

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

ALTERACIONES VASCULARES EN LA INSUFICIENCIA
RENAL CRÓNICA. PAPEL DEL ENDOTELIO

MARÍA DOLORES MAURICIO AVIÑÓ

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2007

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 17 de Maig de 2007 davant un tribunal format per:

- D. Francisco Javier Romero Gómez
- D^a. Sara Benedito Castellote
- D^a. Cristina Doménech Pérez
- D. Pascual Medina Besó
- D. Martín Aldasoro Celaya

Va ser dirigida per:

D. José M. Vila Salinas

D^a. Gloria Segarra Irles

D. Juan B. Martínez León

©Copyright: Servei de Publicacions
María Dolores Mauricio Aviñó

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-6803-9

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Artes Gráficas, 13 bajo

46010 València

Spain

Telèfon: 963864115



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA

DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA

**ALTERACIONES VASCULARES EN LA
INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA.
PAPEL DEL ENDOTELIO.**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

María Dolores Mauricio Aviñó

Dirigida por:

Dr. José M^a Vila Salinas

Dra. Gloria Segarra Irlles

Dr. Juan Martínez-León

Valencia, 2007

D. **José M^a Vila Salinas**, Catedrático de Fisiología de la Universidad de Valencia, Dña. **Gloria Segarra Irlles**, Profesora Contratada Doctora por la Universidad de Valencia y D. **Juan Martínez-León**, Profesor Titular de Cirugía de la Universidad de Valencia.

CERTIFICAN: Que **María Dolores Mauricio Aviñó** ha realizado bajo su dirección el presente trabajo titulado, “**Alteraciones vasculares en la insuficiencia renal crónica. Papel del endotelio**” para optar al Grado de Doctora.

Y para que así conste, firman la presente en Valencia a 12 de febrero de 2007.

Fdo.:

Dr. José M^a Vila

Fdo.:

Dra. Gloria Segarra

Fdo.:

Dr. Juan Martínez-León

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todo el equipo de investigación sin el cual nada de esto habría sido posible.

Al Dr. José María Vila, Catedrático de Fisiología y director de esta tesis, por orientarme y tener paciencia conmigo. Gracias por escucharme siempre y por ser como eres.

A la Dra. Gloria Segarra, Profesora Contratada Doctora de Fisiología y directora de este trabajo, por tu ayuda y apoyo en todo lo que he necesitado. Por guiar mis primeros pasos en el laboratorio y por tu amistad.

Al Dr. Juan Martínez-León, Profesor Titular de Cirugía y director de esta tesis, por su interés y ayuda en la realización de este trabajo.

Al Dr. Salvador Lluch, Catedrático de Fisiología, por haberme dado la oportunidad de formar parte de este grupo y contagiarme tu entusiasmo por la ciencia.

Al Dr. Pascual Medina, Profesor Contratado Doctor de Fisiología, gracias por prestarme tu ayuda incondicional y responder a mis dudas.

Al Dr. Martín Aldasoro, Profesor Titular de Fisiología, por ofrecerme esas charlas de las que siempre aprendo.

A Eva Serna y Belén Cortina, por tantos momentos dentro y fuera del laboratorio, gracias por hacer los días agradables, por vuestro apoyo, por ser más que compañeras, amigas. Sin vosotras nada de esto habría sido lo mismo.

A mis compañeras, con las que empecé Belén Torondel y Marta Peiró, hoy ya doctoras, por compartir los secretos del baño de órganos conmigo y por hacerlo siempre con una sonrisa. Al Dr. Carlos Hermenegildo, la Dra. Inma Noguera, la Dra. Susana Novella y a Laia Brines, por vuestra ayuda y los buenos momentos que hemos compartido.

Al Departamento de Fisiología, en especial a las secretarías por ser tan eficientes. A la Comisión de trasplantes y al Servicio de Cirugía Cardiovascular del Hospital Clínico Universitario de Valencia y a su director, Dr. Eduardo Otero. A la Dra. Marina Juez por la obtención de las muestras y por su amistad.

A mi familia, en especial a mis padres, por darme la mejor educación, por cuidar de mí, por apoyarme en mis decisiones y hacer posible que hoy esté aquí.

A Raimon, por haber sufrido esta tesis tanto como yo, por tu comprensión y ayuda. Por llenar mi vida.

Este trabajo ha sido subvencionado por el
Ministerio de Sanidad, Ministerio de
Educación y Generalitat Valenciana.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
Insuficiencia Renal Crónica.....	2
Papel de las prostaglandinas en la reactividad vascular.	5
Sistema DDAH-ADMA-NOS en la insuficiencia renal crónica.	8
Papel del factor hiperpolarizante derivado del endotelio	15
Canales de potasio	16
HIPÓTESIS	22
OBJETIVOS.....	25
MATERIAL Y MÉTODOS	27
Grupos de estudio	28
Procedencia de los segmentos venosos	29
Procedimiento experimental.....	32
1 Estudio de la respuesta vascular	32
1.1 Preparación de las muestras.....	32
1.2 Tensión pasiva óptima	34
1.3 Curvas concentración-respuesta	35
1.3.1 Nitroprusiato sódico	35
1.3.2 Acetilcolina.....	35

1.3.3 Cloruro potásico	38
1.3.4 Noradrenalina	38
1.3.5 Cloruro cálcico	39
1.4 Curvas frecuencia-respuesta.....	40
1.4.1 Estímulo eléctrico contráctil.....	40
1.5 Fármacos y soluciones	42
2 Estudio de la expresión génica	42
2.1 Recogida de muestras.....	42
2.2 Aislamiento de ARN a partir del tejido vascular	43
2.3 Integridad y concentración del ARN.....	44
2.4 PCR con transcripción inversa (RT-PCR)	45
2.4.1 Síntesis de ADNc: Transcripción inversa (RT).....	45
2.4.2 Amplificación del ADNc (RT-PCR en tiempo real)	46
Cálculos y análisis estadístico	55
RESULTADOS.....	57
1 Estudio de la respuesta vascular.....	58
1.1 Respuesta relajante	58
1.1.1 Respuesta al nitroprusiato sódico.....	58
1.1.2 Respuesta a la acetilcolina.....	58
Participación de prostaglandinas	62

Participación de óxido nítrico.....	62
Participación del factor hiperpolarizante derivado del endotelio.....	67
1.2 Respuesta contráctil.....	76
1.2.1 Respuesta al cloruro potásico	76
1.2.2 Respuesta a la noradrenalina	78
Participación de prostaglandinas	80
Participación de óxido nítrico.....	80
Participación de canales de potasio	88
1.2.3 Respuesta al estímulo eléctrico.....	96
Participación de prostaglandinas	98
Participación de óxido nítrico.....	99
Participación de canales de potasio	99
1.2.4 Respuesta al cloruro cálcico	105
2 Estudio de la expresión génica	110
DISCUSIÓN.....	115
Procedencia de los segmentos venosos	116
Ventajas y limitaciones del procedimiento experimental.....	117
Respuesta relajante	120
Respuesta contráctil.....	129
Respuesta a la noradrenalina	130

Índice

Respuesta al estímulo eléctrico	136
Estudio de la expresión génica	141
CONCLUSIONES FINALES	143
BIBLIOGRAFÍA.....	146

INTRODUCCIÓN

INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA

Una de las funciones renales más importantes consiste en la eliminación de productos de deshecho resultantes del metabolismo celular. Cuando disminuye la función renal, empiezan a acumularse en el organismo productos nitrogenados derivados del metabolismo proteico. Esta acumulación recibe el nombre de hiperazoemia, que inicialmente es asintomática, pero si la disminución de la función renal progresa llega un momento en que aparecen los síntomas clínicos y entonces hablamos de uremia. La **uremia** es el término que se aplica al síndrome clínico que resulta de la disminución marcada de la función renal, independientemente de la causa que determine el daño renal inicial. Esta situación lleva a la destrucción progresiva e irreversible de las nefronas que conduce a una **insuficiencia renal crónica**. En una fase inicial, la reducción en el número de nefronas tiene como consecuencia la hipertrofia estructural y funcional de las nefronas restantes, pero a medida que transcurre el tiempo, esta hipertrofia compensadora tiene una evolución desfavorable que conduce a la destrucción casi total del tejido funcional renal y a la disminución lenta y progresiva de la filtración glomerular.¹ La uremia se considera un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y accidentes cerebrovasculares.²

En estos pacientes es frecuente encontrar diversos factores de riesgo cardiovascular. Destacamos la hipertensión arterial,³ hiperhomocisteinemia,⁴⁻⁶ aterosclerosis⁷⁻¹⁰ o dislipemia,¹¹⁻¹⁴ que podrían desembocar en insuficiencia cardíaca, isquemia miocárdica o cerebral. Estos factores de riesgo constituyen las causas más frecuentes de muerte en la insuficiencia renal crónica.¹⁵ Existe además un incremento del producto calcio-fósforo,¹⁶ que puede participar en la formación de calcificaciones.^{3,17-20}

El tratamiento de la insuficiencia renal crónica se realiza sometiendo al paciente a sesiones de diálisis. Existen dos tipos, la hemodiálisis y la diálisis peritoneal. La hemodiálisis se realiza a través de una fístula arteriovenosa (acceso vascular permanente). Con pequeñas variaciones este proceso dura alrededor de cuatro horas y el paciente ha de repetirlo cada dos días. La diálisis peritoneal se lleva a cabo colocando un catéter en el interior del abdomen. A través de este catéter se introduce el líquido de diálisis en el abdomen y se deja de tres a cinco horas. La membrana peritoneal actúa como filtro y los productos de desecho pasan a través del peritoneo al líquido dializante que se extrae al finalizar la sesión. Esta técnica se repite de dos a cuatro veces al día en el caso de la diálisis peritoneal continua ambulatoria, o bien el paciente se somete a la sesión de diálisis por la noche mientras duerme.

La diálisis como tratamiento de los pacientes con insuficiencia renal crónica ha supuesto la prolongación de la vida para muchos enfermos. Sin embargo, también ha acarreado la aparición de complicaciones que han contribuido a un aumento de la morbilidad y mortalidad derivadas de alteraciones cardiovasculares. Una de las complicaciones cardiovasculares más frecuentes es la afectación del sistema nervioso autónomo.^{21,22} En estos pacientes se ha descrito un aumento de los niveles plasmáticos de noradrenalina,²³ mientras que otros autores señalan valores normales e incluso disminuidos.²⁴ Los factores etiológicos involucrados en la disfunción del sistema nervioso autónomo incluyen el tratamiento con agentes antihipertensivos, el estado urémico tóxico propiamente dicho y las enfermedades subyacentes como la diabetes y la amiloidosis.²⁵

Las alteraciones vasculares que se observan en la insuficiencia renal crónica podrían acompañarse de defectos en el propio órgano efector, es decir, un defecto en el músculo liso vascular. La función de la pared vascular no sólo depende de su morfología y de los mecanismos neurohumorales que regulan la contracción y relajación del músculo liso vascular, sino también de otros mecanismos que derivan de la presencia de un endotelio intacto. El endotelio normal elabora prostanoïdes y otras sustancias paracrinas que mantienen un equilibrio preciso entre

vasodilatación y vasoconstricción, coagulación y fluidez sanguínea, estímulo e inhibición del factor de crecimiento vascular y de la agregación plaquetaria. El endotelio también es capaz de intervenir en el metabolismo de sustancias vasoactivas circulantes tales como la adrenalina, serotonina, bradiquinina y angiotensina.^{26,27}

La función más relevante del endotelio con respecto a nuestro trabajo es la regulación del tono vascular. Esta regulación se ejerce mediante la síntesis y liberación de sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras que modulan el grado de contracción del músculo liso y la respuesta vascular a estímulos neurohumorales de diversa índole.²⁸

PAPEL DE LAS PROSTAGLANDINAS EN LA REACTIVIDAD VASCULAR.

Los prostanoïdes son compuestos lábiles de vida media corta, sintetizados a partir del ácido araquidónico en respuesta a gran variedad de estímulos, como las hormonas o los autacoides,^{29,30} que interaccionan con receptores de membrana acoplados a proteínas G. El complejo formado produce la activación directa de la fosfolipasa C y fosfolipasa A₂ y/o el aumento de concentraciones citosólicas de Ca²⁺ que incrementarán los niveles de ácido araquidónico.³¹ El ácido araquidónico, por la vía de la ciclooxigenasa, se metaboliza a

prostaglandina G_2 y ésta a su vez a prostaglandina H_2 .³² Ambas son endoperóxidos inestables precursores de los prostanoïdes entre los que destacaremos la prostaciclina (PGI_2) y el tromboxano A_2 (TXA_2), por su implicación en la regulación del tono vascular (Figura 1). La PGI_2 y el TXA_2 tienen acciones antagónicas ya que la primera es un potente agente vasodilatador y antiagregante plaquetario, mientras que el TXA_2 es un potente vasoconstrictor y agregante plaquetar.

La ciclooxigenasa (COX) es una enzima clave en la síntesis de prostanoïdes. Se ha descrito la existencia de dos isoformas de la ciclooxigenasa (COX-1 y COX-2), con diferencias entre ellas tanto en su papel fisiológico como en su distribución. La COX-1 se localiza en plaquetas, células endoteliales, mucosa gástrica y en el túbulo colector de la nefrona. Realiza funciones homeostáticas, contribuyendo al funcionamiento normal del riñón, la integridad de la mucosa gástrica y la hemostasia. La COX-2 se localiza de forma constante aunque poco abundante en numerosos tejidos (cerebro, órganos reproductores, hígado, hueso, aparato digestivo y riñón). Determinados estímulos fisiológicos e inflamatorios (interleucina-1, factor de necrosis tumoral, lipopolisacáridos, mitógenos, AMPc) son capaces de inducir la síntesis de esta enzima. Por ello, la COX-2 se considera una enzima inducible.

