su valor máximo aparece a las 24 horas. Las segundas células más abundantes son los linfocitos T citotóxicos. También se produce una pequeña infiltración de linfocitos B y de neutrófilos, así como de otros tipos de linfocitos T (Schreiner y cols., 1988). El infiltrado de macrófagos y de linfocitos T citotóxicos tiene que ser debido a una señal específica para ese proceso, ya que apenas se produce infiltración de otros tipos de leucocitos. No obstante, los factores involucrados en este proceso no están bien caracterizados (Klahr, 1998).

Se ha demostrado que el sobrenadante de la corteza renal de ratas con ligadura unilateral de uréter, tiene aumentada la actividad quimiotáctica para macrófagos de rata, respecto al sobrenadante del riñón contralateral. Esta actividad es termoestable y extraíble en metanol, por lo que probablemente se deba a un lípido (Rovin y cols., 1990).

Por otra parte, el péptido quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), que se expresa en el epitelio tubular, puede participar en la migración de macrófagos hacia el intersticio renal (Diamond y cols., 1994). Estos autores sugieren que el MCP-1 es liberado por una señal mecánica debida a la elevada presión intratubular que se produce tras la obstrucción ureteral.

Se han descrito otras muchas moléculas que se expresan en el intersticio tubular del riñón obstruido, y que pueden participar en la migración de macrófagos. Entre estas moléculas se encuentran, el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) (Kaneto y cols., 1993), la osteopontina (Diamond y cols., 1995), la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) y la molécula de adhesión de células vasculares-1 (VCAM-1) (Duan y cols., 1996).

Por otra parte, los macrófagos infiltrados en el riñón liberan mediadores de la inflamación, los cuales influyen en el comportamiento de las células intersticiales y

tubulares. De esta manera, estas células, así como los propios macrófagos generan una serie de mediadores como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), interleucina 1 (IL-1), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), TGF- β (Radeke y Resch, 1992), que son responsables de la proliferación celular y la expansión de la matriz extracelular, las cuales pueden derivar en la fibrosis intersticial característica de este modelo (Schlöndorff, 1995).

Si liberamos la obstrucción ureteral, el infiltrado desaparece lentamente, volviendo a niveles normales en algunos días. El contenido en macrófagos del intersticio cortical se incrementa moderadamente durante los dos primeros días después de la liberación, pero luego decrece hasta los niveles basales (Schreiner y cols., 1988).

APOPTOSIS

La apoptosis es la muerte celular programada (por contraposición a necrosis o muerte accidental) que media la eliminación de células en procesos de desarrollo y de conservación de la homeostasis funcional del organismo. Es un mecanismo desarrollado por los organismos pluricelulares que consiste en un “suicidio” celular genéticamente regulado. Presenta unas características morfológicas muy bien definidas que fueron las que inicialmente permitieron identificarlo y caracterizarlo.

El fenómeno consiste en una alta condensación, tanto del citoplasma como del núcleo, con aparición de protuberancias citoplasmáticas envueltas por la membrana. Estos cambios iniciales continúan con una fragmentación nuclear y citoplasmática, en forma de cuerpos apoptóticos envueltos por membrana nuclear que son rápidamente fagocitados por células especializadas (macrófagos), o en algunos casos, por las células adyacentes a la célula apoptótica. Como consecuencia final, la célula apoptótica desaparece sin dejar rastro alguno de su existencia previa (Kerr y cols., 1972).

Las células apoptóticas se caracterizan por presentar una reducción de su potencial mitocondrial, acidificación intracelular, producción de radicales oxidantes, proteólisis selectiva, degradación de la cromatina...(Cryns y Yuan, 1998).

Después de producirse la uropatía obstructiva se desencadena apoptosis de las células tubulares, aunque la señal que la induce no es bien conocida. Es posible que esta señal se deba a la exposición a radicales libres de oxígeno o a la disminución de agentes antioxidantes. La apoptosis de las células tubulares también puede ocurrir como consecuencia de la disminución de nutrientes, que resulta del descenso de la TFG, o por la ausencia de algunos factores de crecimiento u otras moléculas vitales debido al colapso ocasionado en las estructuras tubulares (Klahr, 1998).

También han sido descritos muchos factores y genes involucrados en la apoptosis. Un ejemplo de ello es el gen Fas. La unión de un ligando al producto del gen Fas induce apoptosis (Itoh y cols., 1991). El receptor del TNF α tiene una secuencia muy parecida a este producto del gen Fas, como ya se ha descrito anteriormente, por lo que se ha relacionado al TNF α con procesos apoptóticos. De igual manera son conocidos algunos protooncogenes (c-myc, c-fos, c-jun...) capaces de inducir apoptosis, e igualmente se han descrito otros que protegen frente a ella (bcl-2) (Savill, 1994).

La apoptosis también puede estar estimulada por la expresión incrementada de TGF- β , el cual es regulado por la activación del SRA (Chung y cols., 1995).

En este proceso de apoptosis tras la obstrucción ureteral, las células tubulares son fagocitadas y digeridas por células adyacentes o bien, son enviadas a la luz tubular (Gobe y Axelsen, 1987).

Se ha comprobado experimentalmente que la apoptosis en este modelo, tiene un pico máximo a los 25 días de la obstrucción aproximadamente, que luego empieza a decrecer. La apoptosis produce disminución en el peso seco del riñón y en el diámetro tubular, y participa en la atrofia tubular. Sin embargo en los glomérulos no se observa apoptosis en estos estudios (Truong y cols., 1996).

FISIOPATOLOGÍA DE LA OUU

La nefropatía obstructiva produce alteraciones importantes en la hemodinámica renal, en la filtración glomerular y en la función tubular (Klahr y Harris, 1992).

El principal efecto hemodinámico renal que se produce tras la OUU es una intensa vasoconstricción, la cual desencadena una reducción del flujo sanguíneo renal (FSR) así como de la TFG (Vaughan y cols., 1971; Harris y Yarger, 1974). La migración de macrófagos y linfocitos T al intersticio tubular en este modelo coincide con el declive de la TFG y del FSR.

Durante las primeras 2 o 3 horas después de practicar la ligadura del uréter, la presión intraureteral aumenta significativamente, y se transmite hacia los túbulos y la cápsula de Bowman, lo que hace aumentar considerablemente la PCB. Al mismo tiempo también se incrementa la PCG, lo que ayuda a mantener la TFG. El incremento en la PCG se debe a la vasodilatación de la arteriola aferente, que hace aumentar el FSR (Dal Canton y cols., 1977). Para explicar esta vasodilatación aferente se han propuesto varios mecanismos, entre los que se incluyen reflejos miogénicos directos, la regulación por la mácula densa y la liberación de hormonas vasodilatadoras, como las prostaglandinas (Nishikawa y cols., 1977; Morrison y cols., 1978; Yarger, 1991). Sin embargo, transcurridas 3-5 horas desde la operación, la TFG comienza a descender, debido a que el FSR también desciende. El FSR puede disminuir un 40-70% respecto a los valores basales (Moody y cols., 1975). Este efecto es debido en parte a la liberación de tromboxano A₂ (TXA₂), un potente vasoconstrictor. Se produce por la capacidad de metabolizar el ácido araquidónico que poseen los leucocitos infiltrados en el riñón obstruido, debido a que aumentan la actividad tanto de la tromboxano sintasa como de la ciclooxigenasa, enzimas que forman parte de la síntesis de TXA₂ (Klahr, 1998). Con la eliminación de los leucocitos infiltrados después de la ligadura del uréter, mediante la administración de algún fármaco como el enalapril o la L-arginina, disminuyen en parte los niveles de TXA₂ y aumentan el FSR y la TFG (Harris y cols., 1989).

Por tanto, la infiltración de leucocitos causa, al menos en parte, los cambios hemodinámicos ocurridos en el modelo de ligadura de uréter, que se producen por la disminución del FSR y de la TFG. No obstante, la eliminación de la infiltración leucocitaria del intersticio, no restaura el funcionamiento renal normal, debido a que también existen otros factores que contribuyen a disminuir el FSR y la TFG, como puede ser la producción de TXA₂ por parte de las células intrínsecas renales (Klahr, 1998). También debemos tener en cuenta que la activación del SRA es otro factor que contribuye a la vasoconstricción que se produce en este modelo (Pimentel y cols., 1993).

En estados más avanzados, la TFG disminuye debido a la destrucción del parénquima renal, que reduce el número de nefronas en funcionamiento (Esteller y Cordero, 1998).

MOLÉCULAS IMPLICADAS EN EL DAÑO RENAL

Los cambios estructurales producidos en el intersticio desencadenan la síntesis de numerosos factores por parte de las células tubulares (Eddy, 1996). La matriz extracelular está adherida a las células tubulares, lo cual le permite controlar la producción y acción de dichos factores, y a su vez estos factores pueden modificar la matriz (Brady y Adler, 1996). Algunas de estas moléculas son las siguientes(Klahr ,1998):

- Citoquinas: principalmente el TGF- β
- Proteínas: p53, p21 (WAF-1)
- Inhibidores de metaloproteinasas: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3
- Proteoglicanos: Biglicano y decorina
- Factor Nuclear κ B (NF- κ B)
- TNF- α
- Quimioatrayentes: MCP-1, Osteopontina
- Proteínas de adhesión: ICAM-1, VCAM-1, fibronectina
- Protooncogenes: c-fos, c-jun, jun B, c-myc, cH-Ras
- Factores de crecimiento: IL-6, Factor activador de las plaquetas (PAF), Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF).
- Componentes vasoactivos: Ag II, Angiotensinógeno, Endotelina, prostaglandinas, TXA₂.
- Proteínas de la matriz o de la membrana basal: Colágenos tipos I, III, IV.

ANGIOTENSINA II

El efecto hemodinámico principal de la Ag II en la circulación renal consiste en aumentar la resistencia de la arteriola eferente, manteniendo así la PCG. La Ag II también provoca contracción de las células mesangiales del glomérulo y juega un papel importante en la regulación de la presión vascular peritubular. Además tiene un papel clave en el tránsito de macromoléculas por el mesangio (Raij y Kerane, 1985). También es hipertrófica aunque no hiperplásica (Geisterfer y cols., 1988).

Aunque hay una conversión mayoritaria de Ag I en Ag II en el endotelio pulmonar, parece que el SRA intrarrenal es más importante en el control del volumen, ya que por su estratégica localización controla la perfusión renal.

En el riñón, la ECA se encuentra a nivel del aparato yuxtaglomerular y la arteriola eferente, donde la Ag II tiene su principal efecto vascular. En respuesta a baja presión de perfusión, la Ag II mantiene el tono arteriolar eferente.

La Ag II actúa a través de dos receptores de membrana llamados AT1 y AT2. La unión de la hormona a sus receptores produce una señal que altera la función celular, desencadenándose los efectos ya descritos. El receptor AT1 es más abundante en el riñón adulto, mientras que el AT2 predomina en riñones fetales y de animales neonatos (Kakuchi y cols., 1995). Aunque los receptores AT1 median en el riñón adulto la mayoría de las acciones de la Ag II, a través de los receptores AT2 se modifica también la función renal, ya que ellos controlan procesos como la natriuresis y la producción de GMPc en ratas sin sodio en la dieta (Siragy y Careym, 1996).

Tras la ligadura del uréter se activa el SRA, lo que conlleva a un incremento en los niveles de Ag II (Ishidoya y cols., 1995, 1996; Klahr y cols., 1995; Pimentel y cols., 1993). Esta hormona se comporta como un potente vasoconstrictor que produce, al menos en parte, los efectos hemodinámicos característicos del modelo: disminución del FSR y de la TFG. Además, la Ag II tiene acciones proliferativas sobre algunos tipos celulares, y está demostrado que regula la expresión de otros factores involucrados en la fibrosis, como el TGF- β 1 (Border y Noble, 1998), endotelina (Kohno y cols., 1992), TNF α (Klahr y Morrissey, 1998), PDGF (Johnson y cols., 1992) y el factor de crecimiento del endotelio (EGF) (Chevalier y cols., 1998) entre otros.

DECORINA

La expresión de decorina se incrementa en la corteza renal después de producirse la obstrucción ureteral (Diamond y cols., 1997). Esta proteína es capaz de unirse al TGF- β , inhibiendo así la actividad de éste. Cuando el TGF- β se libera de la unión a decorina vuelve a recuperar su actividad.

El desarrollo de fibrosis intersticial en este modelo, puede estar relacionado con la inducción fisiológica de decorina, y al mismo tiempo, su inducción farmacológica puede prevenir algunas de las acciones del TGF- β , por su capacidad de unirse a él e inactivarlo (Isaka y cols., 1996).

PROTEÍNAS 53 Y 21 (WAF-1)

Algunas patologías que requieren replicación o reparación del DNA dependen de la expresión de la p53 y al menos una de las dos proteínas dependientes de p53 (p21 y GADD45). La p53 está asociada con procesos de proliferación celular, reparación de DNA, mantenimiento de la integridad del DNA y regulación de la apoptosis (Hartwell y Kastan, 1994).

Se ha demostrado un aumento en la cantidad de RNAm de p53 y RNAm de p21 en el intersticio tubular, tras la ligadura del uréter (Morrissey y cols., 1996a), por lo tanto, durante la obstrucción ureteral los genes de p53 y p21 son activados. Además, TGF- β y p53 inducen la producción de p21, aunque lo hacen por mecanismos independientes.

TNF α

El TNF α es un péptido proinflamatorio producido por macrófagos y por células renales, para el que se han descrito dos receptores. La unión del TNF α a sus receptores provoca la activación de una serie de señales intracelulares que producen la expresión de

factores de transcripción, citoquinas, factores de crecimiento, moléculas de adhesión, mediadores de la inflamación... (Ortiz y cols., 1995).

En condiciones basales, el TNF α es más abundante en los glomérulos que en los túbulos de la corteza renal. Sin embargo, en ratas con obstrucción ureteral el RNAm de TNF α aumenta significativamente en los túbulos corticales, mientras que la cantidad en los glomérulos no varía respecto a las ratas en condiciones basales. Estos hechos indican que el TNF α es producido por las células tubulares renales tras la ligadura del uréter (Kaneto y cols., 1996).

El tratamiento con enalapril (IECA) en este modelo, reduce el incremento de RNAm TNF α hasta en un 40% en las primeras horas después de la operación, pero los niveles no se diferencian entre riñones de ratas con tratamiento y sin tratamiento después de unos días. Esto quiere decir que la Ag II contribuye, al menos en parte, al aumento temprano de TNF α en el riñón obstruido (Kaneto y cols., 1996).

Kaneto y cols. (1996) demostraron que el TNF α es producido por las células tubulares renales y no por los leucocitos infiltrados en el modelo de OUU. Ya en el intersticio, el TNF α estimula la producción de sustancias quimioatrayentes de macrófagos y provoca por tanto la migración de estos al intersticio renal.

La unión del TNF α a su receptor causa cambios metabólicos intracelulares que median procesos de muerte celular, tanto por apoptosis como por necrosis (Laster y cols., 1988). Los mecanismos por los que se produce esta acción no están claros, pero se han encontrado muchas similitudes entre el receptor de TNF α y el receptor del antígeno Fas, el cual es un mediador de la apoptosis (Itoh y cols., 1991). Por eso se sugiere que el incremento de TNF α en el riñón obstruido induce la apoptosis que se produce en las células tubulares, causando por tanto el consecuente daño tubular.

NF- κ B

El NF- κ B participa en la regulación de la transcripción de algunos genes en diversos tejidos, entre ellos el riñón. (Baeurle y Henkel, 1994). Se localiza en el citoplasma celular, formando un complejo con un inhibidor (I κ B). Esta forma latente se disocia dando

lugar a la forma activa de NF- κ B. Algunos compuestos, como el TNF- α o los lipopolisacáridos favorecen esta disociación y la translocación de la forma activa al núcleo, donde se une a secuencias de DNA de los promotores de algunos genes, provocando una respuesta inmune o inflamatoria (Barnes y Karin, 1997).

Está demostrado experimentalmente que el NF- κ B se activa tras la obstrucción ureteral (Wendt y cols., 1995) y que la administración de enalapril o de antagonistas de receptores de AT1 o AT2 disminuyen significativamente esta activación (Klahr y Morrissey, 1997). Por eso se cree que la infiltración de macrófagos mediada por Ag II depende en parte de la activación del NF- κ B, el cual regula la síntesis de MCP-1 (Klahr, 1998).

El NF- κ B también regula la síntesis de otras proteínas como TNF α , algunas interleuquinas, óxido nítrico sintasa inducible, ciclooxigenasa-2, moléculas de adhesión... Por todo ello se considera que el NF- κ B puede participar activamente en la fibrosis túbulointersticial que se produce en este modelo (Klahr, 1998).

Por otra parte se conoce que la transcripción de angiotensinógeno en el hígado se incrementa con TNF- α y con NF- κ B. Este control permite regular la concentración de angiotensinógeno en sangre, la cual determina los niveles de Ag II (Brasier y cols., 1996).

TGF- β

El TGF- β es el prototipo de una superfamilia de factores de crecimiento y diferenciación que se encuentran presentes en una gran variedad de organismos, desde los insectos hasta los humanos (Massagué, 1990; Roberts y Sporn, 1990). Se trata de una citoquina multifuncional segregada por muchos tipos de células y que participa en diversos procesos celulares, como son el desarrollo embrionario, la regeneración y reparación de tejidos, la inflamación, la activación de proteasas, apoptosis y otras funciones (Massagué, 1990).

Se han descrito cinco isoformas distintas para TGF- β , de las cuales tres (TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3) se han encontrado en todos los tejidos de mamíferos. El gen para

cada isoforma está localizado en un cromosoma distinto y tienen diferentes secuencias para regular su expresión (Massagué, 1990).

El TGF- β 1 se sintetiza como un precursor que se libera en la superficie de las células y en la matriz extracelular. Esta forma latente se rompe en dos subunidades, siendo una de ellas el TGF- β activo. La forma activa es una proteína dimérica compuesta por dos subunidades unidas entre sí por un puente disulfuro (Massagué, 1990).

El TGF- β está considerado como la citoquina con mayor poder para estimular la fibrogénesis, porque participa en los siguientes procesos:

- Incrementa la síntesis y deposición de componentes de la matriz extracelular, como colágenos, fibronectina, elastina, ácido hialurónico, proteoglicanos... (Igotz y cols., 1986, 1987; Massagué, 1990; Creely y cols., 1992).
- Disminuye la síntesis de metaloproteinasas (enzimas que degradan las proteínas de la matriz extracelular), y por lo tanto inhibe la degradación de los componentes de la matriz (Edwards y cols., 1987; Massagué, 1990).
- Incrementa la actividad de los inhibidores de metaloproteinasas (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3), otra forma de inhibir la degradación de los componentes de la matriz (Edwards y cols., 1987; Massagué, 1990).
- Regula la expresión de factores de adhesión.
- Se comporta como quimioatrayente de macrófagos y fibroblastos (Postlewaite y cols., 1987; Roberts y Sporn, 1988) y estimulante de la proliferación de fibroblastos (Kaneto y cols., 1993).
- Estimula la síntesis de integrinas (familia de receptores de membrana heterodiméricos que permiten a la célula el reconocimiento de moléculas específicas de la matriz extracelular o de otras células) implicadas en el control del ensamblaje de la matriz extracelular.

Todos estos mecanismos contribuyen a la acumulación de proteínas de la matriz extracelular en el intersticio, lo que desencadena la fibrosis.

En varios modelos experimentales de fibrosis renal se ha demostrado la sobreexpresión de TGF- β (tanto RNAm, como proteína) y el RNAm de sus receptores tipo I y II (Border y Noble, 1993). Además, la administración de anticuerpos anti-TGF- β (Border y cols., 1990) o la transfección con decorina (molécula que une TGF- β inactivándolo) (Border y cols., 1992; Isaka y cols., 1996) hace mejorar el daño producido en la fibrosis, lo que demuestra la participación de esta molécula en los procesos fibrogénicos.

Se ha comprobado experimentalmente (Kaneto y cols., 1993) que tras la ligadura unilateral de uréter los niveles de RNAm de TGF- β se incrementan significativamente, y sin embargo los niveles en el riñón contralateral no aumentan, comparándolos con ratas control no operadas. Pimentel y cols. (1995) demostraron que la expresión de las isoformas de TGF- β en este modelo es tiempo-dependiente, de tal manera que el TGF- β 2 se incrementa principalmente en la obstrucción ureteral aguda, mientras que el TGF- β 1 y TGF- β 3 lo hacen fundamentalmente en la obstrucción crónica. Todos estos datos indican que el TGF- β producido por las células tubulares y los fibroblastos intersticiales del riñón obstruido, puede desencadenar en parte la fibrosis túbulointersticial. Además, el incremento de RNAm TGF- β es debido a la Ag II, ya que la administración de un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) reduce los niveles de TGF- β en este modelo. Diamond y cols. (1994) sugirieron que, además de las células tubulares y los fibroblastos, las células mononucleadas infiltradas en el riñón ligado también producían TGF- β 1.

Receptores de TGF- β

El sistema de receptores de TGF- β está compuesto por:

□ Receptores tipos I y II (serina-treonina quinasas): son proteínas transmembrana que están involucrados en la transducción de la señal, por lo que también se los conoce como receptores señalizantes de TGF- β . Datos bioquímicos y genéticos han demostrado que la señal que produce el TGF- β ocurre a través de un complejo formado por los receptores de tipo I y II (Attisano y cols., 1996; Chen y Weinberg, 1995; Wrana y cols.,

1994). De esta manera, el TGF- β inicia la secuencia de señales cuando se une al receptor tipo II, en la superficie celular. Esta unión permite el reclutamiento del receptor tipo I por parte del receptor II, formándose así el complejo de receptores. A continuación el receptor II, que tiene actividad quinasa, fosforila al receptor I en dos residuos de serina y treonina (Wieser y cols., 1995; Wrana y cols., 1994). Esta activación del receptor permite el reclutamiento de unas proteínas diméricas citosólicas conocidas como Smad (*Drosophila* gene Mothers against dpp-related), las cuales son fosforiladas por el receptor I en un residuo de serina (Raftery y cols. 1995). La fosforilación permite a estas proteínas liberarse del complejo de receptores y formar otro complejo homomérico o heteromérico, con otra proteína Smad (Chen y cols, 1996; Lagna y cols., 1996; Zhang Y y cols., 1996). El complejo se dirige hacia el núcleo, donde se unen a secuencias de DNA activando o inhibiendo promotores de genes (Macías-Silva y cols., 1996; Baker y Harland, 1996). Esto desencadena las acciones del TGF- β , entre ellas el aumento en la producción de colágenos o la inhibición de las metaloproteinasas.

Se ha demostrado que en la fibrosis renal no sólo se incrementan los niveles de TGF- β 1 y su proteína, sino que la expresión de RNAm para los receptores I y II también se ve aumentada (Border y Noble, 1993).

□ Receptor tipo III o betaglicano: Este proteoglicano es un receptor no señalizante. El betaglicano actúa en la membrana como un presentador del TGF- β a los receptores señalizantes, formando complejo con el receptor II en presencia de dicha citoquina y aumentando los efectos que ésta induce en las células. Esta potenciación de la actividad se hace especialmente evidente en el caso de la isoforma TGF- β 2, que es unida por el receptor II con menor afinidad (López-Casillas y cols., 1993).

□ Endoglina: Se trata de una glicoproteína homodimérica de membrana que actúa como receptor no señalizante, pero su papel en la señal que produce el TGF- β al unirse al receptor señalizante no está claro. Es sobreexpresada en las células endoteliales y puede modular la acción del TGF- β en algunos tipos de células (Lastres y cols.,1996).

LA ENDOGLINA

La endoglina, también conocida como CD105, es una glicoproteína homodimérica de membrana que tiene un peso molecular de 180 kD y que pertenece al sistema de receptores del TGF- β . Se trata de un receptor no señalizante, y aunque su papel en la señal que desencadena el TGF- β no está bien definido, se sabe que puede modular la acción del TGF- β en algunos tipos de células (Lastres y cols., 1996).

Se expresa en las células endoteliales humanas (Gougos y Letarte, 1988), macrófagos (Lastres y cols., 1992), células del músculo liso vascular (Adam y cols., 1998), células mesangiales (Rodríguez-Barbero y cols., 2001) y fibroblastos (St Jackes y cols., 1999).

El gen que codifica para endoglina se ha identificado como causa de una alteración vascular conocida como telangiectasia hemorrágica hereditaria tipo 1 (HHT1) (McAllister y cols., 1994). HHT1 es una displasia vascular autosómica dominante asociada con frecuentes epistaxias, sangrados gastrointestinales, telangiectasias y malformaciones arteriovenosas en cerebro, pulmón e hígado, así como anomalías en los capilares a nivel microscópico (Guttmacher y cols., 1995; Shovlin, 1997; Marchuk, 1998). No se conoce la función específica de la endoglina, responsable de la displasia vascular en HHT1, pero es probable que esté relacionada con la vía de señalización del TGF- β , ya que la endoglina forma parte del complejo de receptores de membrana de esta citoquina. Además, mutaciones en el gen de un receptor tipo I de TGF- β (ALK 1) produce alteraciones similares (HHT2) (Johnson y cols., 1995). Los síntomas de la enfermedad indican que la función de la proteína podría estar muy relacionada con los procesos de angiogénesis y remodelación tisular (van de Kerkhof y cols., 1998; Wang y cols., 1995; Ohta y cols., 1997), de los que el TGF- β es un potente regulador.

La endoglina tiene una secuencia bastante homóloga a la del betaglicano, sin embargo sus formas de unión específica y distribución son muy diferentes (Cheifetz y cols., 1992). Se une a las isoformas TGF- β 1 y TGF- β 3 y se conoce que forma complejos heteroméricos con los receptores tipos I y II de TGF- β (Yamashita y cols., 1994; Barbara y cols., 1999). La endoglina no está involucrada en la transducción de la señal, pero probablemente participe en la presentación del TGF- β , por lo que podría actuar como un modulador de las interacciones de la citoquina con sus receptores señalizantes (Cheifetz y cols., 1992). Además, la endoglina humana contiene una secuencia en el dominio

extracelular que reconoce a numerosas proteínas de la matriz extracelular y les permite su unión con sus receptores específicos (Gougos y cols., 1992).

La endoglina se ha encontrado en riñones normales (Quackenbush y cols., 1986) y se ha detectado en altos niveles en biopsias de pacientes con insuficiencia renal crónica (Roy-Chaudhury y cols., 1997). También se ha demostrado la sobreexpresión de endoglina en riñones de ratas con fibrosis renal inducida por reducción de la masa renal (Rodríguez-Peña y cols., 2001).

OBJETIVOS

Con este trabajo nos propusimos los siguientes objetivos:

1.- Analizar la función renal y hemodinámica en la rata tras un proceso de fibrosis túbulo-intersticial, como es la OUU.

2.- Evaluar la producción de fibrosis túbulo-intersticial en la rata, cualitativa y cuantitativamente, así como a través de la expresión de moléculas profibrogénicas y componentes de la matriz extracelular, tras la OUU.

3.- Valorar la expresión de endogлина en un modelo de fibrosis túbulo intersticial y su relación con el TGF- β 1 y los componentes de la matriz extracelular, con la finalidad de analizar el papel de esta molécula en la producción de fibrosis renal.

MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN: DIETA Y CONDICIONES AMBIENTALES

Este trabajo ha sido realizado con ratas Wistar macho de 250-300 gramos de peso aproximadamente y procedentes del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca. Los animales fueron alimentados a base de una dieta estandarizada (*Panlab*), cuyo análisis es el siguiente:

| | |
|--------------------------|--------|
| ▪ Proteína bruta | 15.60% |
| ▪ Materias grasas brutas | 2.80% |
| ▪ Celulosa bruta | 4.80% |
| ▪ Cenizas brutas | 4.60% |

Los ingredientes de esta dieta incluyen granos de cereales, semillas oleaginosas, productos de panadería y de fabricación de pastas alimenticias, productos de pescado y minerales. Además se añadieron como aditivos cobre (sulfato cúprico pentahidratado) y las vitaminas A, D3 y E (tocoferol).

Durante el periodo experimental, los animales se mantuvieron en jaulas de 50 x 28 cm. En cada jaula se colocaron como máximo cuatro animales, donde tenían libre acceso a comida y agua.

Las condiciones ambientales se mantuvieron constantes: la temperatura fue de unos 20°C, la humedad del 60% aproximadamente, y el tiempo diario de luz (fotoperiodo) de 12 horas.

El material y los métodos experimentales empleados con los animales de laboratorio se aplicaron de acuerdo a las condiciones para la ética en tratamiento y experimentación dictadas por el Consejo de Europa (Diario Oficial N°. L358/1-358/6, 18 de diciembre de 1986) y por el Gobierno Español (BOE n° 67: 8509-8512, 18 de marzo de 1988; BOE n° 256:31349-31362, 28 de octubre de 1990).

GRUPOS EXPERIMENTALES

En el diseño del estudio se plantearon estos dos grupos experimentales:

1. Obstrucción ureteral unilateral (OUU): Ratas con ligadura del uréter izquierdo.

2. Simulación quirúrgica (SQ): Ratas con simulación quirúrgica de ligadura del uréter izquierdo (el procedimiento es similar que en las ratas con ligadura de uréter, pero sin llegar a ligar el mismo).

Cada uno de estos grupos se dividió en cuatro subgrupos, según el tiempo de duración del experimento desde la OUU (1, 3, 10 y 17 días). El número de animales (n) en cada subgrupo se indica en la siguiente tabla:

| <i>Grupo</i> | Basal | Día 1 | Día 3 | Día 10 | Día 17 |
|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------|
| SQ | n=16 | n=4 | n=4 | n=4 | n=4 |
| OUU | n=20 | n=4 | n=4 | n=6 | n=6 |

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL DE OUU

ANESTESIA

Los animales se anestesiaron con 2,2,2-tribromoetanol (*Sigma-Aldrich*), vía intraperitoneal. Con este fin, se preparó una disolución de anestésico en solución salina al 0.9% (1g de 2,2,2-Tribromoetanol /40 mL de solución salina). Esta disolución se mantuvo a 30-40°C, ya que es ésta la temperatura a la que ejerce su acción, y se inyectó a cada animal 1mL/100g de peso, siendo esta la dosis anestésica. El 2,2,2-tribromoetanol se caracteriza por su rápida acción, así como por la temprana recuperación postoperatoria.

PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO

Se fijó el animal a una tabla-quirófano y se peló y afeitó el campo operatorio. Durante todo el proceso se mantuvo junto al animal una lámpara, con objeto de mantener la temperatura corporal. En este punto se practicó un pequeño corte en la porción abdominal, suficiente como para poder localizar el uréter izquierdo. Una vez localizado y limpiado, se ligó con una sutura no absorbible (4-0) y en dos puntos, con el fin de que resultara prácticamente imposible la pérdida de la ligadura. A continuación se cerró el abdomen por planos. Todo este proceso se realizó en condiciones asépticas.

En las ratas con SQ el procedimiento fue similar (afeitado, apertura abdominal, localización y limpieza del uréter...), pero sin llegar a practicar la ligadura.

ESTUDIOS FUNCIONALES *IN VIVO*

MEDIDA DE PRESIÓN ARTERIAL Y FRECUENCIA CARDIACA

La presión arterial, así como la frecuencia cardiaca de los animales fueron determinadas en el estado basal (antes de comenzar el experimento) y en el día del estudio: 1º, 3º, 10º o 17º después de la OUU.

Se llevó a cabo mediante un método no invasivo, utilizando para ello un esfigmomanómetro digital (*Letica 5000-5100*). El funcionamiento del esfigmomanómetro consiste en mantener la rata despierta, pero inmovilizada en un cepo y en un ambiente cálido. A continuación se le coloca en la cola un cilindro que confiere presión, seguido de un transductor que registra el pulso. El sistema va aumentando la presión hasta que detecta la presión sistólica (PAS), instante en el que el pulso se para. En este momento empieza la presión a descender hasta que se detecta la presión diastólica (PAD), y sigue descendiendo hasta llegar a presión cero. La presión arterial media (PAM) se calcula en función de la sistólica y la diastólica por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{PAM} = (2 \times \text{PAD} + \text{PAS}) / 3$$

Con este sistema también se detectó la frecuencia cardíaca, en pulsos por minuto.

Esta técnica requiere haber acostumbrado al animal tanto al cepo como a la manipulación de su cola, por lo tanto se hicieron simulacros para acostumbrar al animal los días anteriores a la determinación. Para dar por válida una medida, ésta debe reproducirse al menos cinco veces consecutivas. A continuación se tomó la media de los valores obtenidos.

OBTENCIÓN DE SANGRE Y DETERMINACIONES EN PLASMA

Se obtuvieron muestras de sangre, tanto en el estado basal como en los días 1°, 3°, 10° o 17° del experimento, de la punta de la cola en capilares heparinizados (*Reflotrón 9550532*). Se extrajeron cuatro capilares por cada rata, y después de sellar uno de los extremos con plastilina, se introdujeron en el frigorífico con el fin de que ésta se endureciera y así no perder el plasma en el centrifugado. Transcurridos unos cinco minutos, centrifugamos los capilares en una microfuga (*4224 Centrifuge, ALC*) a 5000 rpm durante cinco minutos.

HEMATOCRITO

Después de centrifugar, determinamos el hematocrito (Hcto) mediante el uso de una regla. Para ello medimos la longitud de capilar ocupada por células sanguíneas (Lc) así como la longitud total (Lt) ocupada por la muestra de sangre (células y plasma). Con estos dos parámetros calculamos el hematocrito de la siguiente forma:

$$\% \text{ Hcto} = (\text{Lc} / \text{Lt}) \times 100$$

Se tomó como hematocrito el valor resultante de hacer la media de los cuatro capilares extraídos.

EXTRACCIÓN DEL PLASMA

Una vez calculado el hematocrito, se rompieron los capilares, con la ayuda de una lima, por el límite células-plasma. Se extrajo el plasma y se guardó en tubos *Eppendorf* a -20°C hasta la determinación de creatinina.

CREATININA EN PLASMA

Utilizamos la creatinina endógena plasmática porque tiene una estrecha correlación con el aclaramiento renal de creatinina, es decir, valores altos de creatinina en plasma nos indican un bajo aclaramiento renal de creatinina.

A su vez, el aclaramiento de creatinina nos es útil para determinar la TFG, dado que la creatinina es una sustancia que sólo es manejada por el riñón, es endógena y no sufre ningún proceso tubular. De esta manera:

$$TFG = (FU \times Co) / Cp = Clc$$

Siendo Clc el aclaramiento de creatinina (mL/min); FU el flujo urinario (mL/min); Co , la concentración de creatinina en orina (mg/mL); y Cp , la concentración de creatinina en plasma (mg/mL).

Por lo tanto, a través de la determinación de creatinina plasmática tenemos una idea aproximada de la TFG.

Para la determinación de creatinina en plasma utilizamos un método colorimétrico basado en la reacción de Jaffé (Bonsnes y cols., 1945). La creatinina forma derivados rojizos en presencia de soluciones picrato-alcálicas cuya absorbancia tiene su máximo a una longitud de onda de 510 nm.

Previamente a la determinación de creatinina en plasma, las muestras fueron desproteinizadas con ácido tricloroacético (TCA) al 5 %. Para ello, 50 µL de plasma se mezclaron con 150 µL de TCA y se centrifugaron a 4000 rpm durante 20 minutos. La creatinina se midió a continuación en el sobrenadante.

Los reactivos utilizados fueron los siguientes:

- Picrato sódico (35 mg/mL)
- Hidróxido sódico (21 mg/mL)
- Agente ácido: ácido succínico (36 mg/mL), ácido cítrico (150 mg/mL), ácido clorhídrico (60 mL/L)

Para la determinación analítica se siguió el siguiente protocolo:

Se mezclaron 100 μ L de picrato sódico, 20 μ L de hidróxido sódico y 100 μ L de plasma. Los tubos se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se paró la reacción con 280 μ L de agua destilada y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (*Spectronic 301, Mylton Roy Company*).

Tras esta primera lectura, se añadieron 20 μ L de agente ácido, se incubó durante 10 minutos y se realizó una segunda lectura. Este paso se realiza porque en el plasma hay otros componentes (X) que forman complejo con el picrato de igual forma que la creatinina. Con la adición de un agente ácido el pH desciende, desapareciendo el complejo creatinina-picrato, mientras que los otros constituyentes del plasma mantienen su color derivado del complejo X-picrato. La diferencia entre la absorbancia de la segunda lectura y la de la primera es proporcional a la concentración de creatinina en el plasma.

La concentración de creatinina se obtuvo por extrapolación en una recta patrón obtenida con creatinina pura (*Merck*) y realizada en las mismas condiciones de medida que las muestras.

PROTEÍNAS EN PLASMA

La determinación de proteínas en plasma se realizó en un refractómetro (*American Optical Corporation, Scientific instrument division*). Manteniendo el instrumento en posición horizontal, se colocó la muestra en la porción correspondiente al prisma de medida, y el líquido fue extendido entre los dos prismas por acción capilar. Para la lectura, presionamos el plástico que cubre y miramos frente a la luz. Leyendo en la escala que se puede ver en el interior del aparato obtenemos la cantidad de proteínas en la muestra de plasma en mg/100mL.

PERFUSIÓN Y EXTRACCIÓN DE ÓRGANOS

Al final del periodo experimental (1, 3, 10 o 17 días después de la operación quirúrgica) los animales se anestesiaron con éter etílico y se perfundieron con solución salina heparinizada a 37°C a través de la aorta, a nivel de la bifurcación ilíaca, para eliminar la sangre de los riñones.

Se extrajeron los riñones, y después de pesarlos, se seccionaron sagitalmente en dos mitades: La primera, destinada a los estudios histológicos e inmunohistoquímicos, se fijó con formaldehído tamponado al 4% durante 24 horas. La segunda se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido y se guardó a -80°C para realizar después los estudios de biología molecular (Northern y Western blot).

También se extrajeron los pulmones de los animales, que se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C para realizar posteriormente los estudios de Western blot.

ESTUDIOS HISTOLÓGICOS

Los tejidos se deshidrataron en etanol de gradación creciente hasta el alcohol etílico absoluto y posteriormente en xileno. Después de la deshidratación se incluyeron en parafina en una estufa a 60°C durante 24 horas obteniéndose bloques que se cortaron con un microtomo (*Micron HM-310, Walldorf*). Para la posterior tinción con tricrómico de

Masson y los estudios inmunohistoquímicos se cortaron secciones de 3 μm de grosor y para la tinción de rojo sirio de 5 μm . Tras depositarse los cortes en portaobjetos de vidrio, se efectuaron las tinciones.

Los estudios histológicos se llevaron a cabo en los animales de 17 días.

MORFOLOGÍA: TINCIÓN CON TRICRÓMICO DE MASSON

Para el análisis morfológico semicuantitativo por microscopía óptica se utilizó la tinción con tricrómico de Masson. El procedimiento técnico fue el siguiente:

Los cortes se desparafinaron e hidrataron. Se mantuvieron durante una noche en líquido de Bouin (750 mL de solución acuosa saturada de ácido pícrico (al 1-2% en agua destilada), 250 mL de formalina concentrada (40% de formaldehído con un 60% de metanol) y 50 mL de ácido acético glacial, pH 2.2). Se lavaron los cortes con agua destilada hasta la desaparición del color amarillo. A continuación se tiñeron con hematoxilina férrica de Weigert (0.5 g de hematoxilina cristalizada, 0.75 g de cloruro férrico, 1 mL de ácido acético glacial en 100 mL de agua) durante 10 minutos. De nuevo se lavaron las preparaciones con agua destilada y se tiñeron con la solución escarlata de Biebrich-fucsina ácida (90 mL de Escarlata de Biebrich (C.I. 26905) al 1 % en agua destilada, 10 mL de fucsina ácida en solución acuosa al 1 %, 1 mL de ácido acético glacial) durante 2-5 minutos. Se lavaron con agua destilada y, durante 10 minutos, se tiñeron con una solución acuosa de ácido fosfotúngstico al 5 %. A continuación se tiñó con solución de verde luz (light green) al 2% (99 mL de agua destilada, 2 g de verde luz SF amarillento (C.I. 42095) y 1 mL de ácido acético glacial). Los cortes así teñidos se lavaron y se diferenciaron con ácido acético al 1 % durante 3-5 minutos. Después de la deshidratación, se montaron las preparaciones y se almacenaron hasta su observación.