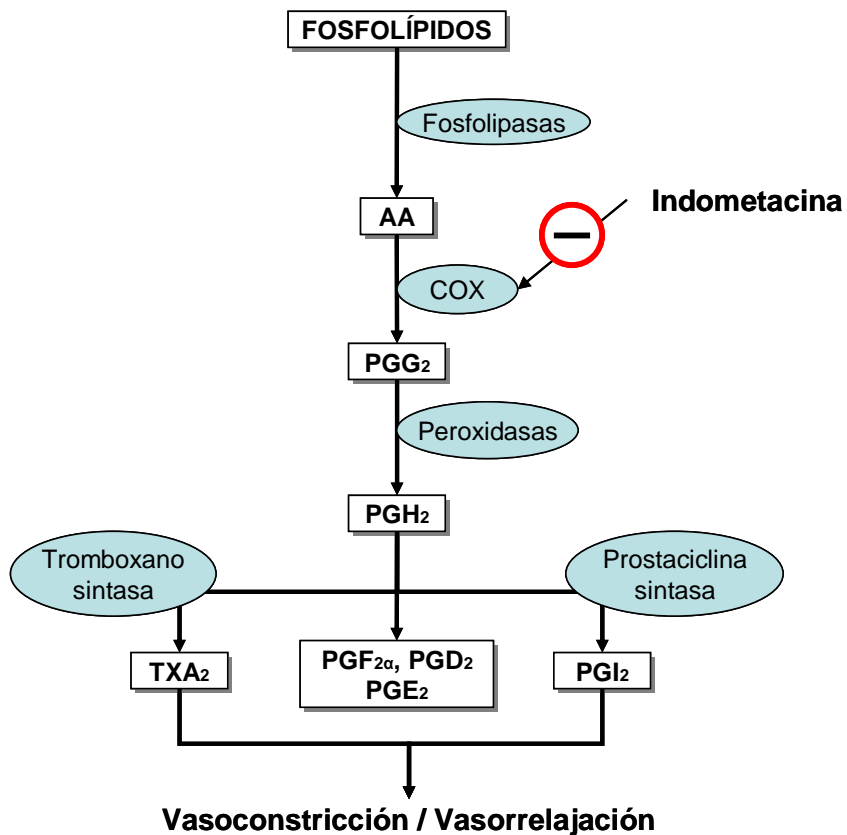


Figura 1: Biosíntesis del tromboxano A_2 (TXA_2) y de la prostaciclina (PGI_2). AA: ácido araquidónico, PG: prostaglandina.

Recientemente se ha visto que ambas isoformas se expresan de forma constitutiva en todas las regiones del riñón humano adulto pero con una localización distinta.³³ La COX-1 se ha relacionado con la síntesis de prostaglandinas contráctiles,³⁴ mientras que la COX-2 se ha observado que tiene mayor implicación en la síntesis de prostanoides relajantes.³⁵ A nivel

renal la COX-2 adquiere mayor relevancia por su papel en el mantenimiento del tono vasodilatador.

Las prostaglandinas juegan un papel importante en la función renal.³⁶ Los prostanoides más importantes en el riñón son la prostaglandina E₂ (PGE₂) y la PGI₂. La PGE₂ disminuye la reabsorción de sodio, por lo que la inhibición de su síntesis puede manifestarse clínicamente con un aumento de la presión arterial, edemas, ganancia de peso y ocasionalmente insuficiencia cardiaca.³⁷ La PGI₂ estimula la secreción de potasio y por tanto una disminución en su producción puede ocasionar hiperkalemia, sobre todo en pacientes con insuficiencia renal crónica.³⁷ Por sus efectos vasodilatadores, que ayudan a mantener la perfusión renal en condiciones de descenso del volumen circulatorio, la inhibición de la síntesis de PGI₂ puede producir en algunos pacientes un fallo renal agudo.³⁷

SISTEMA DDAH-ADMA-NOS EN LA INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA.

Una de las sustancias vasodilatadoras endoteliales más importantes es el óxido nítrico (NO). El NO se forma a partir del aminoácido L-arginina por la acción de una familia de enzimas, las sintasas de NO (NOS).³⁸ La liberación de NO aumenta al añadir L-arginina al medio de cultivo de células endoteliales y se inhibe en presencia del análogo de la L-arginina, N^G-monometil-

L-arginina (L-NMMA),³⁹ un inhibidor de la óxido nítrico sintasa (NOS) (Figura 2).

Se han aislado varias isoformas de la NOS que se han dividido en dos categorías con distinta regulación y actividad.⁴⁰ Las isoformas constitutivas endotelial (eNOS) o neuronal (nNOS), son calcio y calmodulina dependientes.⁴¹ La eNOS se localiza en células endoteliales, plaquetas y células mesangiales renales, la nNOS es de localización nerviosa y produce NO que actúa como neurotransmisor.⁴² Son inactivas hasta que los niveles de calcio intracelulares aumentan, la calmodulina se une al calcio y el complejo activa la NOS.⁴¹ La isoforma NOS inducible (iNOS) es calcio independiente y se expresa tras varios estímulos inflamatorios en las células endoteliales, células musculares lisas de la pared vascular y macrófagos. La cantidad de NO generada por la iNOS es siempre mayor que la generada por la NOS constitutiva.⁴³

La síntesis de L-arginina, el sustrato de la óxido nítrico sintasa y por tanto el precursor del NO, se da en el túbulo proximal. Gran parte de la L-arginina producida por el riñón entra en la circulación sistémica, siendo una pequeña porción utilizada por éste para producir urea. Por ello el riñón juega un papel importante en mantener los niveles de L-arginina constantes para que puedan ser utilizados por otros órganos.^{44,45} Así pues, pacientes con insuficiencia renal crónica deberían presentar

niveles plasmáticos de L-arginina disminuidos; sin embargo diversos autores describen niveles inalterados o incluso elevados en la uremia.⁴⁶⁻⁴⁹

Las acciones del NO se realizan a través de la guanilato ciclasa (GC) en la célula diana. La activación de la GC estimula la conversión de guanosín-5-trifosfato (GTP) a guanosín 3',5' cíclico monofosfato (GMPc) (Figura 2). La acumulación de GMPc en la célula conduce a una serie de acontecimientos cuyo resultado es la disminución del calcio citosólico y la inducción de relajación.⁵⁰ Este mecanismo es el mismo que utilizan compuestos como la nitroglicerina y el nitroprusiato sódico (nitrovasodilatadores). Estos compuestos, cuya eficacia clínica se conoce desde hace mucho tiempo, liberan NO al músculo liso vascular, de forma espontánea o a través de una reacción enzimática.^{27,50}

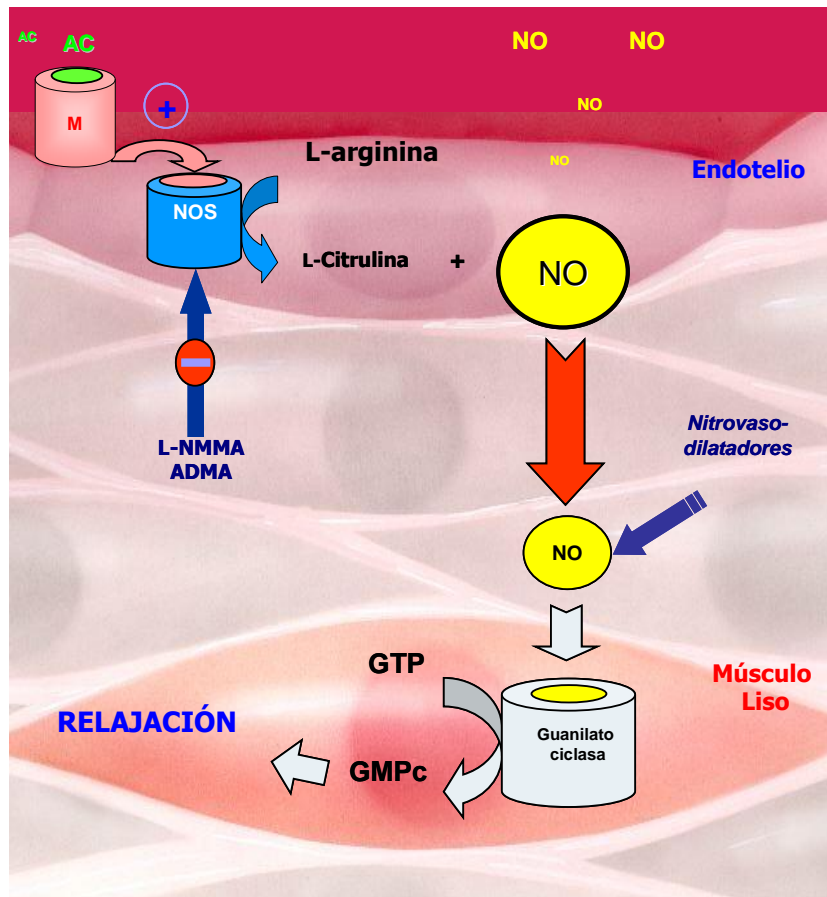


Figura 2: Esquema de la vía de formación de NO y relajación vascular a través del GMPc.

AC: Acetilcolina; *M:* receptor muscarínico; *NOS:* óxido nítrico sintasa *L-NMMA*, *N^G-monometil-L-arginina*; *ADMA*, *N^G,N^G-dimetilarginina asimétrica*; *GTP*, guanosín-5-trifosfato; *GMPc*, guanosín 3',5' cíclico monofosfato; +, estímulo; -, inhibición.

El NO liberado por el endotelio vascular es uno de los principales responsables de la vasodilatación inducida por diversas sustancias (acetilcolina, bradiquinina, sustancia P, ionóforo de calcio A-23187).^{51,52}

El sistema endotelio-NO desempeña un papel fundamental en la regulación de la filtración glomerular y reabsorción tubular en condiciones fisiológicas.⁵³ Asimismo una alteración en la función renal produce anomalías en el sistema endotelio-NO.⁵⁴ Por ejemplo, en la insuficiencia renal crónica hay un aumento de la concentración plasmática de N^G, N^G-dimetil-L-arginina asimétrica (ADMA), un inhibidor endógeno de la síntesis de NO que puede contribuir a la aparición de complicaciones cardiovasculares y neurológicas de la uremia.⁵⁵ Otros compuestos como metilguanidina y N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA) también están aumentados en el plasma de pacientes con insuficiencia renal crónica y se comportan como “toxinas urémicas”.⁵⁵ Estos compuestos inhiben la relajación endotelio-dependiente en vena safena⁵⁶ y en arteria cerebral humana.⁵⁷

Por tanto, parece probable que el sistema endotelio-NO pueda tener un papel fundamental en la patogénesis de las alteraciones vasculares que pueden aparecer en la uremia. Sin embargo, no existen datos concluyentes relativos a la reactividad vascular en la uremia y su posible relación con un desequilibrio en la producción o actividad de factores endoteliales.

El NO juega un papel importante en el mantenimiento del tono vascular. Existen discrepancias en cuanto a los niveles plasmáticos de NO en la uremia; cabría esperar una disminución de NO ya que el aumento de toxinas urémicas inhibe su síntesis.⁵⁵ Algunos autores describen la existencia de niveles bajos de NO en los pacientes con insuficiencia renal crónica,^{58,59} mientras que otros demuestran que los niveles de NO están elevados en el plasma de estos pacientes.^{54,60} Los pacientes hemodializados están expuestos a factores que inhiben la NOS como son los compuestos guanidino. Al mismo tiempo, también están expuestos a factores que estimulan la síntesis de NO, como las citoquinas generadas durante el proceso de diálisis.⁶¹ Los niveles de NO en el plasma de pacientes urémicos sometidos a hemodiálisis tampoco están bien definidos. Algunos autores afirman que después de una sesión de hemodiálisis los compuestos guanidino disminuyen significativamente y esto hace que aumenten los niveles de NO en sangre.⁶² Por el contrario, otros autores muestran que el ADMA y el SDMA apenas son eliminados durante la hemodiálisis.⁶³

La dimetilarginina dimetilaminohidrolasa (DDAH) es la enzima encargada de hidrolizar el ADMA y el L-NMMA a L-citrulina⁶⁴ y de este modo regula la actividad de la NOS.⁶⁵ En humanos, las concentraciones plasmáticas de ADMA son diez

veces mayores que las de L-NMMA,⁵⁵ aunque la concentración necesaria de ambas toxinas para inhibir la NOS es similar.