Para realizar los estudios morfológicos, los portaobjetos se codificaron y se examinaron al microscopio óptico de forma que no se conocía el grupo al que pertenecía cada muestra.

MORFOMETRÍA: TINCIÓN CON ROJO SIRIO

Para la cuantificación de la fibrosis renal mediante análisis de imagen, las preparaciones se tiñeron con rojo sirio (García del Moral, 1993), cromógeno específico para el tejido conectivo. El procedimiento técnico fue el siguiente:

Los cortes se desparafinaron, se hidrataron y, a continuación, se lavaron durante 10 minutos con agua corriente. Para preparar la solución de rojo sirio se mezclaron 10 mL de rojo sirio (C.I. 35780) con 90 mL de una solución saturada de ácido pícrico (para garantizar la saturación es conveniente que queden restos de ácido pícrico sin disolver) y se la dejó reposar durante 48 horas, efectuándose posteriormente la tinción con la solución de rojo sirio durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los portos se mantuvieron durante 5 días en etanol absoluto, se aclararon y se montaron. Es necesario esperar unas 48 horas antes de manipular la preparación.

Se eligió esta técnica para el estudio cuantitativo de la fibrosis porque presenta las siguientes ventajas:

- El rojo sirio es un cromógeno que tiñe las fibras de colágeno, componente fundamental del tejido conectivo.
- Se facilita el aislamiento del glomérulo, ya que rodeando a la cápsula de Bowman existe una pequeña cantidad de fibra que se tiñe con rojo sirio, de tal manera que el glomérulo queda, en la mayoría de los casos, bien delimitado.
- Los núcleos no se contrastan, con lo que se evitan interferencias en la cuantificación.
- Es una técnica fácilmente reproducible, lo que permite obtener preparaciones uniformes y por tanto comparables.

Para la evaluación de las imágenes utilizamos un sistema de análisis informatizado (Masseroli y cols., 1998) con un *software* específico (*Fibrosis HR[®]*, *Master Diagnóstica, Granada*). El sistema consta de los siguientes elementos:

- Dispositivo de captación de imágenes (videocámara de alta resolución *Sony*, modelo *CCD-iris*).
- Procesador digital que la transforma para hacer asequible su manejo por un sistema informático (*CPU 486 DX-100 MHz*).
- Dispositivo de presentación de la imagen (monitor de alta resolución, *Sony*)
- Sistema de almacenamiento y/o de transmisión de imágenes (*CPU 486 DX-100 MHz*).
- Ordenador para ejecutar los programas de análisis y manipular las imágenes hasta obtener los resultados previstos (*CPU 486 DX-100 MHz*).

Sobre los portaobjetos, codificados y teñidos con rojo sirio, se capturaron imágenes con la videocámara conectada a un microscopio óptico (*Leitz Laborlux S*) con un objetivo 20x, utilizando un filtro óptico verde (*IF 550*) para aumentar el contraste. Se procesaron un total de 25 corpúsculos y 15 campos intersticiales por cada portaobjetos.

El rojo sirio tiñe casi exclusivamente las fibras colágenas, componente fundamental de la matriz extracelular. El programa, tras restar el color del fondo, transforma automáticamente las imágenes en 256 tonos de grises, seleccionando los que corresponden a tinción con rojo sirio y cuantifica estos elementos de las imágenes. En el caso de las imágenes glomerulares, es necesario aislar el área corpuscular, indicando en el monitor donde está localizado el glomérulo. Después el programa discrimina el área del corpúsculo renal, ya que la cápsula de Bowman está normalmente rodeada por una pequeña cantidad de tejido conjuntivo marcada por el colorante. Los valores que se obtienen de cada imagen son los siguientes:

- En las imágenes glomerulares:
 - a) área corpuscular total en μm^2
 - b) área mesangial en μm^2
- En las imágenes intersticiales:
 - c) fibrosis intersticial total en μm^2

Los valores obtenidos en el análisis morfométrico se exportaron a un programa cálculo informático (*Microsoft Excel 9.0 para Windows*[®]).

Para evaluar la variabilidad del método, una misma imagen glomerular se captó y se procesó 20 veces por un mismo experimentador. Los coeficientes de variación para los distintos parámetros analizados fueron: área corpuscular, 0.19%; área mesangial, 1.52%; fibrosis intersticial, 0.78%.

INMUNOHISTOQUÍMICA

La expresión de colágeno I, TGF- β , y endoglina en los riñones de los animales de 17 días se detectó mediante estudios inmunohistoquímicos. El procedimiento técnico fue el siguiente:

Los cortes se desparafinaron y se hidrataron. Posteriormente se lavaron con agua destilada durante 5 minutos y a continuación se realizó una digestión automática de 20 minutos con pepsina a 37°C y se lavó con solución salina tamponada con fosfatos (PBS) 5 minutos. Para inhibir la peroxidasa endógena se utilizó agua oxigenada al 3% durante 10 minutos y nuevamente se realizó un lavado de 5 minutos con PBS. A continuación se incubaron los cortes una hora con suero bloqueante diluido 67 veces, con el fin de que no tuviera lugar un marcaje inespecífico. Se retiró el exceso de líquido que pudiera quedar en las preparaciones y se incubaron durante una hora con el anticuerpo primario. Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes:

- Colágeno I: anticuerpo policlonal de conejo (*Chemicon Int. Inc. CA, USA*)
- TGF- β 1: anticuerpo policlonal de conejo (*Sta Cruz Biotechnology, CA, USA*)
- Endoglina: anticuerpo policlonal de conejo (Raab y cols., 1999)

Se realizó otro lavado de 5 minutos con PBS, y acto seguido los cortes se incubaron durante 30 minutos con el anticuerpo biotinilado y se volvió a lavar con PBS 5 minutos. Posteriormente se incubaron con avidina-biotina durante 30 minutos y se lavaron de nuevo 5 minutos con PBS. Las preparaciones se introdujeron en Triton X-100 al 1% (*Sigma*)

durante 30 segundos, se lavaron con agua y se secaron. A continuación se incubaron en una solución de diaminobencidina durante 5 minutos y se lavaron con agua otros 5 minutos. Por último se realizó una tinción de contraste de la muestra con hematoxilina. Los productos específicos utilizados en esta técnica forman parte del kit de revelado *Santa Cruz Immunoperoxidase Stainin* (*Santa Cruz Biotechnology*).

Se realizaron los correspondientes controles negativos (incubaciones en ausencia del anticuerpo primario) y un control de revelado.

ANÁLISIS POR NORTHERN BLOT DE RNAm

EXTRACCIÓN DEL RNA

La expresión del RNAm de colágeno I α 2, colágeno IV α 1, TGF- β 1 y endogлина en el tejido renal se detectó mediante la técnica del Northern blot. Para ello, en primer lugar se procedió a la extracción del RNA de los riñones.

El RNA se aisló con el método del tiocianato de guanidina-fenol-cloroformo. Para evitar su degradación se mantuvo durante todo el proceso a 4°C, se trabajó con el material de vidrio horneado a 160°C, el de plástico autoclavado y todas las soluciones utilizadas fueron tratadas con dietil-piropcarbonato (DEPC) 0.1%. En primer lugar homogenizamos sobre hielo seco aproximadamente 100 mg de tejido renal en 3 mL de tiocianato de guanidina con el Polytron (*T8.01 Netzgerät, Ika Labortechnik*). A continuación añadimos 1/10 del volumen de acetato sódico 2M (pH 4), un volumen igual al total de fenol y 1/10 del volumen total de cloroformo/isoamylalcohol (24:1). Después de incubar 15 minutos a 0°C, centrifugamos 45 minutos a 8500 rpm en la centrífuga SS34 a 4°C. Recogimos la fase acuosa y precipitamos el RNA con el mismo volumen de isopropanol. Incubamos 45 minutos a -20°C y volvimos a centrifugar a 8500 rpm en la SS34 durante 30 minutos a 4°C. Con la ayuda de una bomba de vacío desechamos el sobrenadante y lavamos resuspendiendo en etanol 70%. Centrifugamos de nuevo en las mismas condiciones durante 10 minutos y limpiamos el precipitado (que contiene el RNA) retirando el etanol.

El RNA fue resuspendido en agua DEPC y medimos su densidad óptica (DO) (*Spectrophotometer UV-120-02, Shimadzu*) a 260nm para obtener su concentración ($1DO_{260}=40\mu\text{g/mL}$). Las muestras de RNA se guardaron a -20°C .

NORTHERN BLOT

La separación del RNA contenido en el tejido renal se llevó a cabo mediante electroforesis en un gel de agarosa 1% y formaldehído 1.1%.

Cada muestra de 20 μg de RNA se llevó a un volumen de 10.5 μL y se le añadió un tampón de desnaturalización (24 μL de formamida desionizada, 8.65 μL de formaldehído 37% y 4.8 μL de solución MOPS (solución MOPS: Mops 0.2M, acetato sódico 0.05M, AEDT 0.01M, pH 7)). La mezcla se calentó durante 10 minutos a 70°C en un baño seco (*Thermolyne Type 17600 Dri-Bath, Barnstead*) y se le añadieron 4.5 μL de tampón de carga (Glicerol 50%, AEDT 1mM). Después se cargaron las muestras de RNA en los pocillos. Junto con las muestras, se cargó también un control positivo, que fue tratado igual que las muestras.

La electroforesis se llevó a cabo en una cubeta (*DNA Sub CellTM, Bio-Rad*) con tampón de carrera MOPS (Mops 0.02M, Acetato sódico 0.005M, AEDT 0.001M, pH 7) a 80V (fuente de alimentación: *Power Pac 300, Bio-Rad*).

La transferencia se realizó en solución salina concentrada (SSC) (cloruro sódico 3M, citrato sódico 0.3 M, pH 7) a una membrana de Nylon (*Hybond hybridization transfer membranes, Amersham*). Previamente se empaparon los papeles Whatman y se equilibró el gel en SSC. La transferencia tuvo lugar por capilaridad, a través de un puente de papel Whatman que estaba en contacto con SSC y con el gel. Después de 16 horas de transferencia se fijó el RNA a la membrana con luz UV.

La sonda usada para endoglina era un fragmento 360-bpSacI/SacII de DNAC de endoglina de rata en pGEM-T (Vary y cols., no publicado). La sonda para colágeno I α 2 era un fragmento de 1.6 kb procedente de la digestión de un plásmido PVC 8 (AmpR) de 2.6kb. Como sonda para colágeno IV α 1 se usó un fragmento de 0.6 kb procedente de la

digestión de un plásmido PVC 18 (AmpR) de 2.7 kb. La sonda de TGF- β 1 de ratón, que hibridó con el RNAm de TGF- β 1 de rata, era un fragmento de 451 bp que se obtuvo por PCR. Como control interno de carga de RNA se utilizó una sonda de 1.5 kb de la subunidad ribosomal 18S.

Las sondas se marcaron con $^{32}\text{PdCTP}$. La técnica consiste en desnaturalizar la sonda por calor y a continuación añadir los nucleótidos dATP, dGTP, dTTP y el marcado $^{32}\text{PdCTP}$. Para la formación de la cadena complementaria se añaden la solución reaction mix y la enzima Klenow (*Random Primed DNA labeling Kit, Roche*) y se incuba a 37°C durante 45 minutos. Después se precipita la sonda marcada con acetato de amonio, RNAt y etanol. El precipitado, que contiene la sonda marcada, se resuspende en agua y se hierve para su desnaturalización.

Antes de la hibridación, las membranas se prehibridaron durante 4 horas con el tampón de hibridación (dodecil sulfato sódico (SDS) 1%, cloruro sódico 1M, dextransulfato 10%) a 60°C en el horno de hibridación (*Hybridization oven/shaker, Amersham Pharmacia Biotech*). A continuación se hibridaron con la sonda marcada en las mismas condiciones durante 16 horas. Después se lavó la membrana 2 veces con una solución de cloruro sódico 0.3M, citrato sódico 0.03 M, SDS 1%, pH 7 durante 30 minutos a 60°C, y otra vez con la misma solución diluida 10 veces durante 60 minutos y a temperatura ambiente.

La membrana fue expuesta primero en una pantalla (*Fuji Imaging Plate Bas III, Fujifilm*) que luego se leyó en el fosfoimager (*BAS-1500, Fujifilm*) con el programa *Fujifilm Image Reader V1.3 E*. Con la imagen obtenida se procedió a la lectura de las densidades ópticas mediante el programa *MacBAS V2.2, FUJI*. En segundo lugar la membrana se impresionó en una autorradiografía (película *XAR Kodak Film*) utilizando una pantalla intensificadora. Después se introdujo en la máquina de revelado (*M35 X-OMAT Processor Kodak*) y se digitalizó con el Scanner® *Model VM6552 Trust* y el programa *Adobe Photoshop™ 4.0*.

Después de la hibridación con una sonda determinada, y antes de la hibridación con otra se hizo un lavado de las membranas con una solución de lavado (AEDT 0.1mM, pirofosfato 0.025%, Denhardt's 0.001%, Tris base 2.5mM, pH 8) a 70°C con el fin de

eliminar la radiactividad.

ANÁLISIS POR WESTERN BLOT DE PROTEÍNAS

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

La expresión de endoglina en las membranas plasmáticas renales y pulmonares se detectó mediante la técnica de Western blot. Para ello, en primer lugar se extrajeron las membranas del tejido.

Las fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas se obtuvieron de aproximadamente 1/8 del riñón o pulmón total, que se troceó y se le añadió, a una temperatura de 4°C, 1 mL de tampón (sacarosa 0.25M, AEDT 10mM, Tris base 10mM, pH 7). Al tampón se le añadieron los inhibidores de proteasas PMSF (2mM) y aprotinina (1µg/mL) y se homogenizó el tejido con un potter (*B. Braun Melsungen*) a 4°C. Los restos del lisado se centrifugaron dos veces a 4000g, a 4°C y durante 10 minutos (centrífuga *Universal R32*), recogiendo cada vez el sobrenadante. A continuación se centrifugó el sobrenadante a 21.000g a 4°C y durante 2 horas (centrífuga *Universal R32*). Retiramos el sobrenadante con la ayuda de una bomba de vacío y resuspendimos el precipitado, conteniendo las membranas plasmáticas, en tampón de lisis (cloruro sódico 140mM, AEDT 10mM, glicerol 10%, NP40 1%, Tris base 20mM, pH 8). Estas muestras se mantuvieron guardadas a -80°C.

Para la cuantificación de las proteínas de membrana se utilizó un método colorimétrico (*DC Protein Assay, Bio-Rad*). A las muestras diluídas (1:25) en agua destilada se le añadieron dos reactivos: una solución alcalina de tartrato de cobre suplementada con SDS y un reactivo de Folina diluída. Tras agitación se efectuó la lectura de la DO a 720 nm (*ELx 800 Universal Microplat Reader, Bio-Tek Instruments, INC.*). Cada una de las medidas se realizó por triplicado. Los valores de DO obtenidos se refirieron a una curva de calibrado a partir de soluciones patrón de concentraciones conocidas de albúmina bovina sérica (BSA) (*Fraction V Sigma*).

WESTERN BLOT

La separación de las proteínas contenidas en las membranas extraídas del tejido se llevó a cabo mediante electroforesis. El gel, de 1,5 mm de espesor, estaba constituido por un gel de carga al 5% de una mezcla de poliacrilamida (acrilamida 29,2% y bis-acrilamida 0.8%), y un gel de separación de la misma mezcla al 10%. Ambos geles contenían SDS al 10%.

A cada muestra de 150 µg de proteína se le añadió un volumen igual de tampón de carga (SDS 2%, azul de bromofenol 0.0005%, glicerol 10%, Tris base 125mM, pH 6.8). Se calentaron durante 10 minutos a 95°C en un baño seco (*Thermolyne Type 17600 Dri-Bath, Barnstead*) y se cargaron las proteínas en los pocillos. En pocillos paralelos, se cargaron también un control positivo de endoglina y un marcador de pesos moleculares (*Prestained Standars Bio-Rad*).

La electroforesis se llevó a cabo en una cubeta (*Mini-Protean® II Cell, Bio-Rad*) con tampón de electroforesis (glicina 192mM, SDS 0.1%, Tris base 25 mM, pH 8.3) a una corriente constante de 25mA (fuente de alimentación: *Model 1000/500 Power Supply, Bio-Rad*).

La transferencia de las proteínas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa (*Trans-Blot® Transfer Medium 0.45 µm, Bio-Rad*) se realizó en solución de transferencia (glicina 190 mM, metanol 20%, SDS 0.1%, Tris base 20 mM, pH 8.3) a una corriente constante de 400 mA durante 2 horas. Previamente se empapó el material empleado (papeles secantes y esponjas) y se equilibraron el gel y la membrana en el tampón de transferencia durante 15 minutos.

Después de la transferencia la membrana se lavó 3 veces, durante 5 minutos cada vez, con solución salina con Twin y tamponada con Tris base (TTBS) (cloruro sódico 150 mM, Twin 20 0.1% Tris base 20mM, pH 7.5) y se dejó una noche a 4°C en solución de bloqueo (TTBS con leche en polvo *Sveltesse Nestlé* 8%), para evitar las uniones no específicas. Tras el bloqueo, se lavó la membrana tres veces durante 10 minutos con TTBS y se incubó durante una hora en agitación constante con el anticuerpo primario antiendoglina humana de conejo (Raab y cols., 1999) diluido 1:10000 en una solución de

TTBS con BSA al 0.3%. Después de lavar la membrana 4 veces durante 10 minutos con TTBS, se incubó durante 45 minutos con el anticuerpo secundario (*Horse Raddish Peroxidase (HRP)-labelled goat anti-rabbit IgG, Bio-Rad*) diluido 1:10000 en las mismas condiciones que el anticuerpo primario.

Se hicieron 4 lavados de 10 minutos con TTBS y a continuación se hizo el revelado sumergiendo la membrana durante un minuto en una solución de reactivos estándar *ECL (Amersham Pharmacia Biotech)* y peróxido de hidrógeno 3%. Inmediatamente, y bajo las condiciones adecuadas de iluminación, se impresionó la membrana en una autorradiografía (película de rayos X, *Fuji Photo Film*) y se introdujo en la máquina de revelado (*M35 X-OMAT Processor Kodak*).

Tras digitalizar la autorradiografía (*Scanner® Model VM6552 Trust* y programa *Adobe Photoshop™ 4.0*) se procedió a la lectura de las densidades ópticas mediante el programa *MacBAS V2.2, FUJI*.

TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos en los diferentes experimentos se almacenaron en una hoja de cálculo (*Microsoft Excel 9.0 para Windows®*) y se analizaron mediante su exportación a la aplicación estadística *Number Cruncher Statistical System*, versión 6.0.10 para *Windows®*.

Para evaluar la normalidad de los datos se aplicó el test de *Kolmogorov-Smirnov*. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el análisis de la varianza de una entrada (ANOVA 1). A continuación se aplicó del test de *Scheffé* cuando los datos presentaban una distribución normal y el de *Kruskal-Wallis* cuando no estaban normalmente distribuido. Consideramos significativo un valor de *p* menor que 0.005 o 0.001 y un valor de *z* mayor que 1.96.

Los datos se expresan como medias \pm error estándar de la media (EEM) en el caso de que siguieran una distribución normal o paramétrica, y como medianas en el caso de datos con distribuciones no normales. En general se asumió como máximo error alfa en todas las pruebas anteriores el 5% ($p < 0.05$).

En el modelo experimental utilizado, la fibrosis renal se produjo de forma focal.

Para demostrar más claramente la variabilidad y dispersión de los resultados histológicos cuantitativos, estos se han representado como distribuciones de frecuencias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

EFFECTOS FISIOLÓGICOS DE LA OUU EN RATAS

INCREMENTO DEL PESO CORPORAL

Como se observa en la tabla 1 y figura 1, en el día después de la operación tanto en las ratas con OUU como en las ratas con SQ el peso corporal fue ligeramente inferior que en condiciones basales. Después del día 1 el peso corporal fue aumentando progresivamente de manera que al final del estudio (17 días tras la operación) el incremento fue más alto en las ratas con SQ (26%) que en las ratas con OUU (14%).

Tabla 1: Incremento del peso corporal

| Grupo | Basal | Día 1 | Día 3 | Día 10 | Día 17 |
|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------------------|
| SQ | 280±6 (n=16) | 255±11 (n=4) | 276±14 (n=4) | 331±12 (n=4) | 353±21 (n=4) |
| OOU | 266±7 (n=20) | 260±10 (n=4) | 271±17 (n=4) | 275±20 (n=6) | 303±17 ^β (n=6) |

Los datos se expresan como medias ± EEM. Diferencias estadísticas significativas, $p < 0.05$, según el test de Scheffe: β vs 1 día del mismo grupo. n es igual al número de ratas en el grupo y tiempo especificado.

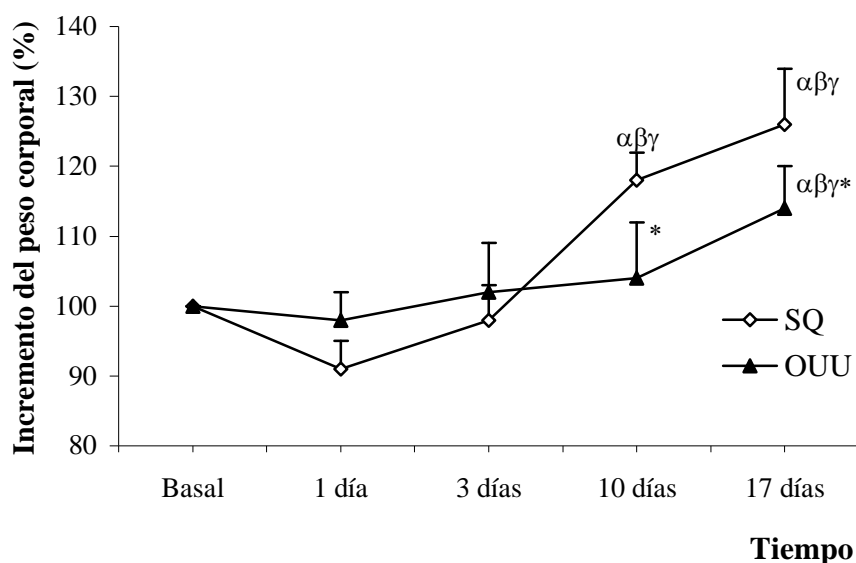


Figura 1: Incremento del peso corporal (%) de los animales de los 2 grupos (SQ y OUU) a lo largo de los 17 días del estudio. Los datos se expresan como medias \pm EEM. Diferencias estadísticas significativas, $p < 0.05$, según el test de Scheffe : α vs basal del mismo grupo; β vs 1 día del mismo grupo; γ vs 3 días del mismo grupo; * vs SQ en el mismo tiempo.

RELACIÓN PESO RENAL/PESO CORPORAL

La relación del peso renal respecto al peso corporal no varió en ninguno de los dos riñones de las ratas con SQ a lo largo de los 17 días de estudio, como se aprecia en la figura 2

No ocurrió lo mismo en las ratas con OUU. En lo que se refiere al riñón ligado (riñón izquierdo) pudimos apreciar un aumento progresivo en esta relación hasta el día 10 después de la operación. En el día 1 este aumento ya era significativo, pero es en el día 10 cuando es más importante. Sin embargo en el día 17 la relación peso renal/peso corporal disminuyó considerablemente, hasta el punto que se igualó con el riñón contralateral. No obstante, aún se apreció un aumento respecto a los riñones de las ratas con SQ a ese mismo tiempo (figura 2).

Respecto al riñón contralateral (riñón derecho), observamos un incremento en la relación peso renal/peso corporal en el día 10 después de la operación, el cual se mantuvo después hasta el día 17. Como se ha dicho anteriormente, en el día 17 se igualaron el peso renal/peso corporal del riñón ligado y del riñón contralateral (figura 2).

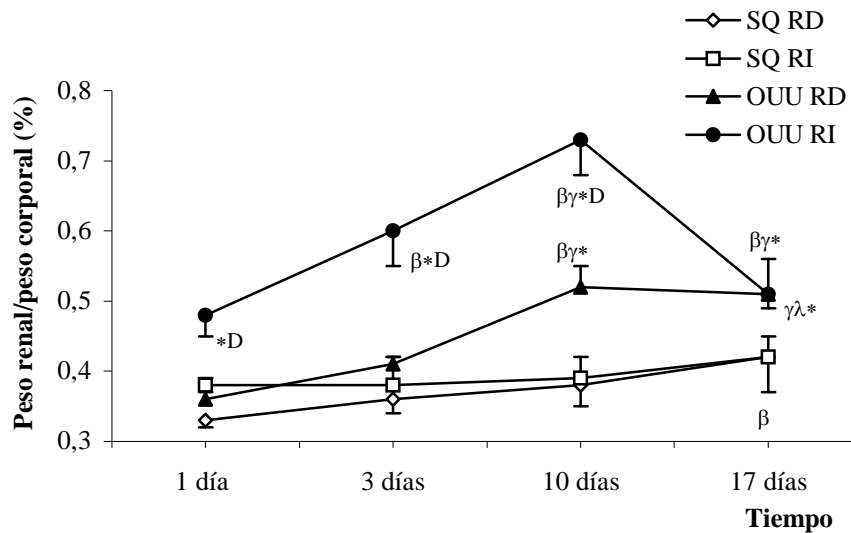


Figura 2: Relación entre el peso de los riñones (RD y RI) y el peso corporal (%) de los animales de los dos grupos experimentales (SQ y O UU) a lo largo de los 17 días del estudio. Los datos se expresan como medias \pm EEM. Diferencias estadísticas significativas, $p < 0.05$, según el test de Scheffe: β vs 1 día del mismo grupo y mismo riñón; γ vs 3 días del mismo grupo y mismo riñón; λ vs 10 días del mismo grupo y mismo riñón; * vs SQ en el mismo tiempo y mismo riñón; D vs riñón derecho del mismo grupo y al mismo tiempo.

PRESIÓN ARTERIAL MEDIA

Tanto en las ratas con OUU, como en las que presentan SQ se produjo un aumento en la PAM después de la operación, el cual ya era apreciable en el día 1. Este incremento es más notable en las ratas con SQ. A los 17 días después de la operación, la presión volvió a ser normal en las ratas con SQ, pero en las ratas con OUU continuó aumentando (figura 3).

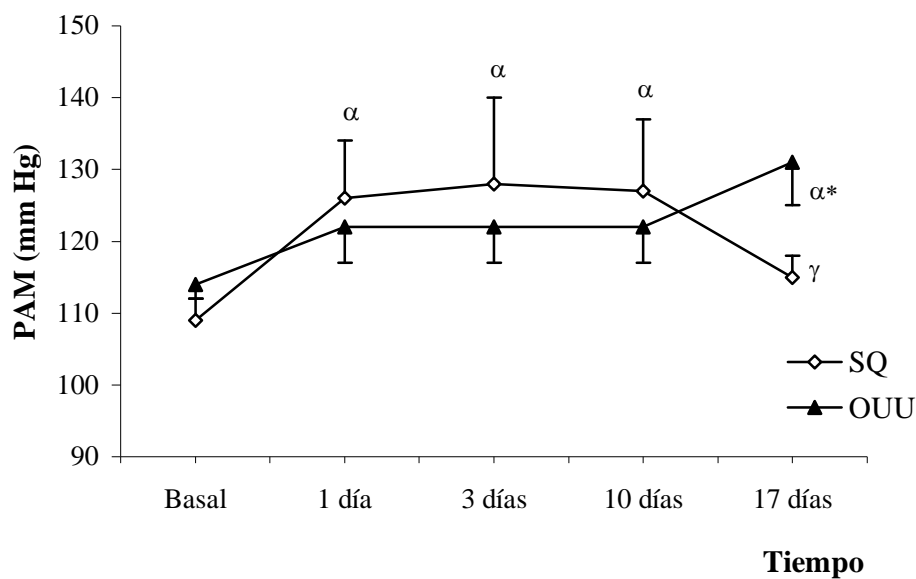


Figura 3: PAM (mmHg) de los animales de los dos grupos experimentales (SQ y OUU) a lo largo de los 17 días del estudio. Los datos se expresan como medias \pm EEM. Diferencias estadísticas significativas, $p < 0.05$, según el test de Scheffe: α vs basal del mismo grupo; γ vs 3 días del mismo grupo; * vs SQ en el mismo tiempo.

FRECUENCIA CARDIACA

No se produjeron cambios significativos en la frecuencia cardíaca a lo largo de todo el periodo experimental en ninguno de los grupos estudiados (figura 4).

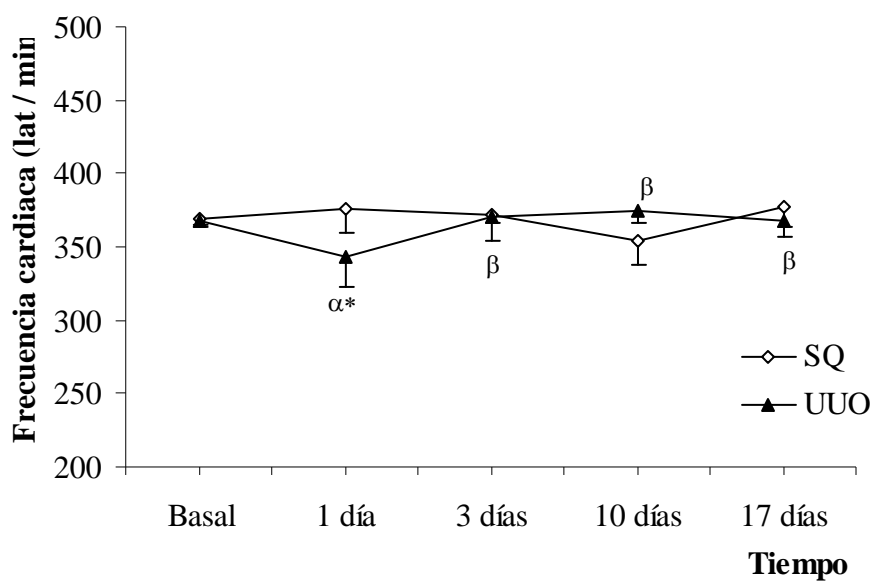


Figura 4: Frecuencia cardíaca (latidos/minuto) de los animales de los dos grupos (SQ y OUU) a lo largo de los 17 días del estudio. Los datos se expresan como medias \pm EEM. Diferencias estadísticas significativas, $p < 0.05$, según el test de Scheffe: α vs basal del mismo grupo; β vs 1 día del mismo grupo; * vs SQ en el mismo tiempo.

HEMATOCRITO

La OUU no produjo variaciones significativas en el hematocrito a lo largo del periodo experimental. Este parámetro se mantuvo dentro de los valores considerados normales en rata (figura 5).

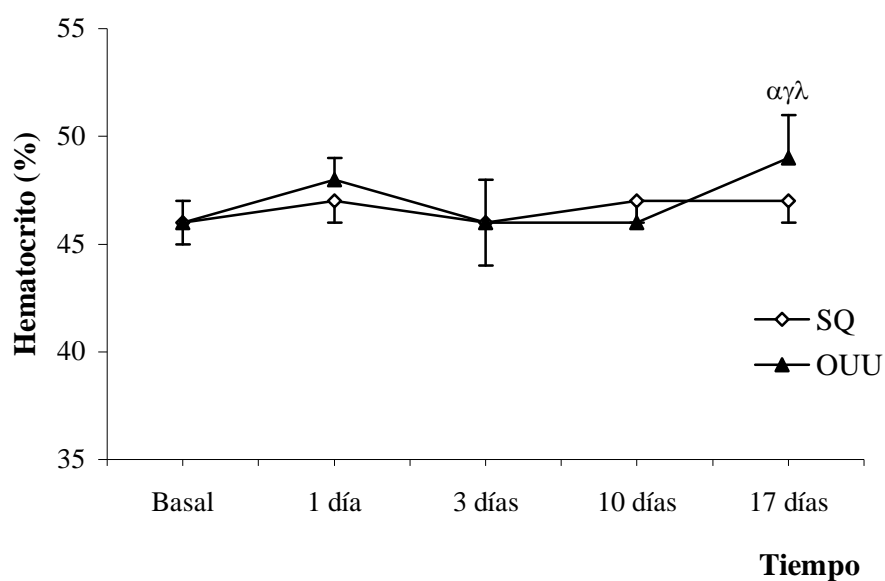


Figura 5: Hematocrito (%) de los animales de los dos grupos experimentales (SQ y OOU) a lo largo de los 17 días del estudio. Los datos se expresan como medias \pm EEM. Diferencias estadísticas significativas, $p < 0.05$, según el test de Scheffe: α vs basal del mismo grupo; γ vs 3 días del mismo grupo; λ vs 10 días del mismo grupo.

PROTEÍNAS EN PLASMA

La concentración plasmática de proteínas fue constante a lo largo del experimento en las ratas a las que se les practicó SQ. Sin embargo se produjo un aumento significativo en el día 3 después de la operación en las ratas con OUU. A partir de este día los valores volvieron a ser normales hasta el final del experimento (figura 6).

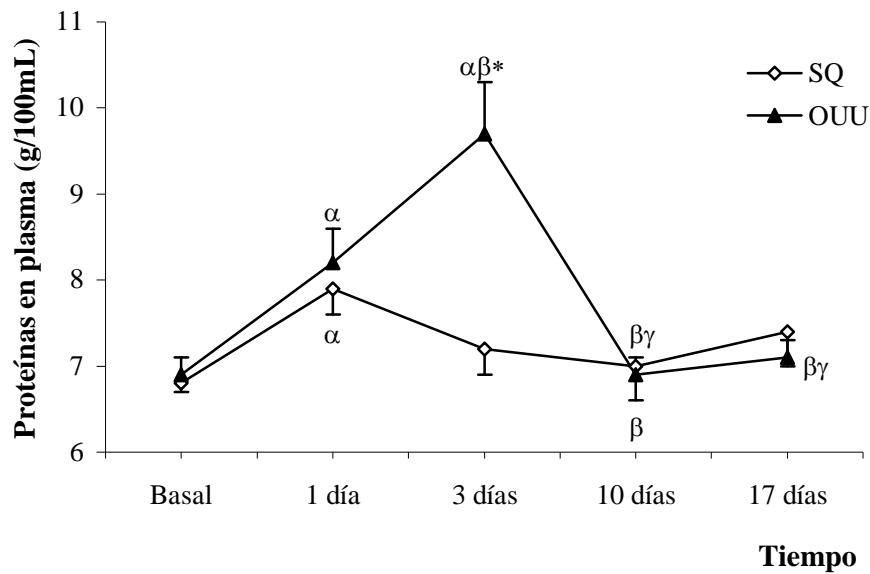


Figura 6: Proteínas en plasma (g/100mL) de los animales de los dos grupos experimentales (SQ y OOU) a lo largo de los 17 días del estudio. Los datos se expresan como medias \pm EEM. Diferencias estadísticas significativas, $p < 0.05$, según el test de Scheffe: α vs basal del mismo grupo; β vs 1 día del mismo grupo; γ vs 3 días del mismo grupo; * vs SQ en el mismo tiempo.

CREATININA EN PLASMA

La concentración de creatinina plasmática en las ratas con SQ se mantuvo constante a lo largo del periodo experimental. En las ratas con OUU fue más alta en el día 1 después de la operación. Después los niveles de creatinina volvieron a ser normales, en relación con las ratas con SQ (figura 7).

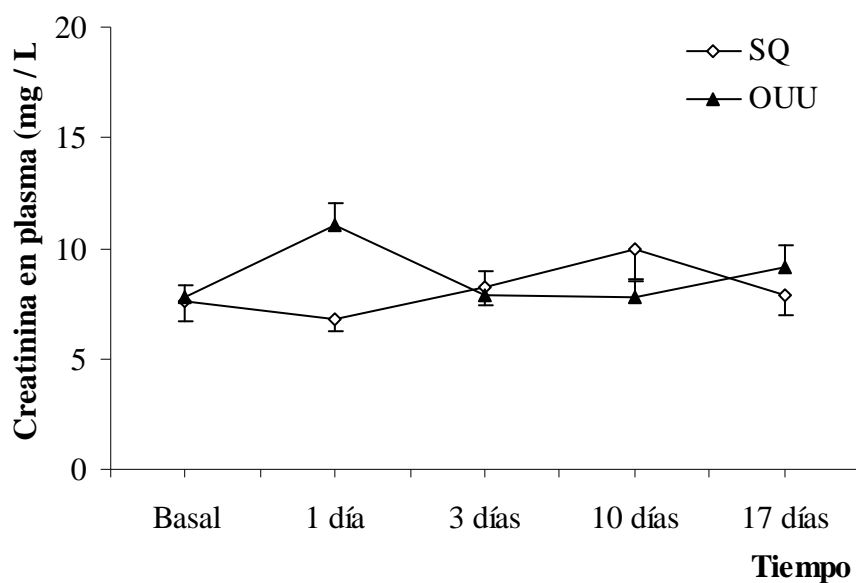


Figura 7: Creatinina en plasma (mg/L) de los animales de los dos grupos experimentales (SQ y OUU) a lo largo de los 17 días del estudio. *Los datos se expresan como medias \pm EEM. No hay diferencias estadísticas significativas, $p < 0.05$, según el test de Scheffe.*

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS *IN VIVO*

La evolución del peso corporal tanto de las ratas ligadas como de las no ligadas es muy similar. En ambos grupos de animales se produce un descenso en el peso corporal durante el primer día de recuperación tras la operación quirúrgica. Aunque el tiempo de duración del proceso quirúrgico es corto (la técnica consiste en localizar el uréter y colocarle dos ligaduras) implica la administración de un anestésico (también de duración corta), la práctica de una laparotomía ventral media y la separación de la masa intestinal para dejar al descubierto el uréter. Posteriormente se devuelve la masa intestinal a su espacio natural y se sutura la herida por planos, primero el peritoneo con sutura continua y después la piel con sutura en U. Esta manipulación quirúrgica conlleva un periodo post-operatorio que posiblemente transcurra con dolor en la región abdominal de la rata. Esta situación traumática implica pérdida del apetito y como consecuencia disminución del peso corporal. Conforme desaparece o nos alejamos del proceso quirúrgico los animales van recobrando la normalidad en cuanto a alimentación y ello se traduce en un aumento del peso corporal desde el tercer día, alcanzándose el valor máximo el día 17 del experimento.

Aunque la evolución del peso corporal es similar en los dos grupos, la recuperación del grupo de ratas con OUU es menor (+14%) que en el grupo con SQ (+26%). Esto puede deberse a la insuficiencia renal que se genera en estos animales.

Resultados similares a los nuestros han sido descritos también por Shimizu y cols (1998). Estos autores describen pérdida de peso en los tres primeros días, aunque posteriormente se incrementa durante los 21 días que dura su estudio. Ellos estudian el efecto de un antifibrótico, la pirfenidona, y describen un ligero aumento en el peso corporal de las ratas tratadas. Todos estos resultados nos permiten concluir que las ratas de los grupos experimentales estudiados presentan una ingesta similar.

En las ratas con simulación quirúrgica la evolución de la relación peso renal/ peso corporal es muy similar en los dos riñones. Esto es lógico puesto que, como hemos descrito antes, estas ratas no experimentan ninguna manipulación en los riñones, tan solo el proceso quirúrgico.

El análisis de los resultados de la relación peso renal/ peso corporal en los experimentos de ratas con ligadura del uréter, lo vamos a realizar de manera independiente, separando el riñón ligado del no ligado. En cuanto a la evolución de la relación peso renal/ peso corporal en el RD, el no ligado, se observa un incremento mas pronunciado en los últimos días del estudio. Esto es un proceso fisiológico normal puesto que, como consecuencia de la ligadura del uréter del RI este riñón va perdiendo funcionalidad conforme se incrementa la hidronefrosis. La consecuencia de esta pérdida de funcionalidad en el RI, hace que el contralateral, el no ligado, inicie un proceso de hipertrofia compensadora. Pero este proceso no se manifiesta durante los primeros días tras la intervención quirúrgica debido a la pérdida de peso corporal que experimentan estos animales y que ha sido comentada anteriormente.