La DDAH está presente en muchos tejidos humanos como riñón, hígado, pulmón, páncreas, cerebro, células endoteliales de los vasos sanguíneos, glóbulos blancos y glóbulos rojos.^{64,66,67} Existen al menos dos isoformas de la DDAH que presentan una actividad similar.⁶⁸ La DDAH-1 se expresa predominantemente en tejidos donde se expresa la NOS neuronal (cerebro, hígado, páncreas y riñón)^{66,68-72} mientras que la DDAH-2 la encontramos mayoritariamente en tejidos que expresan la NOS endotelial (corazón, pulmón y placenta).^{68,72} En el músculo esquelético el porcentaje de ambas isoformas es similar.⁶⁸ En el músculo liso vascular se ha demostrado la existencia de ambas isoformas, pero no se ha determinado cual de ellas es la predominante.⁷³

El papel de la DDAH ha sido estudiado en algunas enfermedades crónicas como la hipercolesterolemia en la que se ha observado una disminución de la actividad de la DDAH en aorta, riñón e hígado, que conllevaría a una disfunción endotelial por aumento de los niveles de ADMA.⁷⁴ En ratas con hipertensión pulmonar, disminuye la expresión proteica de la DDAH-1⁷⁵ en tejido pulmonar mientras que en perros con insuficiencia renal disminuye la expresión génica de la DDAH-2 en el tejido renal.⁷⁶ El papel de la DDAH en pacientes urémicos

no está muy estudiado, sin embargo puede tener gran importancia en el desarrollo de la enfermedad.

PAPEL DEL FACTOR HIPERPOLARIZANTE DERIVADO DEL ENDOTELIO

Diversos estudios han puesto de manifiesto la persistencia de relajación a la acetilcolina estando inhibida la formación de prostaciclina y de NO, confirmando la existencia de un tercer factor relajante endotelial.⁷⁷ Este factor produce hiperpolarización de la membrana de las células del músculo liso por lo que se le ha denominado factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF).⁷⁸⁻⁸⁰

Se ha demostrado la participación conjunta del NO y del EDHF en la relajación dependiente del endotelio en arteria coronaria⁸¹ y cerebral humana.⁸² Además, parece que la participación del EDHF en la relajación endotelio-dependiente sea mayor a medida que disminuye el tamaño del vaso⁸³ mientras que en vasos de mayor calibre, el principal responsable sería el NO. Es posible que en circunstancias normales el NO y el EDHF actúen sinérgicamente, de forma que cada factor potencie los efectos del otro.⁸⁴ Sin embargo, también se ha descrito que la síntesis de NO inhibe la actividad vascular del EDHF, por lo que es posible que en diversas patologías en las que la síntesis de NO esté disminuida, la producción y los efectos del EDHF puedan

incrementarse para paliar, en parte, la carencia de NO.⁸⁵ En estos casos el EDHF contribuiría en mayor medida a mantener la relajación dependiente del endotelio, adquiriendo más importancia en la homeostasia vascular. Se han propuesto diversas sustancias que podrían actuar como EDHF, entre ellas, el ácido epoxieicosatrienoico,⁸⁶⁻⁸⁸ el peróxido de hidrógeno,^{89,90} la anandamida⁹¹ o el péptido natriurético tipo C.⁹² Hay autores que relacionan el mecanismo de acción del EDHF con las uniones estrechas del músculo liso,^{93,94} pero la teoría más aceptada es la que implica a los canales de potasio.⁹⁵

Canales de potasio

El ión potasio se distribuye tanto en el líquido intracelular (140 mEq/l) como en el extracelular (4,5 mEq/l). Esta diferencia en las concentraciones tiene gran importancia en el potencial de membrana. Lo más importante en la génesis del potencial de membrana es la salida de potasio, que por su concentración tiende a salir de la célula. La bomba sodio-potasio, que introduce dos iones potasio en la célula y extrae tres iones sodio juega un papel importante en el mantenimiento del potencial de membrana. Este mecanismo aumenta la cantidad de potasio y disminuye la cantidad de sodio a nivel intracelular.

El potasio y el calcio juegan un papel importante en la contracción del músculo liso vascular. Los canales de calcio

regulados por voltaje se abren permitiendo la entrada de éste a la célula y produciendo contracción. Cuando los canales de potasio se abren, sale potasio de la célula, en consecuencia, la membrana se hiperpolariza, los canales de calcio se cierran y el calcio intracelular disminuye produciendo relajación. Por el contrario, cuando se cierran los canales de potasio, se produce despolarización y activación de canales de calcio, entrada de este ión y por tanto contracción del músculo liso⁹⁶ (Figura 3).

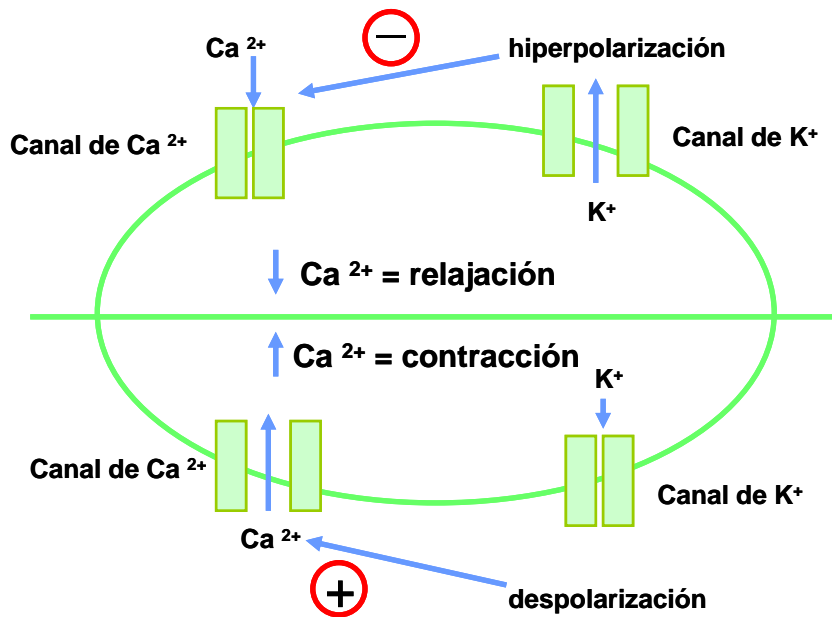


Figura 3: Interacción entre canales de K^+ y Ca^{2+} Participación de éstos en la contracción y relajación vascular.

Tipos de canales de potasio

Se han descrito cuatro tipos de canales de K^+ a nivel vascular: los regulados por voltaje; los sensibles a ATP, los rectificadores internos y los regulados por calcio.⁹⁷

Los **canales de K^+ dependientes de voltaje (Kv)** del músculo liso vascular se activan con la despolarización de la membrana. La 4-aminopiridina es un fármaco ampliamente utilizado como bloqueante de los canales Kv. Al incubar un segmento vascular con 4-aminopiridina se produce una despolarización y contracción del músculo liso vascular sugiriendo que la actividad de los canales Kv existe en condiciones basales en algunos vasos sanguíneos.⁹⁸⁻¹⁰¹ Los canales Kv pueden ser activados por AMPc^{102,103} o por NO vía GMPc^{100,104,105} y pueden ser bloqueados por la proteína quinasa C en algunos lechos vasculares.¹⁰⁶

Los **canales de K^+ sensibles al ATP (K_{ATP})** habitualmente están inhibidos por el ATP intracelular. La glibenclamida es un inhibidor selectivo de estos canales, generalmente no tiene efectos sobre el tono vascular, aunque hay algunas excepciones.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ Diversos fármacos pueden inducir vasodilatación por activación de los canales K_{ATP} ^{107,110,111} y por tanto influir en el mantenimiento del tono vascular. Hay algunos estímulos vasodilatadores endógenos como la hipoxia, la acidosis o sustancias que incrementan los niveles intracelulares de AMPc

como la adenosina, la prostaciclina o la noradrenalina que pueden ejercer sus efectos vasculares en parte por la activación de los canales K_{ATP} .^{110,112} Por ejemplo, en el *shock* séptico, la hipoxia disminuye los niveles de ATP, causando la apertura de los canales K_{ATP} , la membrana se hiperpolariza y el músculo liso se relaja, lo que se suma a los mecanismos clásicos de vasodilatación en el *shock* séptico.

Los **canales rectificadores de K^+ (K_{IR})** son activados por hiperpolarización e inhibidos por bario. Se postula que participan en la vasodilatación por hiperkalemia. Al bloquear los canales K_{IR} la corriente de entrada de potasio a la célula muscular lisa es mayor que la de salida.^{107,110,113}

En condiciones basales, un pequeño incremento sobre la concentración extracelular de potasio (de 3 a 5 mM) produce un aumento de la salida de potasio a través de los canales K_{IR} . Cuando el incremento es ligeramente mayor a 5 mM, pero menor que 10 mM en el medio extracelular, como ocurre durante la activación neuronal o muscular¹¹⁴⁻¹¹⁶ puede ocasionar una hiperpolarización y por tanto una relajación debida a la salida de potasio a través de los canales K_{IR} .¹¹⁷⁻¹²²

El bloqueo selectivo de estos canales usando cloruro de bario causa despolarización y vasoconstricción,^{117,119,120,122} lo que

indica que los canales K_{IR} pueden estar activos en condiciones basales.

Los **canales de K^+ activados por calcio (BK_{Ca})** se activan por el calcio intracelular, las proteínas quinasas A y G y por la despolarización de la membrana celular. Son especialmente abundantes en las células de la musculatura lisa vascular.^{110,111} Se activan en respuesta tanto a agentes vasoconstrictores como dilatadores.⁹⁷

La liberación de calcio del retículo sarcoplásmico regula la función de los canales BK_{Ca} y por tanto el potencial de membrana y el tono vascular.^{109,123} La entrada de calcio produce contracción del músculo liso vascular. El aumento de calcio intracelular determina que este ión se una al receptor de rianodina que se encuentra en el retículo sarcoplásmico e induzca la liberación de más calcio; con ella se activan los canales BK_{Ca} , cuya apertura permite la salida de potasio.⁹⁷ La importancia de este fenómeno radica en que la contracción causa salida de potasio que hiperpolariza la membrana y por tanto atenúa la contracción del músculo liso. Los receptores de rianodina están en íntimo contacto con los canales BK_{Ca} y por lo tanto permiten esta retroalimentación negativa.¹²³

Los canales BK_{Ca} pueden ser de tres tipos; de alta conductancia, intermedia y baja.^{124,125} Hay fármacos, como el tetraetilamonio, que inhiben los tres tipos de canales BK_{Ca}.

HIPÓTESIS

El sistema DDAH-ADMA-NOS tiene un papel fundamental en la patogénesis de las alteraciones vasculares que pueden aparecer en la uremia. Los pacientes con insuficiencia renal crónica muestran un incremento de los niveles plasmáticos de ADMA y L-NMMA, inhibidores endógenos de la NOS. El ADMA es considerado un factor de riesgo de aparición de complicaciones cardiovasculares en estos pacientes, debido a su interacción con el sistema endotelio-NO. El papel del EDHF puede llegar a adquirir gran importancia cuando existan alteraciones en el sistema endotelio-NO.

HIPÓTESIS ESPECÍFICAS:

1. La disfunción del endotelio y del músculo liso vascular pueden constituir los elementos básicos responsables de la respuesta vascular anormal.
2. Los experimentos *in vitro* utilizando pequeños segmentos venosos humanos pueden revelar de forma fiable los efectos de la uremia sobre la respuesta funcional de la pared vascular.
3. La uremia produce lesiones en las terminaciones nerviosas vasculares que podrían modificar la respuesta al estímulo neurógeno.

4. La expresión de la DDAH, enzima responsable de la degradación de ADMA y L-NMMA, podría estar disminuida en pacientes con insuficiencia renal crónica, siendo la causa del aumento de los niveles plasmáticos de éstos.

5. Alteraciones en la expresión de enzimas implicadas en la reactividad vascular como la COX, la NOS o los canales de K⁺ activados por Ca²⁺ podrían ser los responsables de una respuesta vascular anormal en estos pacientes.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Analizar la respuesta en segmentos de vena cefálica de enfermos con insuficiencia renal crónica a estímulos farmacológicos capaces de revelar una disfunción vascular, en la que puede estar implicado el sistema DDAH-ADMA-NOS.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar tanto la respuesta vascular relajante (a la acetilcolina) como la contráctil (al KCl, a la noradrenalina y al estímulo eléctrico) en la vena cefálica de individuos sanos y de pacientes con insuficiencia renal crónica.
2. Estudiar la participación de los factores endoteliales en la respuesta vascular a diferentes estímulos y las alteraciones que puede causar la uremia.
3. Estudiar la expresión génica de las enzimas DDAH-1, eNOS, COX-1 y COX-2 y de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} , para determinar si la uremia modifica su expresión.
4. Valorar el tratamiento con hemodiálisis sobre la respuesta vascular y la expresión génica.

MATERIAL Y MÉTODOS

GRUPOS DE ESTUDIO

El estudio se realizó utilizando muestras de vena cefálica de diversos sujetos divididos en tres grupos.

Pacientes con insuficiencia renal crónica de etiología diversa divididos en dos grupos:

1. **NO DIALIZADOS.** Se realiza la fístula por primera vez en el brazo no dominante para la instauración de hemodiálisis.
2. **HEMODIALIZADOS.** Pacientes que ya han sido dializados durante un tiempo determinado (más de un año) y que necesitan una nueva fístula arteriovenosa en el brazo dominante debido al fracaso de la fístula original en el brazo no dominante por diversas causas.

Las intervenciones quirúrgicas se realizaron por personal del Servicio de Cirugía Vascular del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

Sujetos Control: fueron donantes de órganos de los cuales se obtuvieron segmentos venosos con las mismas características de localización anatómica y diámetro externo.

Las extracciones se realizaron por personal de la Comisión de Trasplantes de la Conselleria de Sanidad.

Las características de los diferentes grupos de estudio se recogen en la tabla 1.

El proyecto cuenta con los informes favorables de la Dirección del Hospital Clínico y de la Comisión Ética de Investigación y el consentimiento escrito de cada paciente.