Por el contrario, en la relación peso renal/ peso corporal en el riñón ligado si que se observan variaciones. Así, desde el primer día tras la maniobra quirúrgica hay un incremento en la relación peso renal/ peso corporal con respecto a los RI de las ratas con SQ. Este incremento se acentúa a los 3 y más a los 10 días de la ligadura, y posteriormente, el día 17, muestra valores similares a los encontrados el primer día. Esta evolución tan particular puede tener varias explicaciones. En primer lugar, el incremento en la relación peso renal/ peso corporal podría deberse a la pérdida de peso corporal que experimentan los animales tras la intervención quirúrgica. Esta justificación solamente tendría validez para los resultados del primer día, porque a los 3, 10 y 17 días si que aumenta el peso corporal. En segundo lugar, se podría explicar por la mayor retención de líquido que experimenta el riñón al no poder evacuar por el uréter. Esta es una justificación teórica pero no real, puesto que es cierto que el riñón se llena de orina por la imposibilidad de evacuarla, fenómeno conocido como hidronefrosis, pero cuando se extrae para pesarlo y procesarlo se “vacía”. En tercer lugar, el modelo de ligadura del uréter es un modelo utilizado por numerosos autores (Shimizo y cols, 1998; Klahr, 1998; Morrissey y cols, 1996b; Morrissey y Klahr, 1999; Diamond y cols, 1997) para desarrollar fibrosis intersticial. Este proceso fibrótico implicaría un aumento en el peso del riñón ligado y por consiguiente de la relación peso renal/ peso corporal. Por último, la caída que experimenta la relación peso renal/ peso corporal en los riñones ligados el día 17, puede deberse a una pérdida de masa renal como consecuencia del proceso de apoptosis. Este proceso ha sido descrito por otros autores (Gobe y Axelsen, 1987; Schumer y cols, 1992) en modelos de

obstrucción renal. Estos autores sugieren que las lesiones ligeras que provoca este modelo en el riñón es insuficiente para provocar necrosis apareciendo en su lugar apoptosis. Esta apoptosis puede ocurrir como consecuencia de la depleción de nutrientes que resulta del descenso en la TFG o de la depleción de factores de crecimiento o de otros factores de supervivencia que ocurre con el colapso de las estructuras tubulares (Klahr, 1998). La apoptosis también puede ser producida debido al edema que se produce en el riñón obstruido.

En cuanto a los parámetros hemodinámicos, encontramos los siguientes resultados: Tanto el grupo de ratas con SQ como el grupo de ratas con OUU manifiestan un incremento en la PAM desde el primer día. En el caso de las ratas con SQ el aumento en la PAM puede ser debido al trauma quirúrgico de la operación. Este hecho explicaría el que a los 17 días, cuando la herida está prácticamente cicatrizada, la PAM es similar a la descrita para estos animales antes de la operación. Por el contrario, en las ratas con el uréter izquierdo ligado, aparte de la justificación anterior, la debida al trauma quirúrgico, hay que añadir el hecho de la distensión que sufre el uréter como consecuencia de la acumulación de orina por la ligadura. Esta distensión estimula a los terminales del sistema nervioso vegetativo lo que se traduce en un aumento de la PAM. Además, en este grupo, lejos de desaparecer este estímulo se incrementa con el tiempo y por ello a los 17 días la PAM es mayor.

El otro parámetro hemodinámico estudiado es la frecuencia cardiaca. No se observa ninguna variación importante entre ningún grupo ni en ningún periodo de tiempo, lo que nos indica que las variaciones descritas anteriormente en la PAM son compensadas por la contractilidad cardiaca no modificando la frecuencia cardiaca.

Otro de los parámetros fisiológicos controlados fue el hematocrito. No se observa ninguna variación significativa en los resultados de los dos grupos ni en ninguno de los periodos de tiempo estudiados. Esto nos indica que la ligadura unilateral del uréter no afecta al volumen de sangre.

Tampoco se observan variaciones en el contenido de proteínas en plasma en ningún grupo estudiado. Aunque anteriormente hemos comentado la pérdida de peso corporal el primer día tras la manipulación quirúrgica, posiblemente debida a una disminución de la

ingesta, como consecuencia del trauma quirúrgico, estos hechos no se manifiestan con alteraciones en el contenido de proteínas en plasma. Tan solo hay un valor que sobresale del resto y que se corresponde con el grupo de ratas con ligadura del uréter y a los tres días de la operación. No encontramos ninguna razón fisiológica que justifique ese aumento.

Los resultados de la creatinina en plasma nos pueden indicar el estado funcional de los riñones. Hay que tener en cuenta que la ligadura del uréter es unilateral lo que implica que un riñón queda intacto y que en un principio sería el responsable de mantener el organismo dentro de los parámetros fisiológicos normales. Además, este riñón, como consecuencia de ese mayor “trabajo” sufre un proceso de hipertrofia compensadora comentado anteriormente. Hay que comentar que en los grupos de ratas con ligadura del uréter se produce un incremento en la concentración de creatinina en plasma, recuperando los valores normales a los 17 días. Este incremento se podría justificar porque el riñón no ligado no es capaz de eliminar toda la creatinina que se produce los primeros días. Posteriormente, cuando todos los parámetros fisiológicos se estabilizan el organismo deja de producir tanta creatinina y este hecho, junto con el proceso hipertrófico del riñón hace que a los 17 días la concentración de creatinina en plasma esté dentro de los valores normales.

MODIFICACIONES HISTOLÓGICAS DE LOS RIÑONES LIGADOS Y CONTRALATERALES

ESTUDIOS MORFOLÓGICOS

El examen por microscopía óptica de los riñones ligados, tras 17 días desde la operación y teñidos con Tricrómico de Masson, confirmó las alteraciones clásicas descritas para este modelo (Figura 8).

En primer lugar, el grosor, tanto de la corteza como de la médula renal estaba disminuido, con la papila y la mayoría de los componentes medulares prácticamente desaparecidos. Los túbulos proximales mostraron numerosas alteraciones, desde el lumen dilatado y el epitelio aplanado hasta necrosis en diferentes grados. Los túbulos distales y

colectores tenían aparentemente menos lesiones que los proximales. En el intersticio tubular observamos el infiltrado inflamatorio característico de este modelo, el cual era más severo en las áreas profundas de la corteza, en lo que queda de médula, y alrededor de los vasos. Por último, la tinción de Tricrómico de Masson también reveló la presencia de fibrosis intersticial peritubular distribuida irregularmente y más pronunciada en áreas perivasculares. Sin embargo, los corpúsculos renales no presentaban alteraciones evidentes por microscopía óptica.

Los animales con SQ mostraron un tejido renal normal sin alteraciones y sin fibrosis túbulointersticial, analizados en el microscopio óptico tras 17 días después de la operación.

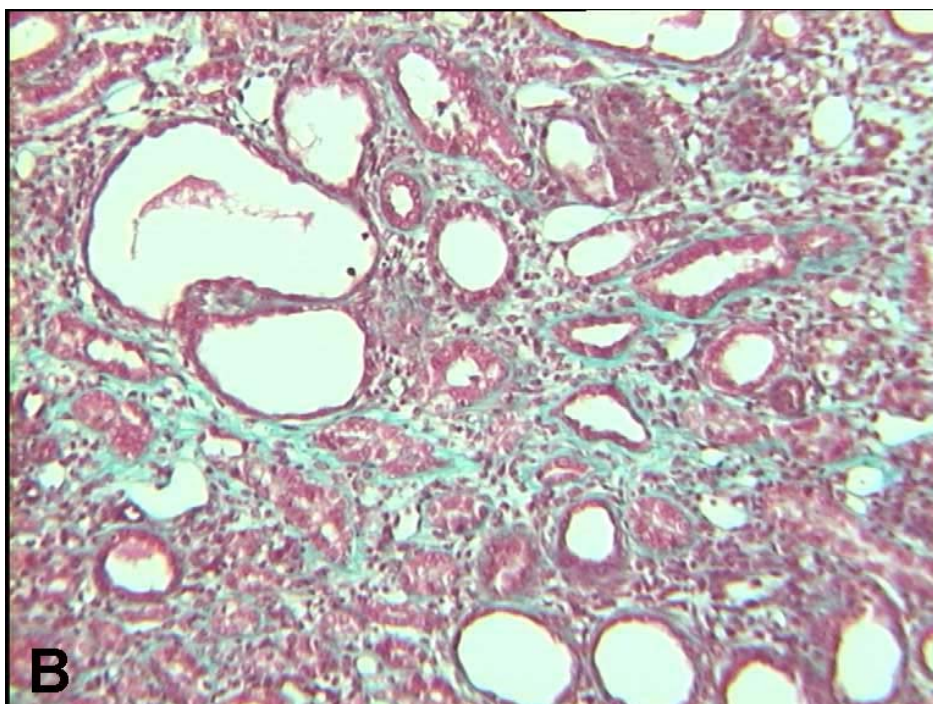
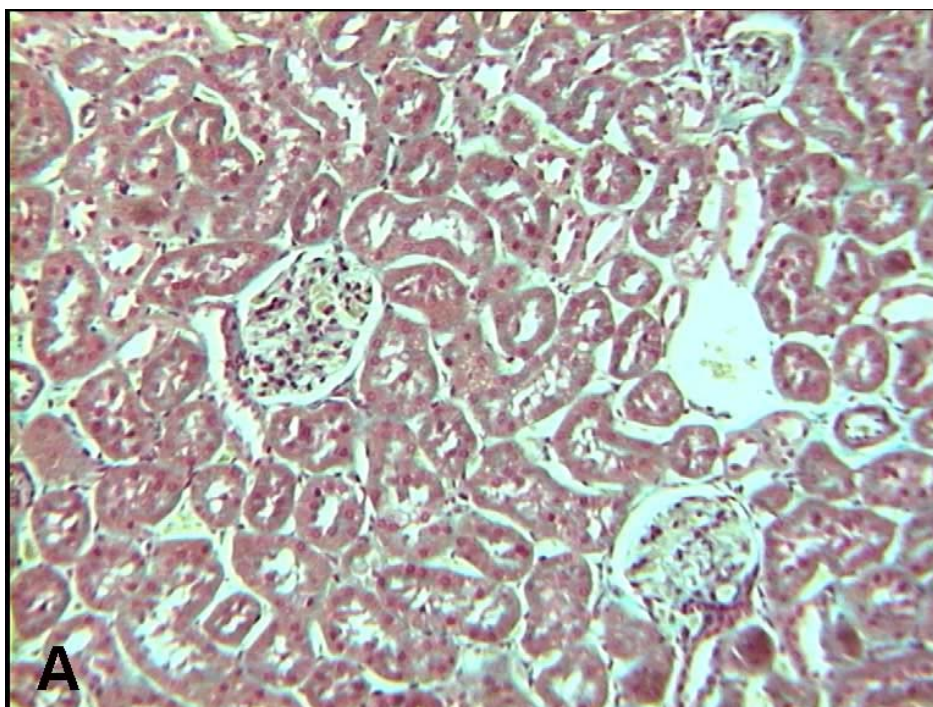


Figura 8: Observación histológica al microscopio óptico. Tinción con tricrómico de Masson. **A.** Riñón de rata con SQ a los 17 días de la operación. **B.** Riñón ligado de rata tras 17 días de OUU.

ESTUDIOS MORFOMÉTRICOS

El análisis cuantitativo de la fibrosis, después de 17 días desde la OUU, demostró que los riñones ligados (L) tenían más fibrosis intersticial ($9628 \pm 3610 \mu\text{m}^2$) que los riñones no ligados (NL) ($5070 \pm 2635 \mu\text{m}^2$) (Figura 8). Por el contrario los riñones contralaterales presentaron mayores área corpuscular ($10088 \pm 2288 \mu\text{m}^2$) (Figura 10) y mesangio ($854 \pm 535 \mu\text{m}^2$) (Figura 11) en comparación con los riñones obstruidos (8628 ± 2426 y $703 \pm 423 \mu\text{m}^2$ respectivamente).

La fibrosis túbulointersticial en los riñones de ratas con SQ tras 17 días después de la operación fue similar a la de los riñones contralaterales de las ratas con ligadura de uréter.

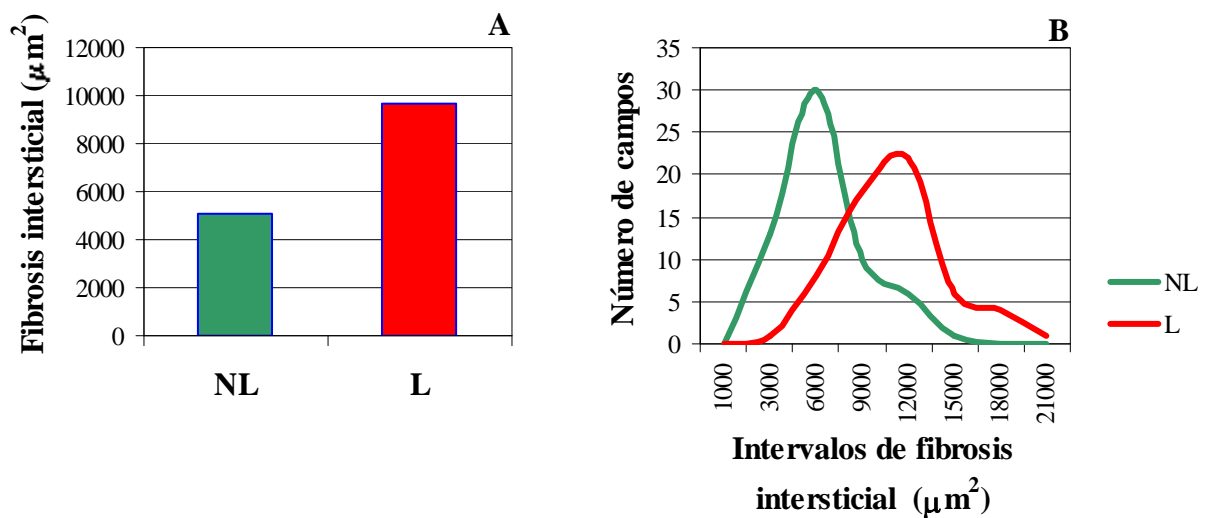


Figura 9: **A.** Fibrosis intersticial (μm^2) en los riñones NL y L de los animales con OUU a los 17 días después de la operación. *Los datos se expresan como medianas.* **B.** Distribuciones de frecuencias de los datos de área de fibrosis intersticial (μm^2) de los riñones NL y L de las ratas con OUU a los 17 días de la operación.

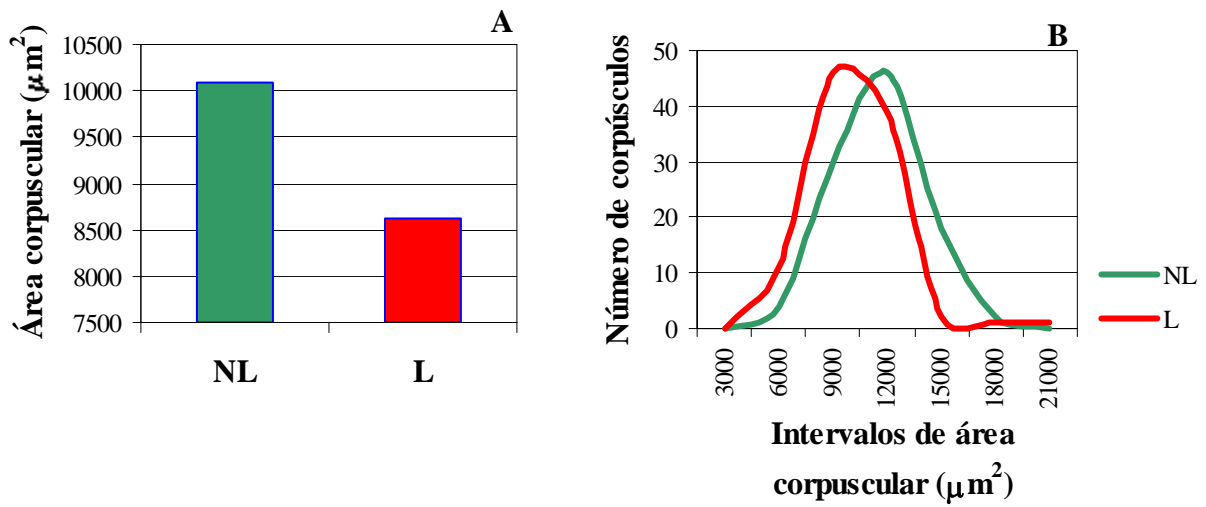


Figura 10: A. Área corpuscular (µm²) en los riñones NL y L de los animales con OUU a los 17 días después de la operación. *Los datos se expresan como medianas.* B. Distribuciones de frecuencias de los datos de área corpuscular (µm²) de los riñones NL y L de las ratas con OUU a los 17 días de la operación.

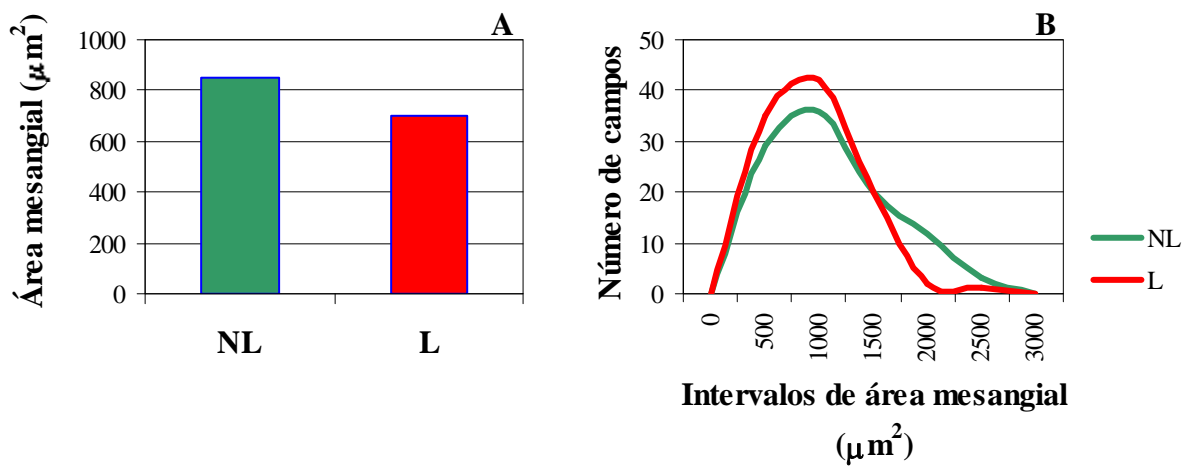


Figura 11: A. Área mesangial (µm²) en los riñones NL y L de los animales con OUU a los 17 días después de la operación. *Los datos se expresan como medianas.* B. Distribuciones de frecuencias de los datos de área mesangial (µm²) de los riñones NL y L de las ratas con OUU a los 17 días de la operación.

INMUNOHISTOQUÍMICA

Los estudios inmunohistoquímicos se realizaron a los 17 días de la operación.

En los animales con SQ sólo se observó una leve expresión de colágeno I en áreas perivasculares. Sin embargo, en los riñones ligados hubo una expresión significativa de colágeno I respecto a los riñones de animales con SQ, que se localizaba en áreas perivasculares y peritubulares (Figura 12).

La expresión de TGF- β 1 fue notable en las zonas fibrosadas del intersticio de los riñones ligados, pero no hubo expresión en las ratas con SQ (Figura 13).

Los estudios inmunohistoquímicos de endoglina mostraron expresión endotelial de esta proteína en riñones de ratas con SQ, pero no se apreció expresión en el intersticio renal. En lo que se refiere a los riñones con OUU, se observó expresión de endoglina en las áreas fibrosadas peritubulares (Figura 14), y la expresión en las células endoteliales de los vasos era mucho mayor que la de los riñones con SQ (Figura 15).

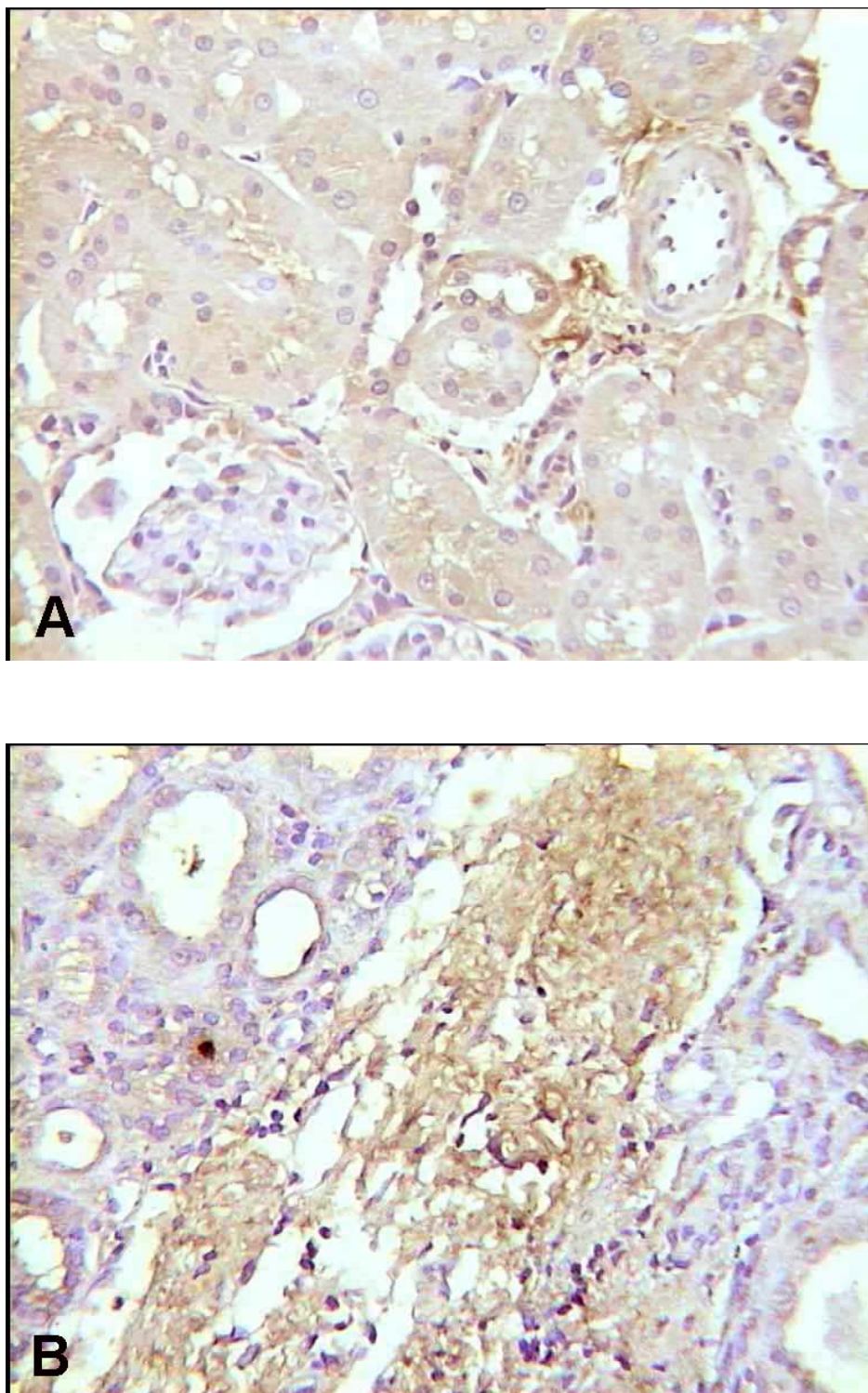


Figura 12: Detección inmunohistoquímica de colágeno I con un anticuerpo policlonal de conejo (*Chemicon Int. Inc., CA, USA*). **A.** Riñón de rata con SQ a los 17 días de la operación. **B.** Riñón ligado de rata tras 17 días de OUU.

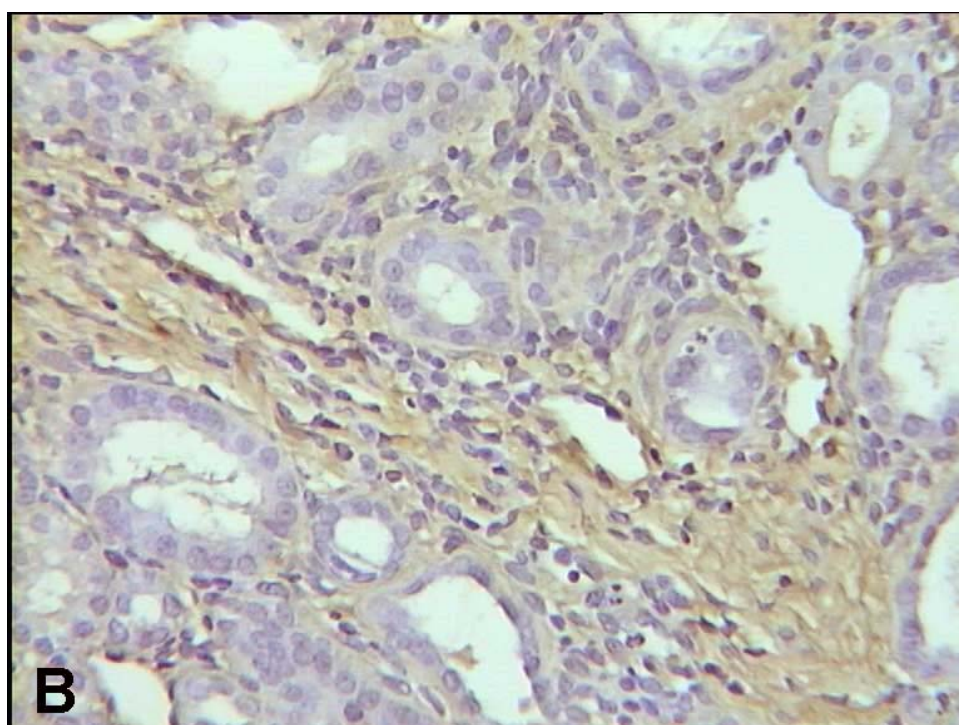
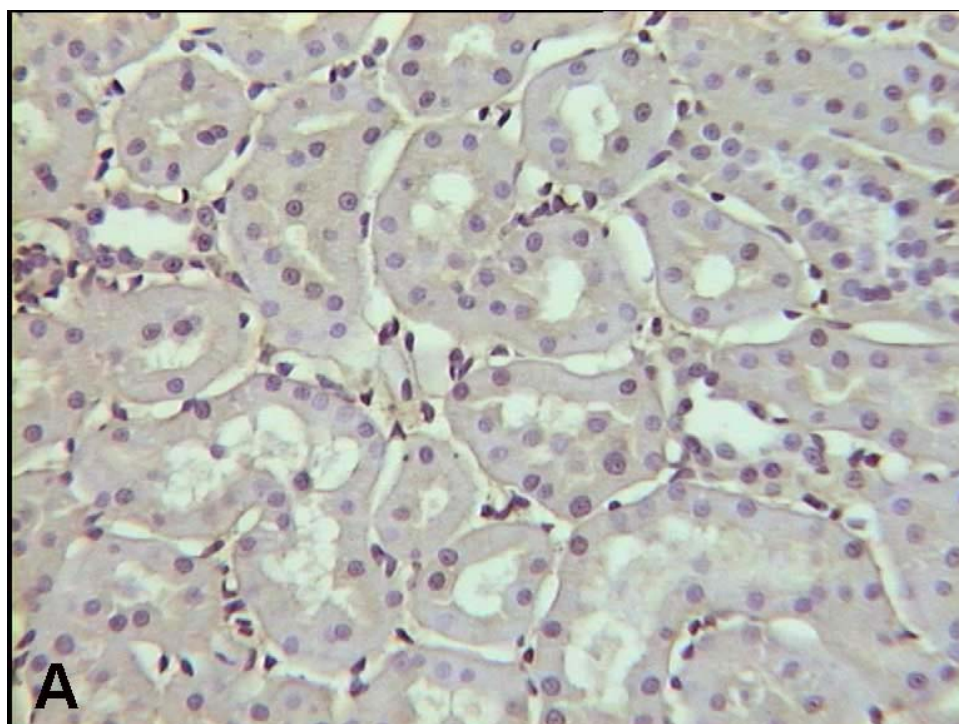


Figura 13: Detección inmunohistoquímica de TGF- β 1 con un anticuerpo policlonal de conejo (Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA). **A.** Riñón de rata con SQ a los 17 días de la operación. **B.** Riñón ligado de rata tras 17 días de OUU.

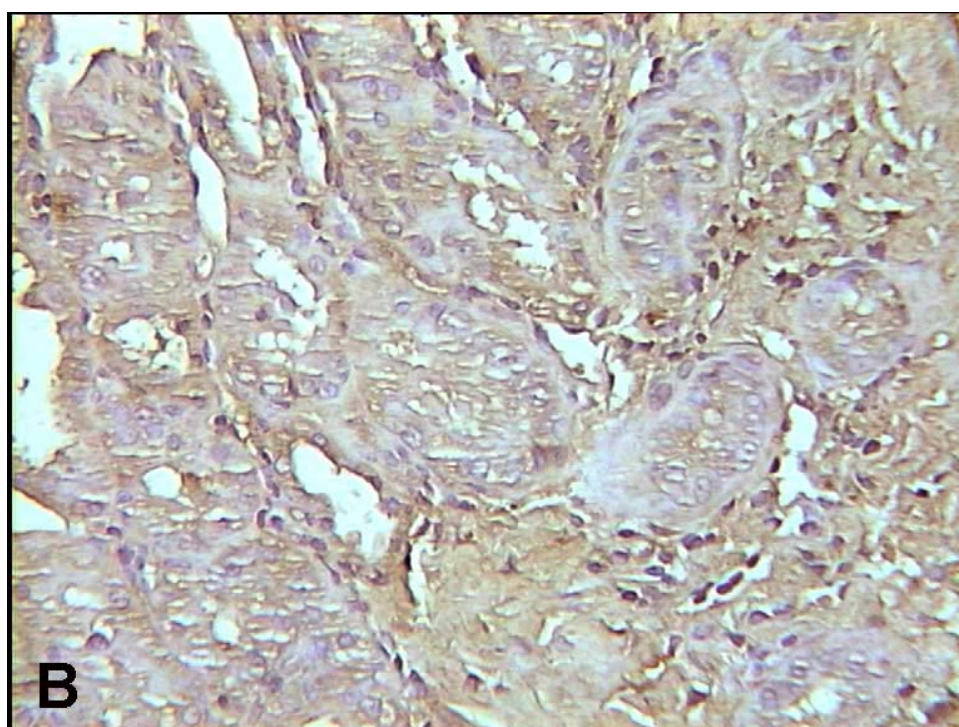
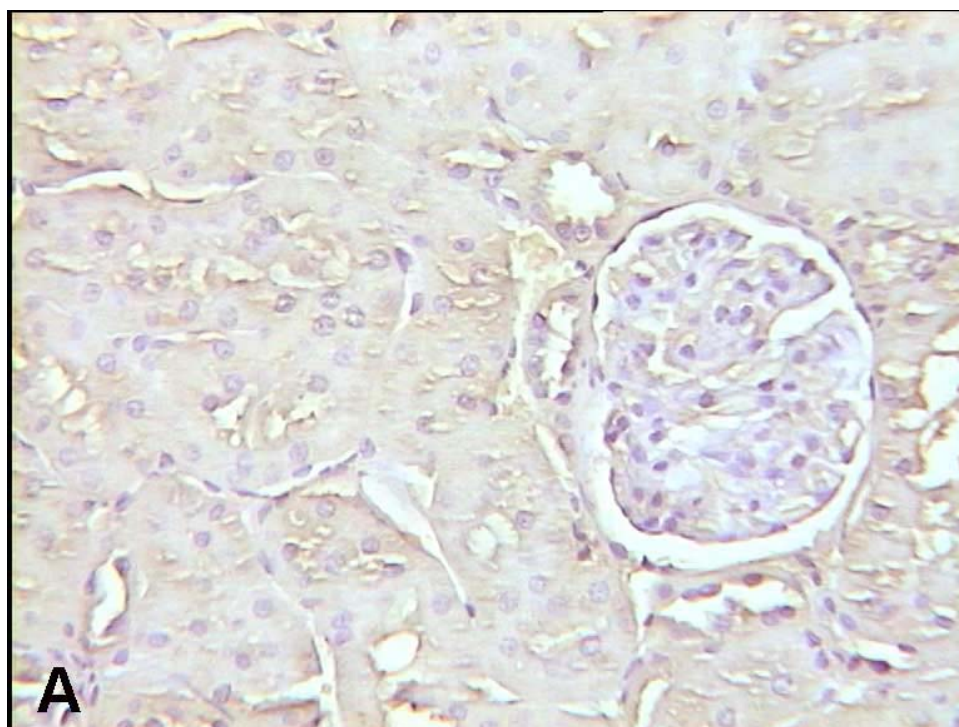


Figura 14: Detección inmunohistoquímica de endoglina con un anticuerpo policlonal de conejo (Raab y cols, 1999) en el intersticio renal. **A.** Riñón de rata con SQ a los 17 días de la operación. **B.** Riñón ligado de rata tras 17 días de OUU.

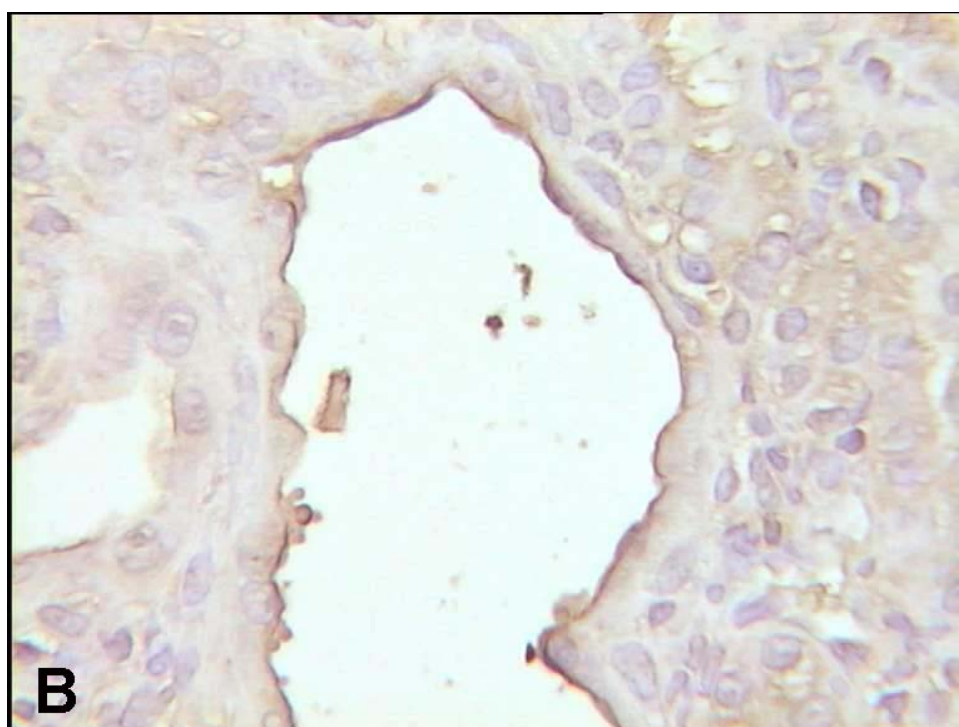
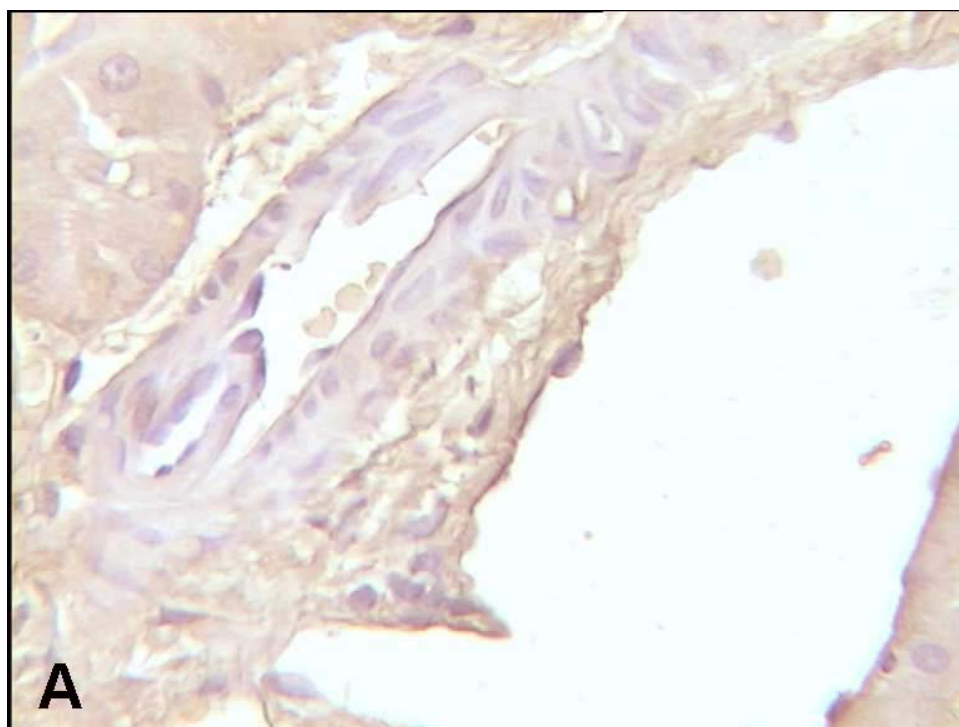


Figura 15: Detección inmunohistoquímica de endoglina con un anticuerpo policlonal de conejo (Raab y cols, 1999) en arterias renales. **A.** Arteria renal de rata con SQ a los 17 días de la operación. **B.** Arteria de riñón ligado de rata tras 17 días de OUU.

EXPRESIÓN DE COLÁGENO I, COLÁGENO IV, TGF- β Y ENDOGLINA

COLÁGENO

El Northern blot reveló que la expresión de RNAm de colágeno IV α 1 era mayor en los riñones obstruidos de las ratas con OUU que en los riñones contralaterales, en los días 1, 3 y 17 después de la operación (4.3, 4.1 y 2.4 veces respectivamente), como se aprecia en las figuras 16B, 17B, 18B y 19B.

De igual manera, la expresión de RNAm de colágeno I α 2 también fue mayor en los riñones obstruidos respecto a los contralaterales 1.5, 2.2 y 2.6 veces en los días 1, 3 y 17 respectivamente después de la ligadura del uréter, como indican las figuras 16A, 17A, 18A y 19A.

No se apreciaron diferencias significativas ni en colágeno I, ni en colágeno IV, entre los RNAm de riñones de ratas con SQ y los riñones contralaterales de ratas con OUU (Figuras 16A, 16B, 17A, 17B, 18A y 18B).

TGF- β 1

La expresión de RNAm de TGF- β 1 también estaba incrementada en los riñones ligados en los días 1, 3 y 17 después de la OUU respecto a los correspondientes riñones contralaterales, en 3.0, 3.6 y 4.7 veces respectivamente, como se observa en las figuras 16C, 17C, 18C y 19C.

No hubo cambios significativos entre el RNAm de TGF- β 1 de los riñones de animales con SQ y los contralaterales de animales con OUU (Figuras 16C, 17C y 18C).

ENDOGLINA

El contenido en RNAm de endoglina detectado por Northern blot fue mayor en los riñones ligados que en sus correspondientes contralaterales a los 3 y 17 días después de la operación (1.7 y 2.3 veces respectivamente) (Figuras 17D, 18D y 19D). Sin embargo, en el primer día después de la OUU no hubo diferencias entre el RNAm de endoglina de los riñones ligados y el de los contralaterales (Figuras 16D y 19D).

No hubo diferencias importantes entre los RNAm de endoglina en riñones de animales con SQ y los no ligados de animales con OUU (Figuras 16D, 17D y 18D).