PROCEDENCIA DE LOS SEGMENTOS VENOSOS

Todos los experimentos se llevaron a cabo en segmentos (3 mm de longitud) de ramas de vena cefálica obtenidos durante intervenciones quirúrgicas para la realización de fístulas arteriovenosas en enfermos con insuficiencia renal crónica o durante el transcurso de la extracción de órganos para trasplante. En el primer caso, el procedimiento quirúrgico es el que se utiliza de rutina en el Hospital Clínico Universitario de Valencia. La fístula se realiza entre la arteria radial y la vena cefálica mediante una anastomosis término-lateral. La técnica quirúrgica utilizada fue la de Brescia,¹²⁶ con las modificaciones descritas en revisiones especializadas. En general, la fístula se localizó unos centímetros por encima de la articulación de la muñeca (Figura 4).

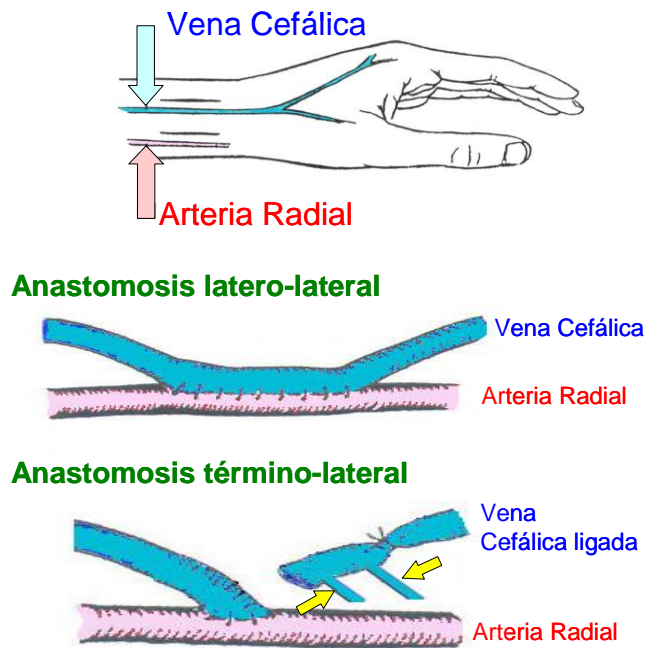


Figura 4. Esquema de la localización de la arteria radial y vena cefálica y tipos de anastomosis. Las flechas en el esquema de la anastomosis término-lateral señalan las ramas utilizadas en este trabajo. (Esquema modificado de Bell y Wood).

Tabla 1. Características de los grupos de estudio.

	Controles (Explantos) (n=15)	Pacientes no dializados (n=28)	Pacientes dializados (n=23)
Género (H/M)	8/7	18/10	14/9
Edad (años)	47 ± 3	64 ± 2	61 ± 4
Años de hemodiálisis			5 ± 1
Glomerulonefritis		17	11
Nefropatía quística		4	5
Nefritis intersticial		3	5
Desconocida		4	2
Traumatismo craneoencefálico	9		
Infarto de miocardio	3		
Hemorragia cerebral	2		
Isquemia cerebral	1		

H, hombre. M, Mujer. n= número de sujetos.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

1 Estudio de la respuesta vascular

1.1 Preparación de las muestras

La limpieza de los segmentos procedentes de la vena cefálica se realizó en una placa de Petri con solución salina (NaCl 0,9%) fría, bajo una lupa de disección (Wild M3C) iluminada con luz fría. Los segmentos venosos se cortaron en anillos de 3 mm de longitud y se montaron en un sistema para el registro de la tensión isométrica (Figura 5). La preparación experimental consiste en introducir dos alambres rígidos (300 μm de diámetro) de acero inoxidable a través de la luz del anillo vascular. Uno de los alambres está unido a un soporte que a su vez se fija a la pared del baño de órganos; el otro alambre, que es móvil y se desplaza paralelamente al anterior, se conecta a un transductor de fuerza (FT03 Grass Instruments). Cada segmento vascular, con los alambres introducidos en su luz, se coloca en un baño de órganos que contiene 4 ml de solución fisiológica cuya composición es la siguiente (en mM): NaCl 115; KCl 4,6; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1,2; CaCl_2 2,5; NaHCO_3 25; glucosa 11,1 y EDTA disódico 0,01.

Esta solución se equilibra con una mezcla gaseosa (95% O_2 y 5% CO_2) que proporciona un pH entre 7,3 - 7,4. La

temperatura de la solución se mantuvo a 37 °C durante todo el experimento. Un tornillo micrométrico unido al transductor de fuerza permite aplicar al anillo vascular la tensión pasiva adecuada separando los alambres. Los cambios de tensión isométrica se registraron en un ordenador Macintosh utilizando un software Chart v3.4/s y un sistema de adquisición de datos MacLab /8e (AD Instruments).

La integridad funcional del endotelio se comprobó observando la presencia de relajación provocada por la acetilcolina (10^{-7} - 10^{-6} M) en anillos previamente contraídos con noradrenalina (10^{-7} - 3×10^{-7} M).

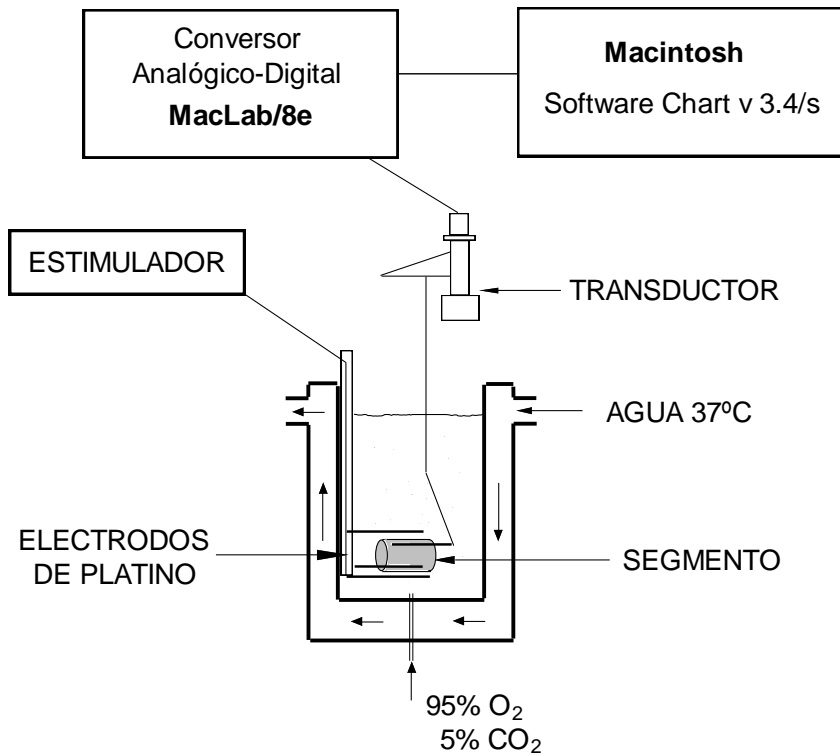


Figura 5. Esquema del baño de órganos y preparación experimental utilizada para el registro de la tensión isométrica.

1.2 Tensión pasiva óptima

Antes de analizar la respuesta de los anillos venosos a los diversos estímulos, se procedió a determinar la tensión basal óptima en un grupo de experimentos preliminares en anillos de longitud y diámetro semejantes a los experimentales. Para ello se registró la contracción inducida por el KCl (100 mM) después de exponer los anillos venosos a diversas tensiones pasivas (1, 2, 3 y 4 g). La tensión pasiva a la que se obtuvo la mayor respuesta

contráctil al KCl se consideró como la tensión óptima de reposo. La tensión pasiva óptima para los segmentos de vena cefálica fue de 2 g.

1.3 Curvas concentración-respuesta

Se construyeron curvas concentración-respuesta al nitroprusiato sódico para estudiar la relajación independiente de endotelio, a la acetilcolina (10^{-9} - 10^{-5} M) para revelar la relajación endotelio-dependiente, al cloruro potásico (5-100 mM) para estudiar la capacidad contráctil del músculo liso independiente de receptor, a la noradrenalina (10^{-9} - 10^{-5} M) para estudiar la capacidad contráctil de la vena cefálica dependiente de receptor y al cloruro cálcico (10^{-4} - 3×10^{-2} M) para determinar la influencia del calcio extracelular en la contracción del músculo liso.

1.3.1 Nitroprusiato sódico

La respuesta relajante al nitroprusiato sódico fue estudiada en venas de los tres grupos contraídas previamente con noradrenalina (10^{-7} M) para comprobar la capacidad relajante del músculo liso vascular independiente de endotelio.

1.3.2 Acetilcolina

La respuesta relajante a la acetilcolina fue estudiada en venas contraídas con noradrenalina (10^{-7} M) de los tres grupos de

individuos, en ausencia de inhibidores (respuesta control) y en presencia de:

- Indometacina (10^{-5} M), inhibidor de la COX
- L-NMMA (10^{-4} M), inhibidor de la NOS
- L-NMMA (10^{-4} M) más L-arginina (10^{-3} M), sustrato de la NOS para revertir la inhibición por L-NMMA
- Indometacina (10^{-5} M) más L-NMMA (10^{-4} M)
- Indometacina (10^{-5} M), L-NMMA (10^{-4} M) y KCl (20 mM) para inhibir la producción de prostaglandinas, NO y bloquear los canales de K^+

Para estudiar la naturaleza de los canales de K^+ , se realizaron curvas concentración-respuesta a la acetilcolina en presencia de distintos bloqueantes de dichos canales. En estos experimentos, la curva control de relajación a la acetilcolina se obtuvo siempre previa inhibición de la COX y de la NOS con indometacina (10^{-5} M) y L-NMMA (10^{-4} M) respectivamente. En estas condiciones se administraron diferentes bloqueantes de los canales de K^+ :

- Cloruro de tetraetilamonio (TEA, 10^{-3} M); bloqueante de los canales de K^+ activados por Ca^{2+}

- Iberiotoxina (10^{-7} M); un bloqueante de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} de alta conductancia
- Charibdotoxina (10^{-7} M); bloqueante de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} de intermedia y alta conductancia
- Apamina (10^{-6} M); bloqueante de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} de baja conductancia
- Iberiotoxina (10^{-7} M) más apamina (10^{-6} M)
- Charibdotoxina (10^{-7} M) más apamina (10^{-6} M)
- Glibenclamida, (10^{-5} M); bloqueante selectivo de los canales de K^+ sensibles a ATP
- Cloruro de bario ($BaCl_2$, 3×10^{-6} M); bloqueante de los canales rectificadores de K^+
- Ouabaina (10^{-3} M); inhibidor de la bomba Na^+-K^+ más $BaCl_2$, (3×10^{-6} M)

1.3.3 Cloruro potásico

La capacidad de contracción del músculo liso vascular se comprobó por su respuesta al KCl. Se realizaron curvas concentración-respuesta al KCl en los tres grupos de estudio (5-100 mM).

1.3.4 Noradrenalina

La respuesta contráctil a la noradrenalina fue estudiada en segmentos de vena cefálica de los tres grupos en las siguientes condiciones:

- En ausencia de inhibidores (respuesta control)
- En presencia de indometacina (10^{-5} M) para inhibir la síntesis de prostaglandinas
- En presencia de L-NMMA (10^{-4} M) para inhibir la producción de NO
- En presencia de L-NMMA (10^{-4} M) más L-arginina (10^{-3} M)
- En presencia de indometacina (10^{-5} M) y L-NMMA (10^{-4} M)

Para estudiar la naturaleza de los canales de K^+ , se realizaron curvas concentración-respuesta a la noradrenalina en presencia de indometacina y L-NMMA, que se tomó como control y en presencia de los bloqueantes de los canales de K^+ :

- Iberiotoxina (10^{-7} M)
- Charibdotoxina (10^{-7} M)
- Apamina (10^{-6} M)
- Iberiotoxina (10^{-7} M) más apamina (10^{-6} M)
- Charibdotoxina (10^{-7} M) más apamina (10^{-6} M)
- Glibenclamida (10^{-5} M)

Todas las curvas se realizaron utilizando segmentos venosos diferentes. Las curvas que se realizaron en presencia de los distintos inhibidores, se construyeron tras un período de incubación de 20 minutos.

1.3.5 Cloruro cálcico

Para estudiar la intervención del Ca^{2+} intra y extracelular en la respuesta contráctil de segmentos de vena cefálica, se incubó un grupo de anillos (correspondientes a los tres grupos de estudio) con una solución despolarizante desprovista de Ca^{2+} que contenía 100 mM de KCl. Otro grupo de anillos, se incubó en un medio sin Ca^{2+} al que se le añadió noradrenalina (10^{-6} M). Los segmentos se lavaron cada 10 minutos tres veces con esta

solución y posteriormente se realizaron curvas concentración-respuesta al CaCl_2 (10^{-4} - 3×10^{-2} M).

1.4 Curvas frecuencia-respuesta

1.4.1 Estímulo eléctrico contráctil

El estímulo eléctrico fue aplicado mediante dos electrodos de platino, situados a 5 mm uno del otro, y entre los cuales se localiza el segmento venoso. Los electrodos se conectaron a un estimulador *Grass S88* (Grass Instruments, Quincy, USA). La relación entre la frecuencia aplicada y la respuesta obtenida fue estudiada en un rango de frecuencias comprendido entre 1 y 4 Hz, con estímulos de 15 V (voltaje supramáximo) de 0,2 ms de duración, durante 15 s.