Como se aprecia en la figura 20, la proteína endoglina fue detectada específicamente mediante Western blot con un anticuerpo anti-endoglina humana de conejo. La endoglina contenida en las membranas del tejido renal a los 10 y 17 días de la OUU resultó ser mayor en los riñones ligados que en los contralaterales (2.6 y 2.8 veces respectivamente), como podemos observar en las figuras 22 y 23.

Al igual que ocurre en el RNAm, la expresión de proteína endoglina fue similar en los riñones contralaterales y los riñones procedentes de animales con SQ (Figuras 22 y 23).

Además, la obstrucción ureteral no modificó la expresión de endoglina de rata en el pulmón de los animales (Figura 21).

Figura 16: RNAm de colágeno I α 2, colágeno IV α 1, TGF- β 1 y endogлина en los riñones de ratas con SQ y en los riñones ligado (L) y no ligado (NL) de ratas sometidas a OUU **1 día** después de la operación. Se usó como control interno de carga la subunidad ribosomal 18S. **A.** Relación entre la DO de colágeno I α 2/ 18S. **B.** Relación entre la DO de colágeno IV α 1/ 18S. **C.** Relación entre la DO de TGF- β 1/ 18S. **D.** Relación entre la DO de endogлина/ 18S. *Los datos se expresan como medias \pm EEM. Diferencias estadísticas significativas, $p < 0,01$, según el test de Scheffe: #L vs NL.*

Figura 17: RNAm de colágeno I $\alpha 2$, colágeno IV $\alpha 1$, TGF- $\beta 1$ y endogлина en los riñones de ratas con SQ y en los riñones ligado (L) y no ligado (NL) de ratas sometidas a OUU **3 días** después de la operación. Se usó como control interno de carga la subunidad ribosomal 18S. **A.** Relación entre la DO de colágeno I $\alpha 2$ / 18S. **B.** Relación entre la DO de colágeno IV $\alpha 1$ /18S. **C.** Relación entre la DO de TGF- $\beta 1$ / 18S. **D.** Relación entre la DO de endogлина/ 18S. *Los datos se expresan como medias \pm EEM. Diferencias estadísticas significativas, $p < 0,05$, según el test de Scheffe: *L vs NL.*

Figura 18: RNAm de colágeno I α 2, colágeno IV α 1, TGF- β 1 y endogлина en los riñones de ratas con SQ y en los riñones ligado (L) y no ligado (NL) de ratas sometidas a OUU **17 días** después de la operación. Se usó como control interno de carga la subunidad ribosomal 18S. **A.** Relación entre la DO de colágeno I α 2/ 18S. **B.** Relación entre la DO de colágeno IV α 1/ 18S. **C.** Relación entre la DO de TGF- β 1/ 18S. **D.** Relación entre la DO de endogлина/ 18S. *Los datos se expresan como medias \pm EEM. Diferencias estadísticas significativas según el test de Scheffe: *L vs NL ($p < 0,05$); #L vs NL ($p < 0,01$).*

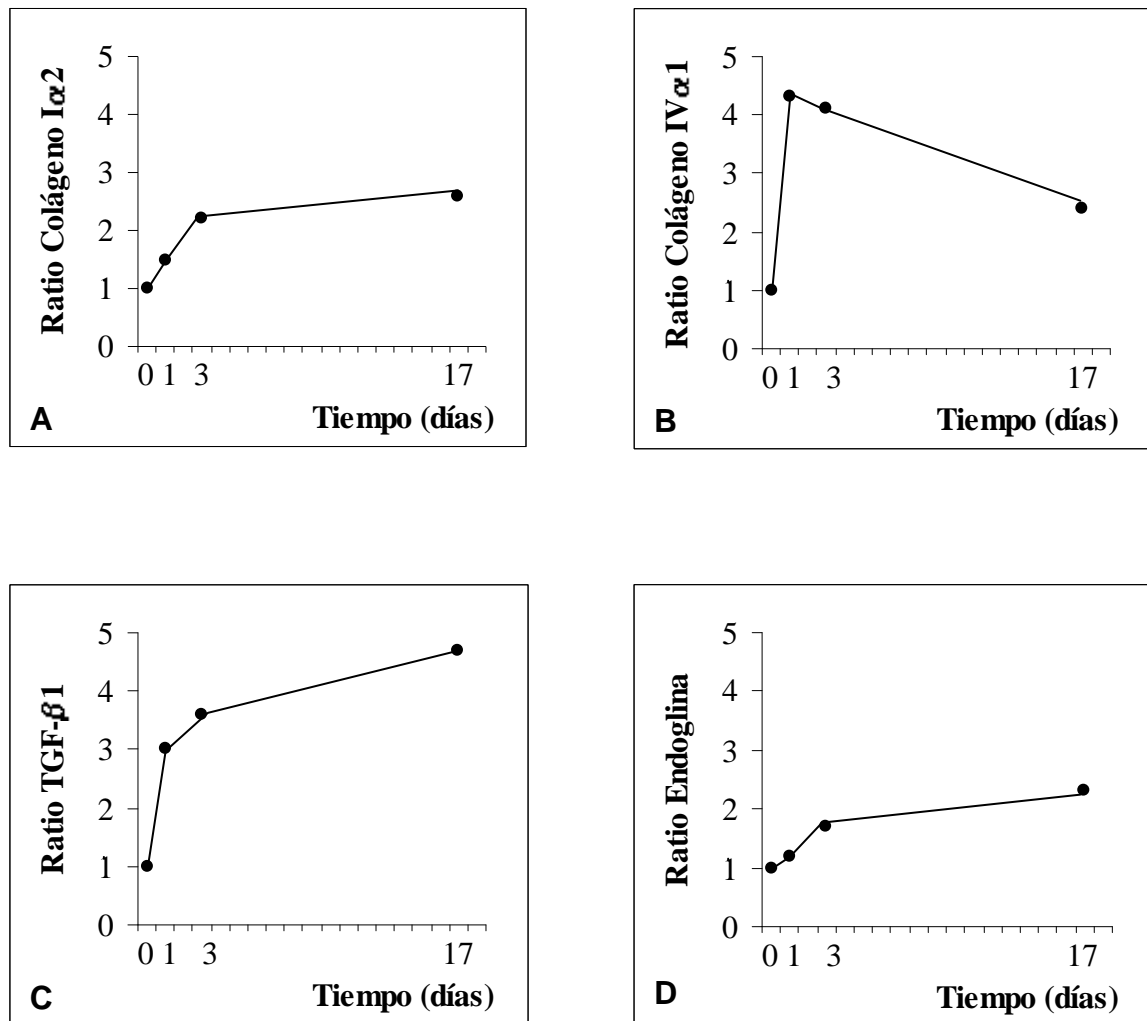


Figura 19: Evolución en el tiempo del RNAm de colágeno I α 2, colágeno IV α I, TGF- β 1, y endoglina en los riñones ligados de ratas sometidas a OUU. **A.** Ratio entre la DO de Colágeno I α 2/ 18S del riñón ligado y la DO de Colágeno I α 2/ 18S del riñón no ligado. **B.** Ratio entre la DO de Colágeno IV α 1/ 18S del riñón ligado y la DO de Colágeno IV α 1/ 18S del riñón no ligado. **C.** Ratio entre la DO de TGF- β / 18S del riñón ligado y la DO de TGF- β / 18S del riñón no ligado. **D.** Ratio entre la DO de endoglina/ 18S del riñón ligado y la DO de endoglina/ 18S del riñón no ligado.

Figura 20: Western blot de endoglina en los riñones de ratas con SQ y en los riñones ligado (L) y no ligado (NL) de ratas sometidas a OUU incubados con el anticuerpo anti-endoglina humana de conejo o con el correspondiente anticuerpo preimmune. Se incluyó un marcador de pesos moleculares. *Los datos se expresan como medias \pm EEM.*

Figura 21: Proteína endoglina en los pulmones de ratas con SQ u OUU a los 1, 3, 10 y 17 días (1d, 3d, 10d y 17d) después de la operación. *Los datos se expresan como medias \pm EEM.*

Figura 22: DO de la proteína endoglina en los riñones de ratas con SQ y en los riñones ligado (L) y no ligado (NL) de ratas sometidas a OUU a los **10 días** después de la operación.. *Los datos se expresan como medias \pm EEM. Diferencias estadísticas significativas, $p < 0,05$, según el test de Scheffe: *L vs NL.*

Figura 23: DO de la proteína endoglina en los riñones de ratas con SQ y en los riñones ligado (L) y no ligado (NL) de ratas sometidas a OUU a los **17 días** después de la operación.. *Los datos se expresan como medias \pm EEM Diferencias estadísticas significativas, $p < 0,05$, según el test de Scheffe: *L vs NL.*

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS HISTOLÓGICOS, INMUNOHISTOQUÍMICOS Y DE NORTHERN Y WESTERN BLOT

El modelo de obstrucción ureteral por ligadura del uréter es un buen modelo experimental para inducir inflamación túbulo-intersticial y fibrosis (Klahr, 1991). Se caracteriza por una uremia ligera y transitoria y la ausencia de hipertensión. Desde el punto de vista histológico el modelo se caracteriza por un aumento de infiltrado de células mononucleares con proliferación de células intersticiales durante los primeros días después de la obstrucción ureteral. Hacia el día 17, los riñones obstruidos desarrollan fibrosis intersticial como lo demuestra el aumento en la síntesis de varias proteínas de la matriz extracelular, como son los colágenos tipo I, III y IV, la fibronectina y los proteoglicanos heparán sulfato (Sharma y cols., 1993). En nuestro estudio también aparece fibrosis túbulo-intersticial, como lo demuestran las imágenes histológicas e inmunohistoquímicas, donde se observa una acumulación de colágeno en el espacio túbulo intersticial.

Según los resultados de Northern blot, la síntesis de colágenos I y IV en el tiempo ocurre de un modo diferente. El RNAm de colágeno IV experimenta un aumento a las 24 horas de la OUU y luego disminuye a lo largo del estudio, aunque en el día 17 su expresión es todavía muy superior a la encontrada en condiciones basales. Sin embargo, el RNAm de colágeno I va aumentando progresivamente a lo largo del experimento, de manera que la mayor expresión la encontramos en el día 17. Estas diferencias pueden ser debidas a la distinta localización que tienen el colágeno I y el colágeno IV en el tejido. Mientras el colágeno IV se deposita mayoritariamente en la membrana basal, el colágeno I lo hace fundamentalmente en la matriz extracelular. Es posible que en las primeras horas haya más deposición de colágeno en las membranas basales, porque es la estructura más dañada tras la OUU, y por eso aumenta el RNAm de colágeno IV. Sin embargo, la OUU crónica provoca la acumulación de colágeno I y otros componentes de la matriz extracelular, desarrollándose de este modo la fibrosis intersticial. Esto explicaría el mayor aumento encontrado en el RNAm de colágeno I a los 17 días de la ligadura del uréter.

El RNAm de TGF- β 1 fue aumentando en el tiempo, al igual que el colágeno I. También otros autores han descrito un aumento en la expresión de TGF- β 1 en el riñón obstruido (Kaneto y cols, 1993; Pimentel y cols, 1995; Sutaria y cols, 1998). Este hecho confirma que el TGF- β 1 es uno de los principales factores implicados en la producción de fibrosis, como está descrito en la literatura (Border y Noble, 1998; Basile y cols., 1998).

Nuestro estudio demuestra también que en los riñones ligados de las ratas con fibrosis intersticial inducida por OUU, hay un incremento significativo en la expresión de endoglina si lo comparamos con la expresión en el riñón no ligado. Este hecho se demuestra con el RNAm, mediante la técnica de Northern blot, y con la proteína, mediante Western blot. El aumento en la expresión de endoglina no parece tener relación con la uremia puesto que ésta es transitoria (sólo hay aumento de creatinina en el primer día tras la OUU), y además el riñón contralateral, sometido a la misma uremia, tiene una expresión de endoglina similar a la encontrada en los riñones de los animales con SQ. Además, en el pulmón, un órgano con alta expresión de endoglina debido a su gran número de capilares, no hay diferencias en la expresión de esta molécula en ratas con OUU y ratas con SQ.

El mecanismo que explicaría el aumento en la expresión de endoglina después de la obstrucción ureteral no está claro, pero podría estar relacionado con la sobreexpresión de TGF- β 1 encontrada en el riñón ligado, como se ha descrito previamente. Además, los receptores de TGF- β 1 tipo I y II están sobreexpresados en el riñón ligado (Lastres y cols, 1996). La expresión de endoglina inducida por TGF- β 1 también se ha demostrado en monocitos humanos en cultivo y en la línea monocítica U-937 (Lastres y cols, 1996) y en nuestro laboratorio en cultivos de células mesangiales (Rodríguez-Barbero y cols, 2001). Por lo tanto, el aumento en la expresión de endoglina en riñones obstruidos parece ser una consecuencia del aumento en la expresión de TGF- β 1.

El significado biológico del aumento de la expresión de endoglina en el intersticio de riñones lesionados está por determinarse. La endoglina es un componente del sistema de receptores del TGF- β 1 (Barbara y cols., 1999) y probablemente funciona como un modulador de la interacción entre TGF- β y sus receptores señalizantes (Cheifetz y cols., 1992; Massagé y cols., 1994). Se sabe que los efectos pro-fibrogénicos del TGF- β tienen un papel importante en la glomeruloesclerosis y en la fibrosis intersticial que caracteriza a

la enfermedad renal progresiva. Por ejemplo, ratones transgénicos que sobreexpresan TGF- β 1 desarrollan glomeruloesclerosis aguda (Kopp y cols., 1996). El TGF- β 1 provoca acumulación de matriz extracelular por aumento en la producción mesangial de colágeno y fibronectina, suprimiendo la expresión de proteasas que degradan la matriz extracelular y aumentando la síntesis de proteínas inhibitoras de matriz extracelular (Poncelet y Schnaper, 1998; Tomooka y cols., 1992).

La endoglina funciona como un receptor auxiliar que contribuye a la regulación de algunas de las respuestas a TGF- β . Aunque no conocemos el mecanismo exacto de acción de la endoglina, sabemos que forma un complejo heteromérico con los receptores I y II (Yamashita y cols., 1994; Zhang H y cols., 1996), lo que puede conferir a la endoglina la capacidad de unirse a TGF- β . En la línea monocítica humana U-937, la endoglina regula la proliferación celular, la síntesis de RNAm de c-myc, la adhesión celular, la fosforilación de la molécula de adhesión celular de las plaquetas/endotelial 1 (PECAM-1) y la síntesis de componentes de la matriz extracelular como fibronectina (Lastres y cols., 1996). En mioblastos de rata, la sobreexpresión de endoglina regula el crecimiento celular y la síntesis del inhibidor del activador del plasminógeno (Letamendía y cols., 1998). Por todo esto, se puede especular que el aumento en la expresión de endoglina en las células renales contribuye a regular la estimulación por TGF- β de la producción de matriz extracelular. El resultado de este mecanismo sería una acción protectora de la endoglina para evitar un excesivo desarrollo fibrótico que sería tremendamente letal para el riñón.

CONCLUSIONES

Al finalizar el estudio hemos obtenido las siguientes conclusiones:

1.- En el modelo de OUU la función renal se mantiene gracias al riñón contralateral, que sufre un proceso de hipertrofia compensadora para poder hacer frente a la pérdida de funcionalidad que se produce en el riñón ligado.

2.- La presión arterial media aumenta ligeramente en los animales con OUU respecto a los animales con SQ. Este hecho puede ser debido a la estimulación de terminales del sistema nervioso vegetativo, que se produce como consecuencia de la distensión ureteral.

3.- En el riñón con el uréter ligado se desarrolla fibrosis túbulo-intersticial, como lo demuestran el aumento del peso renal, la observación al microscopio óptico del tejido renal, el análisis cuantitativo de la fibrosis y la sobreexpresión de colágenos.

4.- En los riñones de animales con fibrosis intersticial inducida por OUU se produce un incremento significativo en la expresión de endoglina respecto a los riñones contralaterales. Este aumento puede ser generado por la sobreexpresión de TGF- β 1 en el riñón ligado. La endoglina puede proteger al riñón contra los efectos profibrogénicos del TGF- β 1.

BIBLIOGRAFÍA

- Adam PJ, Clesham GJ, Weissberg PL: Expression of endoglin mRNA and protein in human vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 247:33-37, 1998.
- Attisano L, Wrana JL. Signal transduction by members of the transforming growth factor- β superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* 7:327-339, 1996.
- Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 12:141-179, 1994.
- Baker JC, Harland R. A novel mesoderm inducer, Madr2, functions in the activin signal transduction pathway. *Genes Dev* 10:1880-1889, 1996.
- Barajas L. Anatomy of the juxtaglomerular apparatus. *Am J Physiol* 237:F333-343, 1979.
- Barbara NP, Wrana JL, Letarte M. Endoglin is an accessory protein that interact with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor- β superfamily. *J Biol Chem* 274:584-594, 1999.
- Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor κ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 336:1066-1071, 1997.
- Basile DP, Martin DR, Hammerman MR. Extracellular matrix-related genes in kidney after ischemic injury: potential role for TGF- β in repair. *Am J Physiol* 275:F894-903, 1998.
- Beeuwkes R III. The vascular organization of the kidney. *Annu Rev Physiol* 42:531-542, 1980.
- Berne RM, Levy MN. Fisiología. Ediciones *Harcourt, S.A.* Tercera edición, 2001
- Bohle A, Müller GA, Wehrmann M, Mackensen-Haen S, Xiao JC. Pathogenesis of chronic renal failure in the primary glomerulopathies, renal vasculopathies and chronic interstitial nephritides. *Kidney Int* 54: S2-S9, 1996.
- Border WA, Noble NA. Cytokines in kidney disease: the role of transforming growth factor beta. *Am J Kidney Dis* 22:105-113, 1993.
- Border WA, Noble NA. Interactions of transforming growth factor-beta and angiotensin II in renal fibrosis. *Hypertension* 31:181-188, 1998.
- Border WA, Noble NA, Yamamoto T, Harper JR, Yamaguchi Y, Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Natural inhibitor of transforming growth factor- β protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature* 360:361-364, 1992.
- Border WA, Okuda S, Languino LR, Sporn MB, Ruoslahti E. Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor β 1. *Nature* 346:371-374, 1990.
- Bonsnes RW, Tausski HA. The colorimetric determination of creatinine of the Jaffé reaction. *J Biol Chem* 158:581-589, 1945.

- Brady HR, Adler S. Cell-cell and cell matrix interactions. The Kidney (5th edition), Philadelphia. *Saunders*, 193-210, 1996
- Brasier AR, Li J, Wimbish KA. Tumor necrosis factor activates angiotensinogen by the Rel A transactivator. *Hypertension* 27:1009-1017, 1996.
- Bulger RE, Dobyan DC. Recent advances in renal morphology. *Annu Rev Physiol* 44:147-179, 1982.
- Cheifetz S, Bellon T, Scales C, Vera S, Bernabeu C, Massague J, Letarte M. Endoglin is a component of the transforming growth factor beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* 267:19027-19030, 1992.
- Chen F, Weinberg RA. Biochemical evidence for the autophosphorylation and transphosphorylation of transforming growth factor β receptor Kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:1565-1569, 1995.
- Chen X, Rubock MJ, Whitman M. A transcriptional partner for MAD proteins in TGF- β signalling. *Nature* 383:691-696, 1996.
- Chevalier RL. Growth factors and apoptosis of neonatal urinary tract obstruction. *J Am Soc Nephrol* 7:1098-1105, 1996.
- Chevalier RL, Goyal S, Wolstenholme JT, Thornhill BA. Obstructive nephropathy in neonatal rat is attenuated by epidermal growth factor. *Kidney Int* 54:38-47, 1998.
- Chung KH, Gomez RA, Chevalier RL. Regulation of renal growth factors and clusterin by AT1 receptors during neonatal ureteral obstruction. *Am J Physiol* 268:F1117-F1123, 1995.
- Creely JJ, Dimari SJ, Howe AM, Haralson MA: Effects of transforming growth factor-b on collagen synthesis by normal rat kidney epithelial cells. *Am J Pathol* 140:45-55, 1992.
- Cryns V, Yuan J. Proteases to die for. *Genes Dev* 12:1551-1570, 1998.
- Dal Canton A, Stanziale R, Corradi A, Andreucci VE, Migone L. Effects of acute ureteral obstruction on glomerular hemodynamics in rat kidney. *Kidney Int* 12:403-411, 1977.
- Diamond JR, Kees-Folts D, Ding G, Frye JE, Restrepo NC. Macrophages, monocyte peptide-1 and TGF- β 1 in experimental hydronephrosis. *Am J Physiol* 266:F926-F933, 1994.
- Diamond JR, Kees-Folts D, Ricardo SD, Pruznak A, Eufemio M. Early and persistent up-regulated expression of renal cortical osteopontin in experimental hydronephrosis. *Am J Pathol* 136: 1455-1466, 1995.
- Diamond JR, Levinson M, Kreisberg R, Ricardo SD. Increased expression of decorin in experimental hydronephrosis. *Kidney Int* 51:1133-1139, 1997.
- Duan L, Morrissey J, McCracken R, Klahr S. Regulation of MCP-1, ICAM-I and VCAM-I during unilateral ureteral obstruction (abstract). *J Am Soc Nephrol* 7:1697, 1996.