Para estudiar la naturaleza de la respuesta contráctil al estímulo eléctrico, los segmentos venosos se incubaron durante 10 minutos con tetrodotoxina (10^{-6} M),¹²⁷⁻¹²⁹ un bloqueante de la conducción nerviosa, guanetidina (10^{-6} M), un bloqueante de la neurotransmisión adrenérgica o prazosín (10^{-6} M), un antagonista de los receptores α_1 -adrenérgicos. Como control, en otro grupo de segmentos se realizó una segunda secuencia de estímulos en ausencia de los antagonistas.

La respuesta contráctil al estímulo eléctrico, se estudió en vena cefálica de los tres grupos en las siguientes condiciones:

- En ausencia de inhibidores (respuesta control)
- En presencia de indometacina (10^{-5} M)
- En presencia de L-NMMA (10^{-4} M)
- En presencia de indometacina (10^{-5} M) más L-NMMA (10^{-4} M)
- En presencia de indometacina (10^{-5} M), L-NMMA (10^{-4} M) e iberiotoxina (10^{-7} M)
- En presencia de indometacina (10^{-5} M), L-NMMA (10^{-4} M) y charibdotoxina (10^{-7} M)
- En presencia de indometacina (10^{-5} M), L-NMMA (10^{-4} M) y apamina (10^{-6} M)
- En presencia de indometacina (10^{-5} M), L-NMMA (10^{-4} M), iberiotoxina (10^{-7} M) más apamina (10^{-6} M)
- En presencia de indometacina (10^{-5} M), L-NMMA (10^{-4} M), charibdotoxina (10^{-7} M) más apamina (10^{-6} M)

Las curvas frecuencia-respuesta en condiciones control y tras incubar con L-NMMA, indometacina o bloqueantes de los canales de K^+ se realizaron en el mismo segmento.

1.5 Fármacos y soluciones

Nitroprusiato sódico, cloruro de acetilcolina, clorhidrato de noradrenalina, acetato de N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA), clorhidrato de L-arginina, indometacina, iberiotoxina, charibdotoxina, apamina, glibenclamida, cloruro de tetraetilamonio, cloruro de bario, ouabaina, tetrodotoxina, guanetidina sulfato y prazosín clorhidrato. Todos ellos distribuidos por Sigma. Cloruro potásico (Panreac).

Las soluciones concentradas de los fármacos se realizaron con agua bidestilada, excepto la indometacina que se disolvió en etanol y bicarbonato sódico (150 mM) ajustado a un pH 7,4 con HCl. La concentración de etanol final en el baño fue inferior al 0,01 %. Las diluciones correspondientes se hicieron con solución fisiológica (NaCl 0,9%).

2 Estudio de la expresión génica

2.1 Recogida de muestras

Los segmentos de vena cefálica humana se sumergieron inmediatamente después de la realización de la fístula arteriovenosa en 250 µl de RNAlater[®] (Ambion), un líquido que permite el almacenamiento del segmento venoso e inhibe las ribonucleasas (RNAsas) evitando la degradación del ARN. Las muestras permanecieron 24 horas a 4 °C y posteriormente se

congelaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el día en que se realizó la extracción del ARN.

2.2 Aislamiento de ARN a partir del tejido vascular

El aislamiento de ARN a partir de segmentos venosos se llevó a cabo utilizando RNeasy[®] Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras se dejaron 30 minutos a temperatura ambiente y se cortaron en pequeñas porciones que pesaron entre 25 y 30 mg, después se introdujeron en 300 μl de tampón RTL. Con la ayuda de un micromortero se procedió a la homogeneización del tejido y con una jeringuilla estéril se pasó el homogeneizado 10 veces a través de una aguja 18G, se añadió 10 μl de proteinasa K (Qiagen) y se incubó a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos. La proteinasa K favorece la completa digestión de las proteínas contráctiles, tejido conectivo y colágeno, aumentando la eficiencia de la extracción de ARN.

El homogeneizado se centrifugó a 10000 $\times g$ a $20\text{-}25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 3 minutos, se recogió el sobrenadante al que se le añadió 0,5 volúmenes de etanol absoluto. Con la ayuda de una micropipeta se mezcló y se añadió a una columna (RNeasy Mini Spin Column). El ARN de la muestra se une a la membrana silicagel de la columna. Para eliminar posibles trazas de ADN se

añadió a la columna una solución que contenía DNAsa 1 (Qiagen) y se dejó durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación la columna se lavó y centrifugó a 8000 xg durante 15 segundos. El ARN se liberó de la columna haciendo pasar 50 μ l de agua libre de RNAsas que se recogió en un tubo estéril.

2.3 Integridad y concentración del ARN

Tras la extracción y lavado del ARN, el siguiente paso consistió en determinar la integridad y concentración de ARN obtenido. Para ello se usó un sistema electroforético capilar 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) y el RNA 6000 LabChip[®] kit siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadió 1 μ l de muestra al RNA 6000 LabChip[®] y se obtuvo el electroferograma. Se calculó la concentración total de ARN y el ratio entre el área de los picos de ARN ribosomal 28S/18S. Los ratios comprendidos entre 1,5 y 2 indican un ARN íntegro. En la figura 6 se muestra un ejemplo de electroferograma de vena cefálica humana.

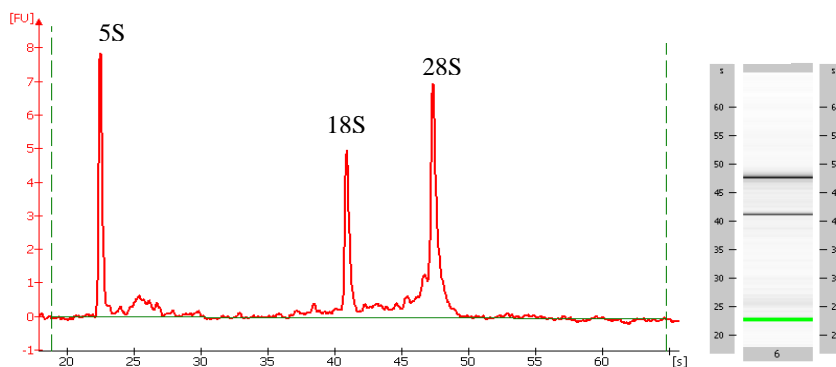


Figura 6: Ejemplo de un electroferograma (izquierda) y gel (derecha) de vena cefálica humana del grupo control, donde se pueden apreciar los picos 5S, 18S y 28S. El ratio 28S/18S se encuentra entre 1,5 y 2.

2.4 PCR con transcripción inversa (RT-PCR)

En la actualidad, existen varios métodos para determinar la expresión del ARN mensajero, en la presente tesis utilizamos la RT-PCR que consta de dos pasos:

2.4.1 Síntesis de ADNc: Transcripción inversa (RT).

Consiste en la obtención de un ADN complementario (ADNc) a partir de un ARN mensajero (ARNm), el proceso inverso de la transcripción. Para ello son necesarias unas ADN polimerasas particulares, llamadas transcriptasas inversas o retrotranscriptasas. La transcriptasa inversa utilizada fue la MultiScribe™ Reverse Transcriptase (Applied Biosystems). Para la síntesis de ADNc a partir de ARN de las muestras se utilizó el TaqMan Reverse Transcription Reagents kit (Applied

Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante y el proceso de transcripción inversa se llevó a cabo en un termociclador Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems). El ADNc sintetizado se guardó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la realización de la siguiente etapa.

2.4.2 Amplificación del ADNc (RT-PCR en tiempo real)

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) es actualmente el método más sensible y preciso para la detección de los niveles de ARNm. Este método, permite la detección directa del producto de amplificación durante la fase exponencial de la reacción, a través del empleo de compuestos con propiedades fluorescentes, de modo que determinando el incremento de fluorescencia se puede determinar la cantidad de producto formado.

Una vez sintetizado el ADNc, amplificamos de forma selectiva secuencias específicas de ADN por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR utiliza dos fragmentos cortos de ADN (oligonucleótidos) como cebadores de la síntesis. Estos cebadores o “primers” se unen específicamente a secuencias que flanquean la región a amplificar, uno en cada una de las cadenas del ADN. El proceso básico se desarrolla en tres pasos que se repiten sucesivas veces:

- Desnaturalización: separación de las cadenas complementarias del ADN
- Unión o “annealing”: unión de los “primers” específicos a sus secuencias complementarias
- Extensión: síntesis de la hebra complementaria a partir del “primer” respectivo

La repetición de este ciclo un determinado número de veces produce un aumento exponencial de la cantidad de la región diana del ADN, que viene dado por la expresión 2^n (siendo n el número de ciclos) hasta que se llega a un punto en que disminuye la eficiencia de la enzima y la reacción deja de ser exponencial.

Cada reacción de PCR contenía 2,5 μ l de ADNc sintetizado en el paso anterior, 12,5 μ l de TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems), 1,25 μ l de la sonda correspondiente y la cantidad suficiente de agua DEPC (dietilpirocarbonato) para un volumen final de 25 μ l. Una vez preparadas las mezclas se introducen en el termociclador siguiendo las siguientes condiciones de amplificación: 1 ciclo a 95 °C durante 10 min, y 40 ciclos a 95 °C durante 15 segundos seguidos de 60 °C durante 1 minuto.

La amplificación y detección del producto de la PCR se realizó en un termociclador ABI PRISM 7900 Sequence Detection System® (Applied Biosystems). Este termociclador para llevar a cabo la PCR a tiempo real incorpora un lector de fluorescencia y está diseñado para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realiza la amplificación. En la presente tesis, el sistema de detección por fluorescencia empleado en la PCR a tiempo real utiliza cebadores y sondas específicas marcadas con fluorocromos diseñados de manera especial Assays-on-Demand Gene Expression probes (Applied Biosystems). La Tabla 2 muestra las características de los genes estudiados y de los amplicones (“primers” más sondas) que se utilizaron según las instrucciones del fabricante para la determinación de los niveles de expresión de los distintos genes.

Las sondas son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donante en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donante. Para que esto ocurra, las moléculas donante y aceptora deben estar especialmente próximas. Además, el espectro de emisión de la primera se ha de solapar con el espectro de absorción de la segunda. Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donante es absorbida por el aceptor. Sin embargo, durante la amplificación

del ADN diana, la sonda hibrida con su cadena complementaria. Al desplazarse a lo largo de la cadena, en su acción de síntesis, la ADN polimerasa, que tiene actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donante.¹³⁰ Como donante y aceptor están ahora alejados, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el lector (Figura 7). Este proceso ocurre en cada ciclo y no interfiere con la acumulación exponencial del producto de amplificación.

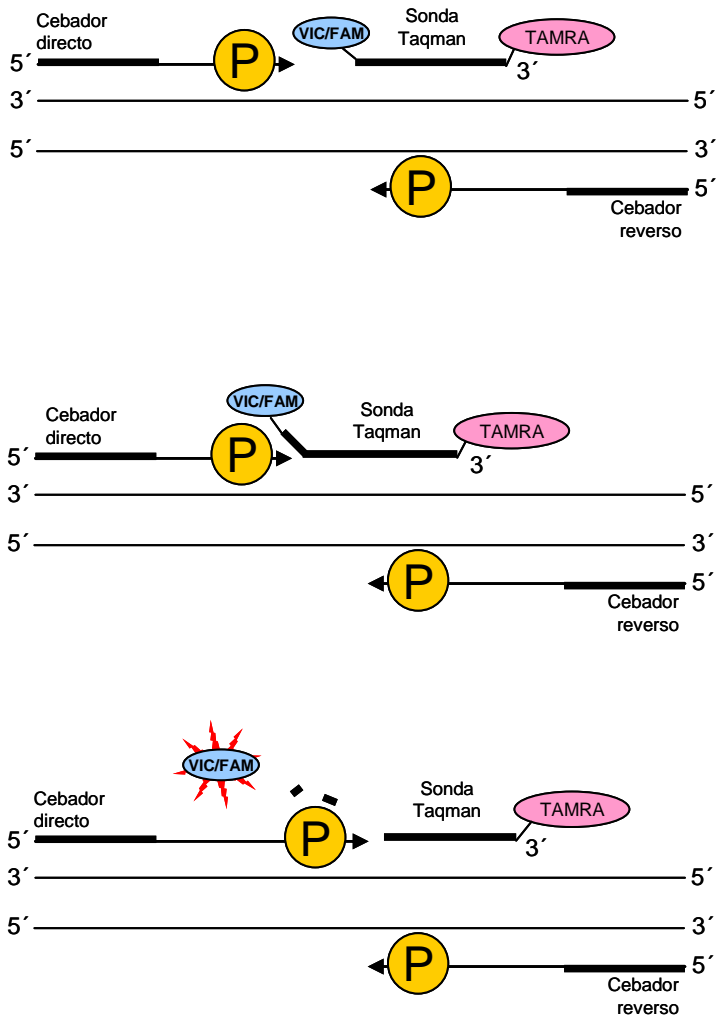


Figura 7. El esquema muestra el funcionamiento del sistema Taqman: la sonda Taqman hibrida en una región intermedia del ADNc entre el cebador directo y el cebador reverso. Incorpora en el extremo 5'un fluorocromo (VIC/FAM) y en el 3'un aceptor (TAMRA). Al principio están juntos y la fluorescencia que emite uno la capta el otro, pero cuando se separan el aceptor deja de absorber la fluorescencia y empieza a emitirse la señal.

Se tomó como control interno el ARN de la proteína gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), dado que este ARN se expresa de forma constante en muchos tejidos en diferentes condiciones fisiológicas y fisiopatológicas.

El software del ordenador construye estas curvas de amplificación a partir de los datos de emisión de fluorescencia recogidos durante la reacción en tiempo real. Así, al final obtenemos una representación en la que el eje de ordenadas es el logaritmo de la intensidad de la fluorescencia y el eje de abscisas es el número de ciclos transcurridos (Figura 8).

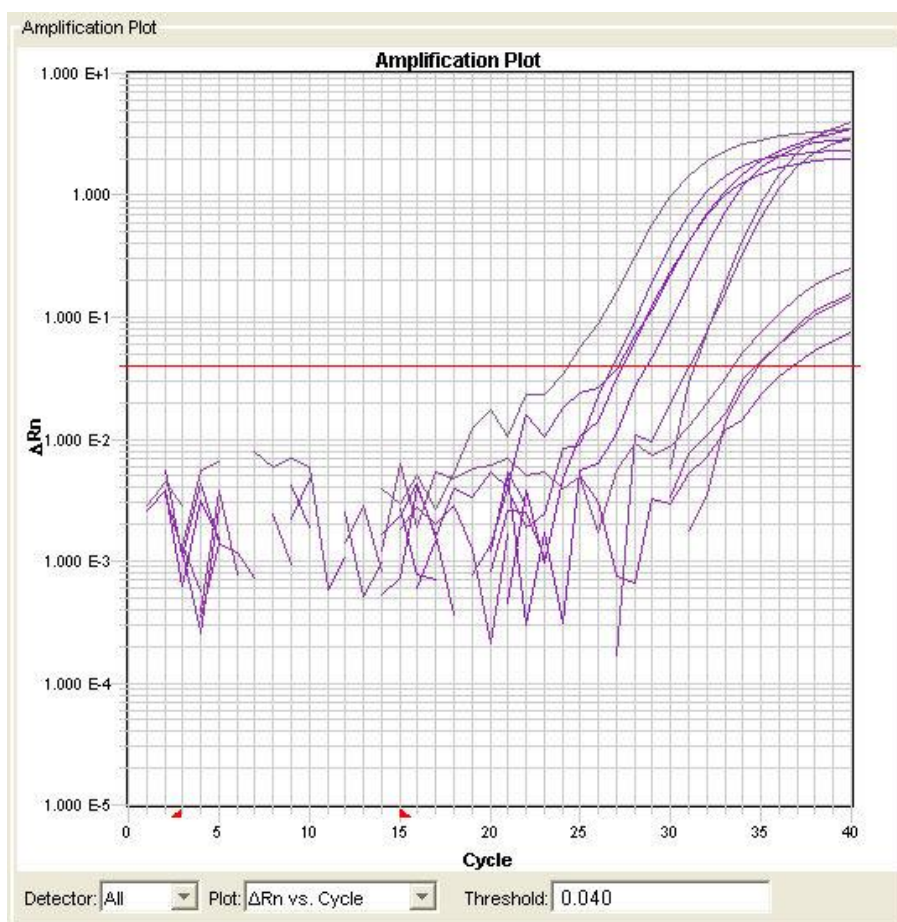


Figura 8.: RT-PCR: curvas de fluorescencia. La línea horizontal indica el umbral (threshold) a partir del cual empieza la linealidad, se establece en 0,04 para todos los grupos de estudio. ΔRn = Incremento de fluorescencia.

El parámetro de medida de la expresión de un determinado gen es el ciclo en el que la amplificación comienza a ser exponencial. Este ciclo se denomina ciclo umbral (“*threshold cycle*”, C_t), a partir del cual la intensidad de fluorescencia empieza a ser apreciable. De este modo, los valores de ciclo umbral decrecerán linealmente conforme aumenta la cantidad de ADNc de partida. Cuantas más copias de ARNm de partida del gen estudiado, más ADNc se obtendrá en la transcripción inversa, y antes comenzará la amplificación a ser exponencial.

Un método para determinar la expresión a partir de las curvas de amplificación obtenidas consiste en la comparación de C_t . La expresión de los genes problema DDAH-1, eNOS, COX-1, COX-2, y KCa1.1, se normaliza a la expresión del gen de referencia GAPDH.

Tabla 2. Características de los genes de estudio y los amplicones utilizados.

Nombre del gen	Símbolo del gen	Alias	Referencia	Longitud amplicón (pb)
dimethylarginine dimethylamino-hydrolase 1	DDAH1	DDAH-1	Hs00201707_m1	77
nitric oxide synthase 3 (endothelial cell)	NOS3	eNOS	Hs00167166_m1	80
Prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	PTGS1	COX-1	Hs00377721_m1	123
Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	PTGS2	COX-2	Hs00153133_m1	75
potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, alpha member 1	KCNMA1	KCa1.1	Hs00266938_m1	112

CÁLCULOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se indican como la media \pm error estándar. La relajación se expresa como porcentaje de la contracción inducida por la noradrenalina. La contracción se expresa en mg de tensión tanto para las curvas concentración-respuesta a la noradrenalina como para el estímulo eléctrico.

La concentración de agonista que produce el 50 % de la respuesta máxima (CE_{50}) se calculó para cada curva concentración-respuesta por un método de análisis de regresión no lineal. A partir de estos valores se calculó la media geométrica de la CE_{50} y su intervalo de confianza del 95% para cada grupo de experimentos.

La cuantificación relativa del gen problema por RT-PCR se realizó utilizando el método de comparación de C_t .¹³¹

La ecuación que permite la cuantificación por este método viene dada por $2^{-\Delta\Delta C_t}$ donde:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t1} - \Delta C_{t2}$$

siendo:

$$\Delta C_{t1} = (C_t \text{ gen problema} - C_t \text{ gen referencia}) \text{ de la muestra 1}$$

$$\Delta C_{t2} = (C_t \text{ gen problema} - C_t \text{ gen referencia}) \text{ de la muestra 2}$$

Para que la determinación a través de esta fórmula aritmética sea válida, debe cumplirse que la eficiencia de la reacción para el gen problema y para el gen de referencia sea aproximadamente igual. En nuestros experimentos la eficiencia de los genes problema y para el gen de referencia GAPDH fue del 100%.

Cada muestra se estudió por triplicado y aplicamos la ecuación de comparación de C_t mencionada anteriormente para el cálculo de la diferencia de expresión génica entre sujetos control, pacientes urémicos y pacientes urémicos sometidos a hemodiálisis. El grupo control toma el valor de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ como 1.

En cada grupo de experimentos, n indica el número de individuos (pacientes/sujetos sanos).

La comparación de las respuestas de los segmentos venosos en las distintas condiciones estudiadas se llevó a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA). Las diferencias entre grupos fueron estimadas por el test de la t de Student. Las comparaciones de los valores, obtenidos en los mismos segmentos venosos, se realizaron por el test de la t de Student pareada. Cuando los controles fueron segmentos venosos distintos a los tratados, los valores se compararon con la t de Student no pareada. En todos los casos se consideraron las diferencias significativas cuando el valor de $P < 0,05$.

RESULTADOS

1 ESTUDIO DE LA RESPUESTA VASCULAR

1.1 Respuesta relajante

1.1.1 Respuesta al nitroprusiato sódico

Para estudiar la capacidad relajante del músculo liso vascular independiente de endotelio se realizaron curvas concentración-respuesta al nitroprusiato sódico. Éste es un dador directo de NO, que activa la guanilato ciclasa produciendo vasodilatación. La respuesta al nitroprusiato sódico fue similar en segmentos controles y en segmentos de pacientes no dializados. Sin embargo, en venas de dializados, la curva concentración-respuesta se desplazó hacia la derecha ($P < 0,05$) sin modificaciones en el efecto máximo, que en todos los casos alcanzó el 100 % (Figura 9 y Tabla 3).

1.1.2 Respuesta a la acetilcolina

En segmentos venosos con endotelio, previamente contraídos con noradrenalina (10^{-7} M), la acetilcolina produjo relajación dependiente de la concentración. La CE_{50} , fue mayor para las venas procedentes de pacientes con insuficiencia renal crónica, indicando una menor sensibilidad a la acetilcolina. (Tabla 4).

La respuesta relajante máxima a la acetilcolina (E_{max}) de la vena cefálica de sujetos sanos fue significativamente mayor ($P < 0,05$) que la obtenida para segmentos venosos procedentes de pacientes urémicos (Tabla 4 y Figura 10). Estos resultados indican que la insuficiencia renal crónica disminuye la respuesta relajante máxima inducida por acetilcolina en la vena cefálica humana. La hemodiálisis prolongada aumenta de forma significativa ($P < 0,05$) el efecto máximo en respuesta a la acetilcolina comparado con los segmentos venosos de pacientes urémicos no dializados.

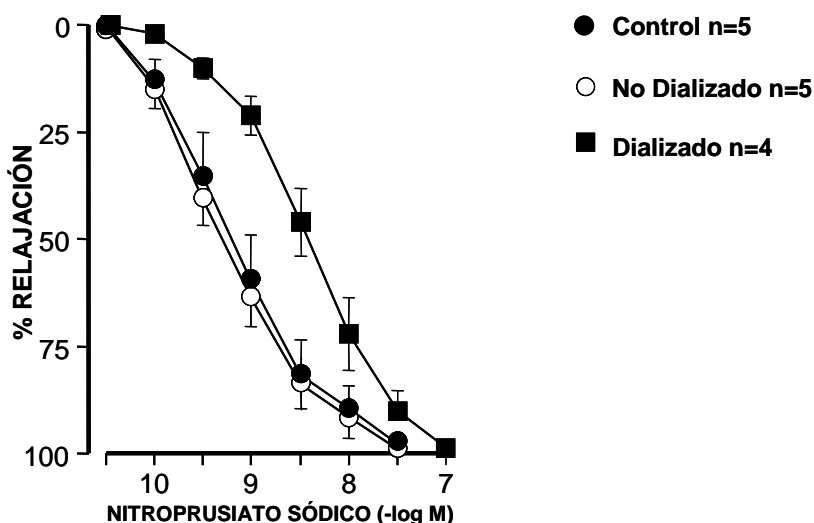


Figura 9. Respuesta al nitroprusiato sódico en segmentos venosos previamente contraídos con noradrenalina.

Tabla 3. Valores de concentración eficaz 50 (CE_{50} , molar, M) su intervalo de confianza del 95 % y del efecto máximo (E_{max} relajación expresada como porcentaje de la contracción inducida por la noradrenalina), en respuesta al nitroprusiato sódico en anillos venosos procedentes de sujetos control, pacientes urémicos no dializados y dializados.

Nitroprusiato sódico	n	CE_{50} (M) Intervalo de Confianza 95 %	E_{max} (% relajación)
Controles	5	$7,0 \times 10^{-10}$ (3,5 - 13,7) $\times 10^{-10}$	100
No dializados	5	$6,2 \times 10^{-10}$ (3,5 - 11,0) $\times 10^{-10}$	100
Dializados	4	$4,9 \times 10^{-9}$ *† (2,6 - 9,4) $\times 10^{-9}$	100

* $P < 0,05$ con respecto a los valores del grupo control. n= número de donantes o pacientes. † $P < 0,05$ con respecto a los valores del grupo de pacientes no dializados.

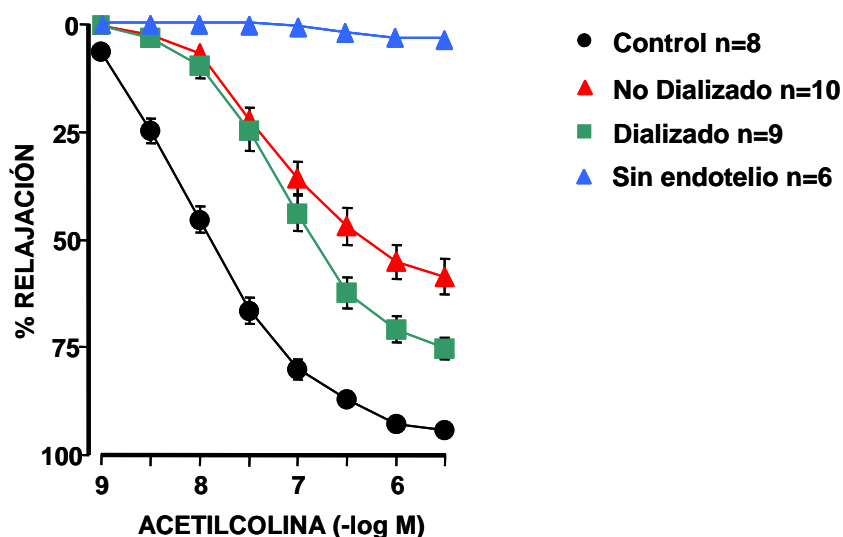


Figura 10. Respuesta a la acetilcolina en segmentos venosos previamente contraídos con noradrenalina.

Tabla 4. Valores de concentración eficaz 50 (CE_{50} , molar, M) su intervalo de confianza del 95 % y del efecto máximo (E_{max} relajación expresada como porcentaje de la contracción inducida por la noradrenalina) \pm error estándar (e.e.), en respuesta a la acetilcolina en anillos venosos procedentes de sujetos control, pacientes urémicos no dializados y dializados.