- Dzau VJ, Burt DW, Pratt RE. Molecular biology of the renin angiotensin system. *Am J Physiol* 255:F563-573, 1988.
- Eddy AA. Molecular insights into renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 7:2495-2508, 1996.
- Edwards DR, Murphy G, Reynolds JJ, Whitman SE, Docherty AJP, Angel P, Heath JK: Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitors. *EMBO J* 6:1899-1904, 1987.
- Esteller A, Cordero M. Fundamentos de Fisiopatología. *McGraw Hill Interamericana*, Madrid, 1998.
- García del Moral R. Coloraciones para fibras colágenas y elásticas del tejido conjuntivo. Coloraciones para sustancia amiloidea. Laboratorio de Anatomía patológica, *McGraw-Hill Interamericana*, Madrid, 181-182, 1993.
- Geisterfer AAT, Peach ML, Owens GK. Angiotensin II induces hypertrophy not hyperplasia of cultured rat smooth muscle cells. *Circ Res* 62:749-756, 1988.
- Gobe GC, Axelsen RA. Genesis of renal tubular atrophy in experimental hydronephrosis in the rat. Role of apoptosis. *Lab Invest* 56:273-281, 1987.
- Gougos A, Letarte M. Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line. *J Immunol* 141:1925-1933, 1988.
- Gougos A, St-Jacques S, Greaves A, O'Connell PJ, d'Apice AJF, Buhning HJ, Bernabeu C, van Mourik JA, Letarte M. Identification of distinct epitopes of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of endothelial cells, leukemic cells, and syncytiotrophoblasts. *Int Immunol* 4:83-92, 1992.
- Guttmacher AE, Marchuk DA, White RI Jr. Hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med* 333 (14):918-924, 1995.
- Guyton AC. Tratado de Fisiología Médica. *Interamericana-McGraw-Hill*, 8ª edición, 1992.
- Harris KPG, Schreiner GF, Klahr S. Effect of leukocyte depletion on the function of the post-obstructed kidney in the rat. *Kidney Int* 36:210-215, 1989.
- Harris RH, Yarger WE. Renal function after relief of unilateral ureteral obstruction in rats. *Am J Physiol* 227(4):806-815, 1974.
- Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* 26:1821-1828, 1994.
- Ignatz R, Endo T, Massagué J: Regulation of fibronectin and type I collagen mRNA levels by transforming growth factor- β . *J Biol Chem* 262:6443-6446, 1987.

- Ignotz R, Massagué J. Transforming growth factor- β stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 261:4337-4345, 1986.
- Isaka Y, Brees DK, Ikegaya K, Kaneda Y, Imai E, Noble N, Border WA. Gene therapy by skeletal muscle expression of decorin prevents fibrotic disease in rat kidney. *Nature Medicine* 2:418-423, 1996.
- Ishidoya S, Morrissey J, McCracken R, Reyes A, Klahr S. Angiotensin II receptor antagonist ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis caused by unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int* 47:1285-1294, 1995.
- Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima SI, Shameshima M, Hase A, Seto Y, Nagata S. The polipeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 66:233-243, 1991.
- Johnson DW, Berg JN, Gallione CJ, McAllister KA, Warner JP, Helmbold EA, Markel DS, Jackson CE, Porteous ME, Marchuk DA. A second locus for hereditary hemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 12. *Genome Res* 5(1):21-28, 1995.
- Johnson RJ, Alpers CE, Yoshimura A, Lombardi D, Pritzl P, Floege J, Schwartz SM. Renal injury from angiotensin II-mediated hypertension. *Hypertension* 19:464-474, 1992.
- Kakuchi J, Ichiki T, Kiyama S, Hogan BL, Fogo A, Inagami T, Ichikawa I. Developmental expression of renal Angiotensin II receptor genes in the mouse. *Kidney Int* 47:140-147, 1995.
- Kaneto H, Morrissey J, Klahr S. Increased expression of TGF- β 1 mRNA in the obstructed kidney of rats with unilateral ligation. *Kidney Int* 44:313-321, 1993.
- Kaneto H, Morrissey J, McCracken R, Ishidoya S, Reyes A, Klahr S. The expression of mRNA for tumor necrosis factor α increases in the obstructed kidney of rats soon after unilateral ureteral ligation. *Nephrology* 2:161-166, 1996.
- Kaneto H, Morrissey J, McCracken R, Reyes A, Klahr S. Enalapril reduces collagen type IV synthesis and the expansion of the interstitium in the obstructed rat kidney. *Kidney Int* 45:1637-1647, 1994.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257, 1972.
- Klahr S. New insights into the consequences and mechanisms of renal impairment in obstructive nephropathy. *Am J Kidney Dis* 18:689-699, 1991.
- Klahr S. Obstructive nephropathy. *Kidney Int* 54:286-300, 1998.
- Klahr S, Harris KPG. Obstructive uropathy. Seldin DW, Giebisch G (editions). *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*, 2nd edition. *Raven Press*, New York, 3327-3369, 1992.

- Klahr S, Ishidoya S, Morrissey J. Role of angiotensin II in the tubulointerstitial fibrosis of obstructive nephropathy. *Am J Kidney Dis* 26:141-146, 1995.
- Klahr S, Morrissey J. Angiotensin II and gene expression in the kidney. *Am J Kidney Dis* 31:171-176, 1998.
- Klahr S, Morrissey J. Comparative study of ACE inhibitors and AII receptor antagonist in interstitial scarring. *Kidney Int* 52 (suplemento 63):S111-S114, 1997.
- Knox FG, Granger JP. Control of sodium excretion. The kidney produces under pressure. *News Physiol Sci* 2:26, 1987.
- Kohno M, Horio T, Ikeda M, Yokokawa K, Fukui T, Yasunari K, Kurihara N, Takeda T. Angiotensin II stimulates endothelin-1 secretion in cultures rat mesangial cells. *Kidney Int* 42:860-866, 1992.
- Kopp JB, Factor VM, Mozes M, Nagy P, Sanderson N, Böttinger EP, Klotman PE, Thorgeirsson SS. Transgenic mice with increased plasma levels of TGF-beta 1 develop progressive renal disease. *Lab Invest* 74:991-1003, 1996.
- Kuncio GS, Neilson EG, Haverty T. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *Kidney Int* 39:550-556, 1991.
- Lagna G, Hata A, Hemmati-Brivanlou A, Massagué J. Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF- β signalling pathways. *Nature* 383:832-836, 1996.
- Laster SM, Wood JG, Gooding LR. Tumor necrosis factor can induce both apoptotic and necrotic forms of cell lysis. *J Immunol* 141:2629-2634, 1988.
- Lastres P, Bellón T, Cabañas C, Sanchez-Madrid F, Acevedo A, Gougos A, Letarte M, Bernabeu C. Regulated expression on human macrophages of endoglin, an Arg-Gly-Asp-containing surface antigen. *Eur J Immunol* 22:393-397, 1992.
- Lastres P, Letamendía A, Zhang H, Rius C, Almendro N, Raab U, López LA, Langa C, Fabra A, Letarte M, Bernaéu C. Endoglin modulates cellular responses to TGF- β 1. *J Cell Biol* 133:1109-1121, 1996.
- Letamendía A, Lastres P, Botella LM, Raab U, Langa C, Velasco B, Attisano L, Bernabéu C. Role of endoglin en cellular responses to transforming growth factor β . A comparative study with betaglycan. *J Biol Chem* 273:33011-33019, 1998.
- López-Casillas F, Wrana JL, Massagué J. Beta-glycan presents ligand to the TGF- β signalling receptor. *Cell* 73:1435-1444, 1993.
- Mac Allister KA, Grogg KM, Johnson DW, Gallione CJ, Baldwin MA, Jackson CE, Helmbold EA, Markel DS, McKinnon WC, Murell J, Mac Cormick MK, Perick-Vance MA, Heutink P, Oostra BA, Haitjema T, Westerman CJJ, Porteus ME, Guttmacher AE, Letarte M, Marchuk DA: Endoglin, a TGF- β binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat Genet* 8:345-351, 1994.

- Macías-Silva M, Abdollah S, Hoodless PA, Pirone R, Attisano L, Wrana JL. MADR2 is a substrate of the TGF- β receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signalling. *Cell* 87:1215-1224, 1996.
- Madsen KM, Tisher CC. Structural-functional relationships along the distal nephron. *Am J Physiol* 250: F1-15, 1986.
- Marchuk DA. Genetic abnormalities in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Curr Opin Hematol* 5(5):332-338, 1998.
- Massagué, J. The transforming growth factor- β family. *Anal Biochem* 6:597-641, 1990.
- Massagué J, Attisano SL, Wrana SL: The TGF- β family and its composite receptors. *Trends Cell Biol* 4:172-178, 1994.
- Masseroli M, O'Valle F, Andújar M, Ramírez C, Gómez-Morales M, De Dios-Luna J, Aguilar M, Aguilar D, Rodríguez-Puyol M, Del Moral RG. Design and validation of a new image analysis method for automatic quantification of interstitial fibrosis and glomerular morphometry. *Lab Invest* 78 (5):511-522, 1998.
- Moody TE, Vaughan ED Jr, Gillenwater JY. Relationship between renal blood flow and ureteral pressure during 18 hours of total unilateral ureteral occlusion. *Invest Urol* 13:246-251, 1975.
- Morrison AR, Moritz H, Needleman P. Mechanism of enhanced renal prostaglandin biosynthesis in ureter obstruction. *J Biol Chem* 253:8210-8212, 1978.
- Morrissey J, Ishidoya S, McCracken R, Klahr S. Control of p53 and p21 (WAF1) expression during unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int* 50 (suplemento 57):S84-S92, 1996a.
- Morrissey J, Ishidoya S, McCracken R, Klahr S. Nitric oxide generation ameliorates the tubulointerstitial fibrosis of obstructive nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 7:2202-2212, 1996b.
- Morrissey J, Klahr S. Effect of AT2 receptor blockade on the pathogenesis of renal fibrosis. *Am J Physiol* 276 (1 Pt 2):F39-45, 1999.
- Nishikawa KA, Morrison AR, Needleman P. Exaggerated prostaglandin biosynthesis and its influence on renal resistance in the isolated hydronephrotic rabbit kidney. *J Clin Invest* 59:1143-1150, 1977.
- Ohta M, Tokuda Y, Kuge S, Okumura A, Tanaka M, Kubota M, Tajima T, Akatsuka A, Osamura RY, Tamaoki N, Mitomi T. *Jpn J Clin Oncol* 27(2):91-94, 1997.
- Ortiz A, Bustos C, Alcazar A, Lopez-Armada MJ, Plaza JU, Gonzalez E, Egido J. Involvement of tumor necrosis factor- α in the pathogenesis of experimental and human glomerulonephritis. *Advances in Nephrology*, editado por Grünfeld JP, Bach JF, KreisH, Maxwell MH. St. Louis, Mosby, 53-77, 1995.

- Pimentel JL Jr, Martínez-Maldonado M, Wilcox JN, Wang S, Luo C. Regulation of renin-angiotensin system in unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int* 44:390-400, 1993.
- Pimentel JL Jr, Sundell CL, Wang S, Kopp JB, Montero A, Martínez-Maldonado M. Role of angiotensin II in the expression and regulation of transforming growth factor- β in obstructive nephropathy. *Kidney Int* 48:1233-1246, 1995.
- Poncelet AC, Schnaper HW. Regulation of human mesangial cell collagen expression by transforming growth factor-beta 1. *Am J Physiol* 275:F458-F466, 1998.
- Postlewaite AE, Keski-Oja J, Moses HL, Kang AH. Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblast by transforming growth factor β . *J Exp Med* 165:251-268, 1987
- Quackenbush EJ, Gougos A, Baumal R, Letarte M. Differential localization within human kidney of five membrane proteins expressed on acute lymphoblastic leukemia cells. *J Immunol* 136:118-124, 1986.
- Raab U, Velasco B, Lastres P, Letamendia A, Cales C, Langa C, Tapia E, López Bote JP, Paez E, Bernabeu C. Expression of normal and truncated forms of human endoglin. *Biochem J* 339:579-588, 1999.
- Radeke HH, Resch K. The inflammatory function of renal glomerular mesangial cells and their interaction with the cellular immune system. *Clin Investig* 70:825-842, 1992.
- Raftery LA, Twombly V, Wharton K, Gelbart WM. Genetic screens to identify elements of the *decapentaplegic* signalling pathway in *Drosophila*. *Genetics* 139:241-254, 1995.
- Raij L, Keane WF. Glomerular mesangium: Its function and relationship to angiotensin II. *Am J Med*, 79 (Suplemento 3C):24-30, 1985.
- Roberts AB, Sporn MB. The transforming growth factors- β ; Sporn MB, Roberts AB (eds.). Handbook of Experimental Pharmacology. Peptide Growth Factors and Their Receptors. Berlin, Springer 419-472, 1990.
- Roberts AB, Sporn MB. Transforming growth factor β . *Adv Cancer Res* 51:107-145, 1988.
- Rodríguez-Barbero A, Obreo J, Eleno N, Rodríguez-Peña A, Düwel A, Jerkic M, Sánchez-Rodríguez A, Bernabéu C, López-Novoa JM. Endoglin expression in human and rat mesangial cells and its up-regulation by TGF- β 1. *Biochem Biophys Res Com* 282:142-147, 2001.
- Rodríguez-Peña A, Prieto M, Düwel A, Rivas JV, Eleno N, Pérez-Barriocanal F, Arévalo M, Smith JD, Vary CPH, Bernabéu C, López-Novoa JM. Up-regulation of endoglin, a TGF- β -binding protein, in rats with experimental renal fibrosis induced by renal mass reduction. *Nephrol Dial Transplant* 16:34-39, 2001.

- Rovin BH, Harris KPG, Morrison A, Klarh S, Schreiner GF. Renal cortical release of a specific macrophage chemoattractant in response to ureteral obstruction. *Lab Invest* 63:213-220, 1990.
- Roy-Chaudhury P, Simpson JG, Power DA. Endoglin, a transforming growth factor-beta-binding protein, is upregulated in chronic progressive renal disease. *Exp Nephrol* 5:55-60, 1997.
- Savill J. Apoptosis and the kidney. *J Am Soc Nephrol* 5:12-21, 1994.
- Schainuck LI, Striker GE, Cutler RE, Benditt EP. Structural-functional correlations in renal disease II. The correlations. *Hum Pathol* 1:631-641, 1970.
- Schlöndorff D. The role of chemokines in the initiation and progression of renal disease. *Kidney Int* 47 (suplemento 49): S44-S47, 1995.
- Schreiner GF, Harris KPG, Purkerson ML, Klahr S. Immunological aspects of acute ureteral obstruction: Immune cell infiltrate in the kidney. *Kidney Int* 34:487-493, 1988.
- Schumer M, Colombel MC, Sawezuk IS, Gobe G, Connor J, O'Toole KM, Olsson CA, Wise GJ, Buttyan R. Morphologic, biochemical, and molecular evidence of apoptosis during the reperfusion phase after brief periods of renal ischemia. *Am J Pathol* 140:831-838, 1992.
- Sharma AK, Mauer SM, Kim Y, Michael A. Interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *Kidney Int* 44:744-788, 1993.
- Shimizu T, Kuroda T, Hata S, Fukagawa M, Margolin SB, Kurokawa K. Pirfenidone improves renal function and fibrosis in the post-obstructed kidney. *Kidney Int* 54:99-109, 1998.
- Shovlin CL. Molecular defects in rare bleeding disorders: hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Thromb Haemost* 78(1):145-150, 1997.
- Siragy HM, Carey RM. The subtype-2 (AT2) angiotensin receptor regulates renal cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate and AT1 receptor-mediated prostaglandin E2 production in conscious rats. *J Clin Invest* 97:1978-1982, 1996.
- St Jacques S, Cymerman U, Pece N, Letarte M. Molecular characterization and in situ localization of murine endoglin reveal that it is a transforming growth factor- β binding protein of endothelial and stromal cell. *Endocrinology* 134:2645-2657, 1999.
- Striker GE, Schainuck LI, Cutler RE, Benditt EP. Structural-functional correlations in renal diseases I. A method for assaying and classifying histopathologic changes in renal disease. *Hum Pathol* 1:615-630, 1970.
- Sutaria PM, Ohebshalom M, McCaffrey TA, Vaughan ED Jr, Felsen D. Transforming growth factor-beta receptor types I and II are expressed in renal tubules and are increased after chronic unilateral ureteral obstruction. *Life Sci* 62:1965-1972, 1998

- Tisher CC. Anatomy of the Kidney, Brenner BM, Rector FC (ediciones). The Kidney. Philadelphia, Saunders, 1981.
- Tomooka S, Border WA, Marshall BC, Noble NA. Glomerular matrix accumulation is linked to inhibition of the plasmin protease system. *Kidney Int* 42:1462-1469, 1992
- Truong LD, Petrussevska G, Yang G, Gurmipar T, Shappell S, Lechago J, Rouse D, Suki WN: Cell apoptosis and proliferation in experimental chronic obstructive uropathy. *Kidney Int* 50:200-207, 1996.
- van de Kerkhof PC, Rulo HF, van Pelt JP, van Vlijmen Willems IM, De Jong EM. Expression of endoglin in the transition between psoriatic uninvolved and involved skin. *Acta Derm Venereol* 78(1):19-21, 1998.
- Vander AJ. Fisiología Renal. *Interamericana-McGraw-Hill*, cuarta edición, 1993.
- Vaughan ED Jr, Sorenson EJ, Gillenwater JY. Alterations in renal function immediately after release of acute total unilateral obstruction. *Invest. Urol.* 8:450-461, 1971.
- Wang JM, Kumar S, van Agthoven A, Kumar P, Pye D, Hunter RD. Irradiation induces up-regulation of E9 protein (CD105) in human vascular endothelial cells. *Int J Cancer* 62(6):791-796, 1995.
- Wendt T, Zhang YM, Bierhaus A, Kriegsmann J, Deng Y, Waldherr R, Teske T, Luther T, Fünfstuk R, Nawroth PP, Stein G. Tissue factor expression in an animal model of hydronephrosis. *Nephrol Dial Transplant* 10:1820-1828, 1995.
- Wieser R, Wrana JL, Massagué J. GS domain mutations that constitutively activate T β R-I, the downstream signalling component in the TGF- β receptor complex. *EMBO J* 14:2199-2208, 1995.
- Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massagué J. Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature* 370:341-347, 1994.
- Yamashita H, Ichijo H, Grimsby S, Moren A, ten Dijke P, Miyazono K. Endoglin forms a heterodimeric complex with the signalling receptors for transforming growth factor beta. *J Biol Chem* 269:1995-2001, 1994.
- Yarger WE. Urinary tract obstruction. Brenner BM, Rector FC (ediciones). The Kidney, 4th ed. WB Saunders, Philadelphia, 1768-1808, 1991.
- Zhang H, Shaw ARE, Mak A, Letarte M. Endoglin is a component of the transforming growth factor (TGF)- β receptor complex of human pre-B leukemic cells. *J Immunol* 156:565-573, 1996.
- Zhang Y, Feng X-H, Wu R-Y, Derynck R. Receptor associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF- β response. *Nature* 383:168-172, 1996.