Acetilcolina	n	CE_{50} (M) Intervalo de Confianza 95 %	$E_{max} \pm e.e.$ (% relajación)
Controles	8	$1,2 \times 10^{-8}$ ($8,8 \times 10^{-9}$ - $1,7 \times 10^{-8}$)	$94,2 \pm 1,1$
No dializados	10	$1,0 \times 10^{-7}^*$ ($7,1 \times 10^{-8}$ - $1,4 \times 10^{-7}$)	$58,7 \pm 4,1^*$
Dializados	9	$7,7 \times 10^{-8}^*$ ($4,8 \times 10^{-8}$ - $1,2 \times 10^{-7}$)	$75,2 \pm 2,6^{\dagger}$

* $P < 0,05$ con respecto a los valores del grupo control. n= número de donantes o pacientes. $^{\dagger} P < 0,05$ con respecto a los valores del grupo de pacientes no dializados.

Participación de prostaglandinas

Para determinar si las prostaglandinas intervenían en la respuesta relajante a la acetilcolina, se utilizó indometacina, un inhibidor de la COX. La incubación con indometacina no alteró la sensibilidad, puesto que la CE_{50} no se vio modificada, ni se observaron cambios en el efecto máximo. Esto ocurrió en los tres grupos de estudio, indicando que las prostaglandinas no participan en la relajación inducida por acetilcolina en la vena cefálica humana (Figura 11 y tablas 5, 6 y 7).

Participación de óxido nítrico

El mecanismo de acción de la acetilcolina puede implicar la activación de la NOS y por tanto la síntesis de NO a partir de L-arginina. Para estudiar si esta vía participa en dicha respuesta relajante, se incubaron segmentos con endotelio de vena cefálica con un inhibidor de la síntesis de NO, el L-NMMA (10^{-4} M). Al inhibir esta vía se produjo una disminución significativa ($P < 0,05$) de la respuesta relajante a la acetilcolina en segmentos del grupo control y de pacientes urémicos no dializados, mientras que, apenas afectó a la relajación en venas de pacientes hemodializados, indicando que en este último grupo la relajación dependiente de NO está muy reducida (Figura 12 y tablas 5, 6 y 7).

Los efectos inhibidores del L-NMMA sobre la relajación inducida por la acetilcolina fueron revertidos en presencia de L-arginina (Figura 12 y tablas 5, 6 y 7) en todos los grupos de estudio. Estos resultados indican que parte de la relajación inducida por acetilcolina es debida al NO producido por la eNOS a partir del sustrato L-arginina.

El bloqueo conjunto con indometacina más L-NMMA no produjo mayor inhibición que la administración de L-NMMA sólo en ninguno de los tres grupos de estudio (Figura 13 y tablas 5, 6 y 7).

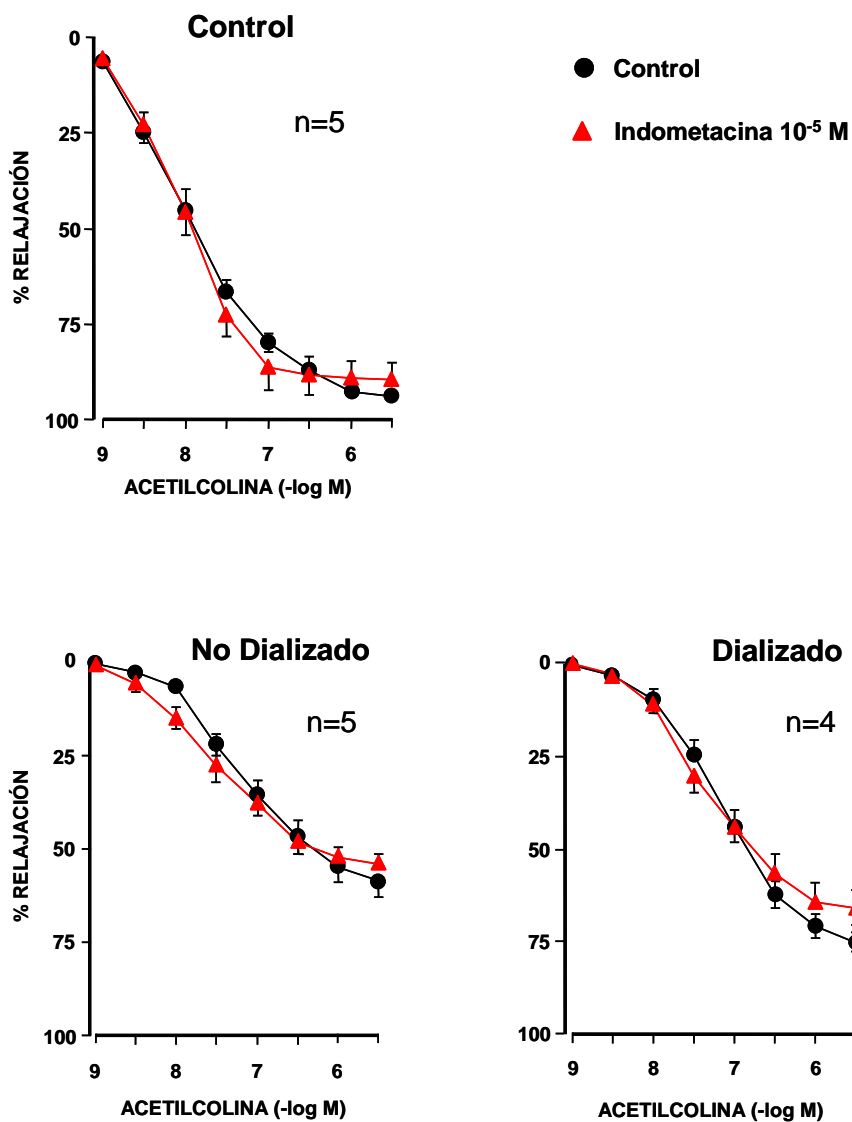


Figura 11. Curvas concentración-respuesta a la acetilcolina en ausencia (control) y en presencia de indometacina 10^{-5} M.

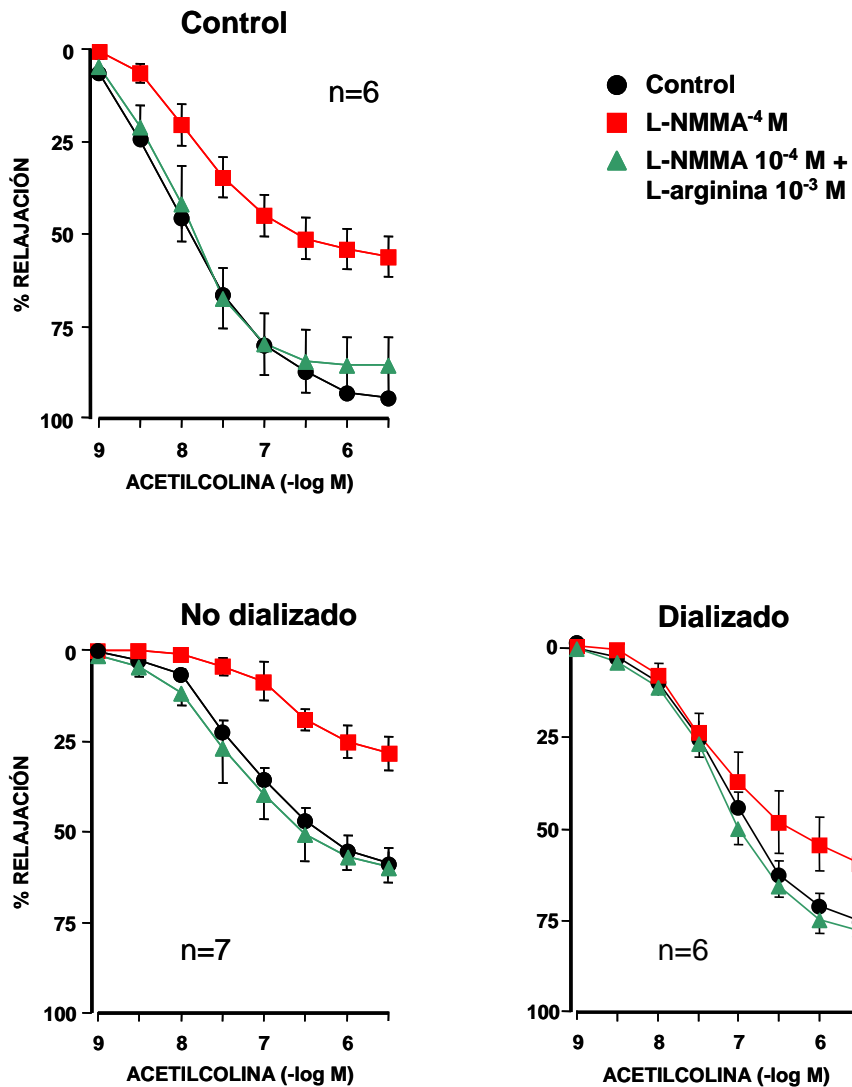


Figura 12. Curvas concentración-respuesta a la acetilcolina en ausencia (control) y en presencia de L-NMMA (10^{-4} M) o L-NMMA (10^{-4} M) más L-arginina (10^{-3} M).

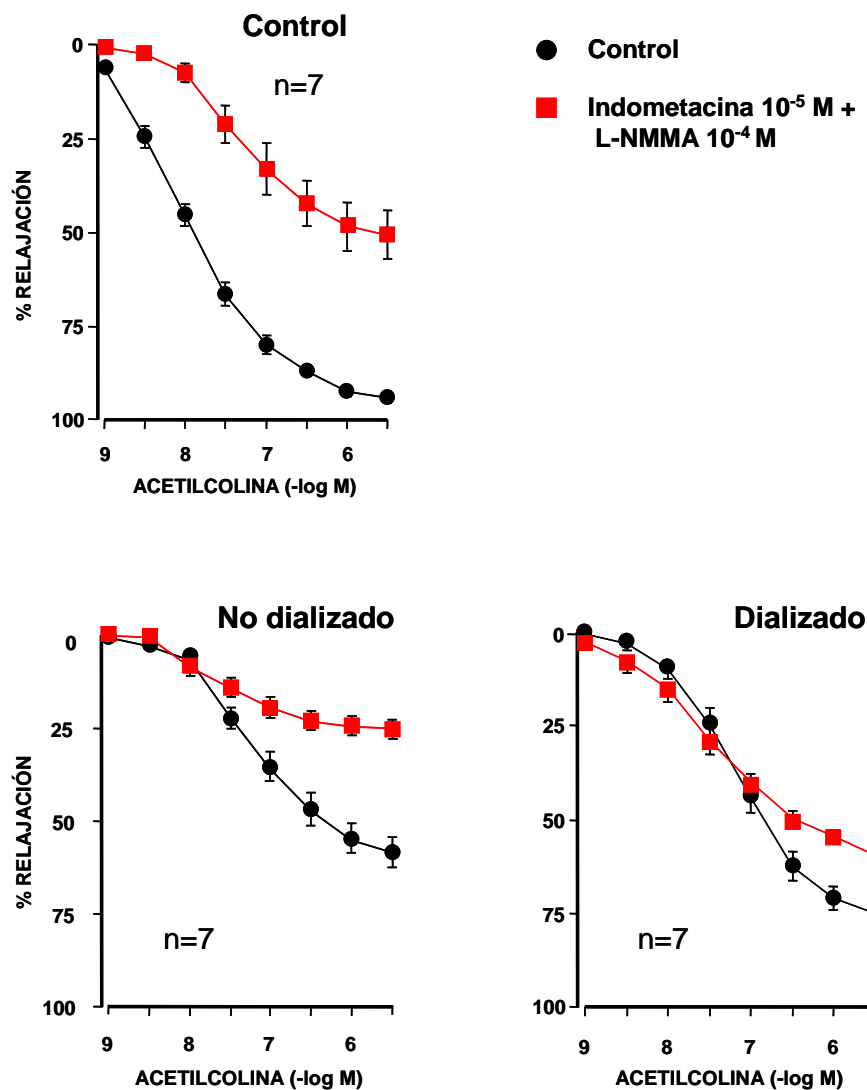


Figura 13. Curvas concentración-respuesta a la acetilcolina en ausencia (control) y en presencia de indometacina (10^{-5} M) más L-NMMA (10^{-4} M).

Participación del factor hiperpolarizante derivado del endotelio

La relajación residual a la acetilcolina, definida como la relajación independiente de prostaglandinas y NO, posiblemente sea debida a la participación del factor hiperpolarizante derivado del endotelio. Como ya se comentó en la introducción, aunque la naturaleza de este factor hiperpolarizante no es del todo conocida, la teoría más aceptada es la que lo relaciona con los canales de K^+ .

Se tomó como control la relajación resultante una vez inhibida la COX y la NOS con indometacina y L-NMMA respectivamente. En estas condiciones la incubación de los segmentos venosos con KCl (20 mM), bloqueante de los canales de K^+ a esta concentración, inhibe la relajación inducida por acetilcolina (Figura 14 y tablas 5, 6 y 7). Estos resultados ponen de manifiesto la participación de los canales de K^+ en la respuesta relajante a la acetilcolina.

Para estudiar la naturaleza de los canales de K^+ que participan en la respuesta relajante, se estudió la relajación inducida por la acetilcolina (3×10^{-6} M) en presencia de los diferentes bloqueantes específicos de los canales de K^+ . En todos los grupos de estudio, la adición al baño de TEA (10^{-3} M), iberiotoxina (10^{-7} M) o charibdotoxina (10^{-7} M), produjo una reducción significativa de la relajación a la acetilcolina (Figura

14). Sin embargo, la incubación con glibenclamida (10^{-5} M) o con apamina (10^{-6} M), no modificó la respuesta a la acetilcolina ($P > 0,05$) respecto a los segmentos en condiciones control (Figura 15).

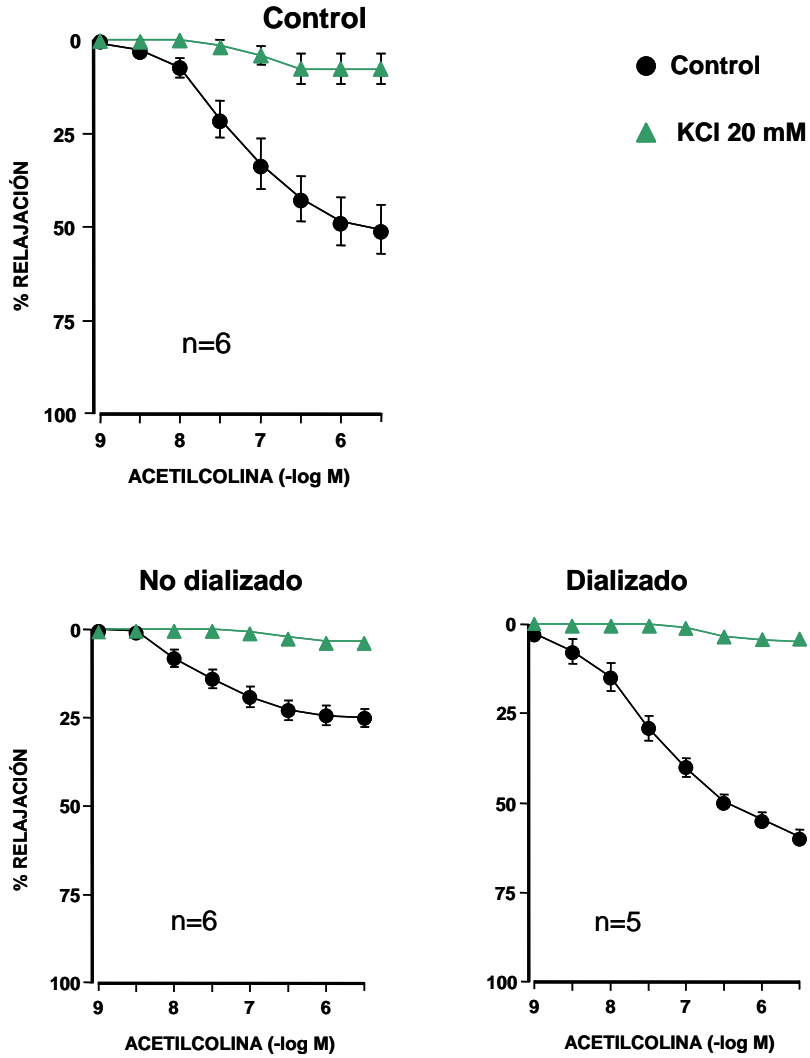


Figura 14. Curvas concentración respuesta a la acetilcolina en ausencia (control) y en presencia de KCl (20 mM). En todos los casos se incubó previamente con indometacina (10^{-5} M) y L-NMMA (10^{-4} M).

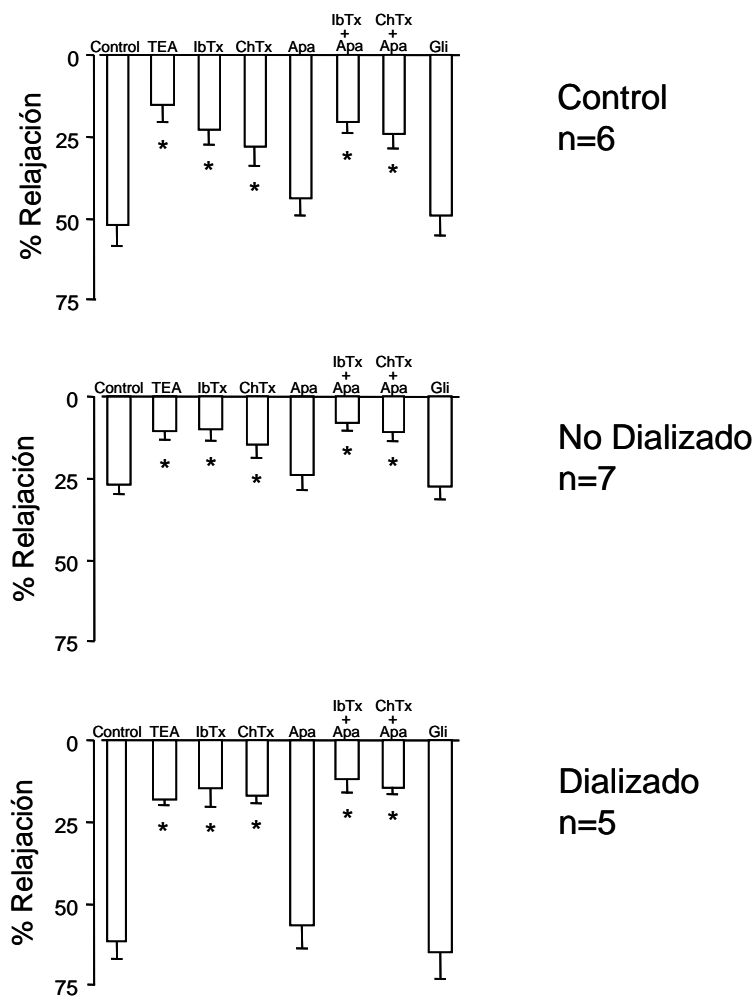


Figura 15. Efecto de los bloqueantes de los canales de K^+ sobre la relajación inducida por acetilcolina ($3 \times 10^{-6} M$) en segmentos previamente contraídos con noradrenalina. TEA: cloruro de tetraetilamonio $10^{-3} M$; Ibtx: Iberiotoxina ($10^{-7} M$); Chtx: Charibdotoxina ($10^{-7} M$); Apa: Apamina ($10^{-6} M$); Gli: Glibenclamida ($10^{-5} M$) en venas de controles; no dializados y dializados. En todos los casos se incubó previamente con indometacina $10^{-5} M$ y con L-NMMA $10^{-4} M$. (*) $P < 0,05$ comparado con el control.

La combinación de charibdotoxina más apamina o de iberiotoxina más apamina en las mismas concentraciones que las utilizadas por separado, no aumentó significativamente el bloqueo de la respuesta producido por charibdotoxina o iberiotoxina (Figura 15). Estos resultados indican que los canales de K^+ que participan en la respuesta a la acetilcolina en los tres grupos de estudio son los activados por Ca^{2+} de gran conductancia.

En otro grupo de segmentos, la adición al baño de $BaCl_2$ (3×10^{-6} M), bloqueante de los canales rectificadores de K^+ , redujo significativamente la relajación inducida por la acetilcolina mientras que la combinación de $BaCl_2$ (3×10^{-6} M) y ouabaina (10^{-3} M), prácticamente produjo el bloqueo total de la respuesta relajante a la acetilcolina en todos los grupos de estudio (Figura 16 y tablas 5, 6 y 7). Esto indica que los canales rectificadores de K^+ y la bomba Na^+-K^+ intervienen en la hiperpolarización de la célula muscular en respuesta a la acetilcolina.

Por lo tanto, la relajación inducida por acetilcolina en la vena cefálica humana independiente de prostaglandinas y NO, probablemente sea debida a la liberación de EDHF. En esta respuesta participan los canales de K^+ activados por Ca^{2+} de gran conductancia, sensibles a la iberiotoxina y a la charibdotoxina, los canales rectificadores de K^+ , que se bloquean con bario y la bomba Na^+-K^+ que se bloquea con ouabaina.

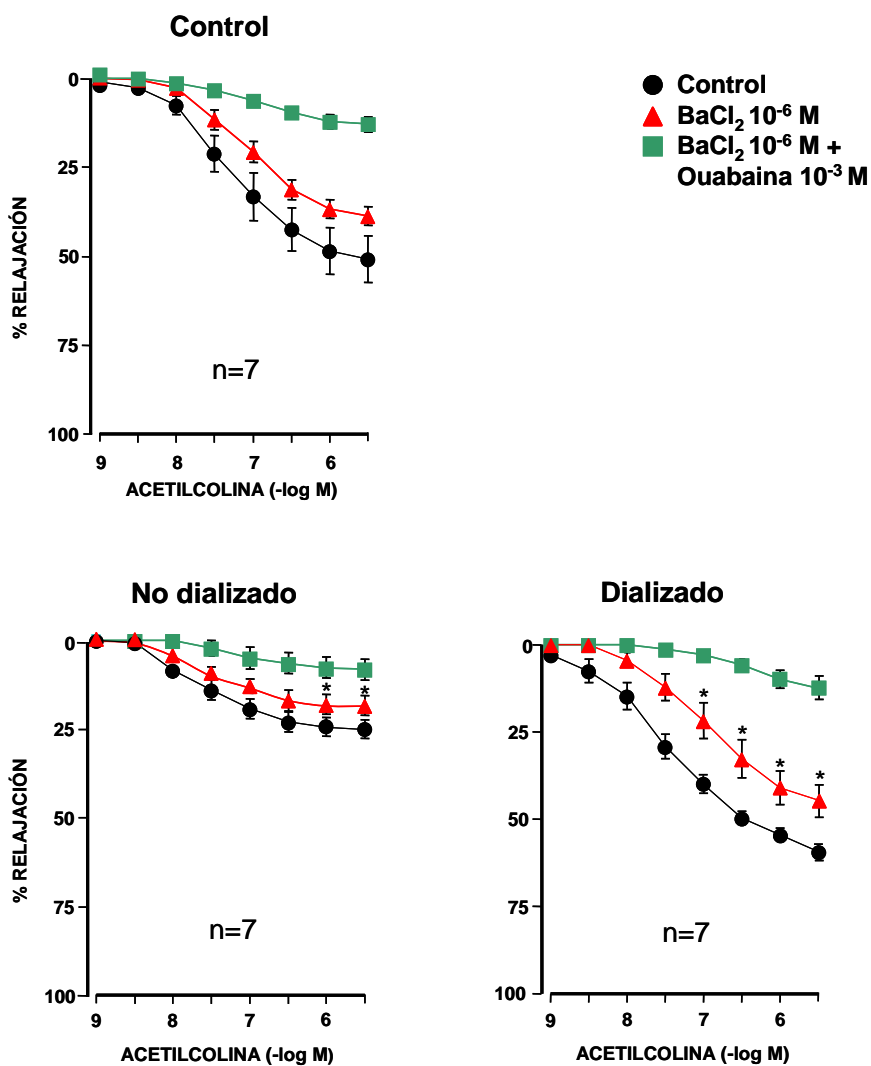


Figura 16. Respuesta relajante a la acetilcolina, en ausencia y en presencia de BaCl₂ (3×10^{-6} M) y en presencia de BaCl₂ (3×10^{-6} M) más ouabaina (10^{-3} M). En todos los casos se incubó previamente con indometacina (10^{-5} M) y con L-NMMA (10^{-4} M).

Tabla 5. Valores de concentración eficaz 50 (CE_{50} , molar, M) su intervalo de confianza del 95 % y del efecto máximo (E_{max} relajación expresada como porcentaje de la contracción inducida por la noradrenalina) \pm error estándar, (e.e.) en respuesta a la acetilcolina en anillos de vena cefálica del grupo control. Efecto de los diferentes tratamientos sobre la respuesta a la acetilcolina.

CONTROL			
Acetilcolina	n	CE_{50} (M) Intervalo de Confianza 95 %	$E_{max} \pm e.e.$ (% relajación)
Control	8	$1,2 \times 10^{-8}$ ($8,8 \times 10^{-9}$ - $1,7 \times 10^{-8}$)	$94,2 \pm 1,1$
Indometacina 10^{-5} M	5	$9,6 \times 10^{-9}$ ($7,0 \times 10^{-9}$ - $1,3 \times 10^{-8}$)	$89,7 \pm 4,6$
L-NMMA 10^{-4} M	6	$2,1 \times 10^{-8}$ ($1,3 \times 10^{-8}$ - $3,5 \times 10^{-8}$)	$56,1 \pm 5,4^*$
L-NMMA 10^{-4} M+ L-arginina 10^{-3} M	6	$1,1 \times 10^{-8}$ ($5,6 \times 10^{-9}$ - $2,2 \times 10^{-8}$)	$89,5 \pm 4,0$
Indometacina 10^{-5} M+ L-NMMA 10^{-4} M	7	$5,1 \times 10^{-8}$ ($2,4 \times 10^{-8}$ - $1,1 \times 10^{-7}$)*	$50,7 \pm 6,5^*$
KCl 20 mM	6	---	$7,8 \pm 3,2^*$
BaCl ₂ 10^{-6} M	7	$7,9 \times 10^{-8}$ ($5,2 \times 10^{-8}$ - $1,2 \times 10^{-7}$)	$37,8 \pm 2,5^*$
BaCl ₂ 10^{-6} M+ Ouabaina 10^{-3} M	7	---	$12,8 \pm 2,1^*$

(*) $P < 0,05$ comparado con el control.

Tabla 6. Valores de concentración eficaz 50 (CE_{50} , molar, M) su intervalo de confianza del 95 % y del efecto máximo (E_{max} relajación expresada como porcentaje de la contracción inducida por la noradrenalina) \pm error estándar, (e.e.) en respuesta a la acetilcolina en anillos de vena cefálica procedentes de pacientes urémicos no dializados. Efecto de los diferentes tratamientos sobre la respuesta a la acetilcolina.

NO DIALIZADO			
Acetilcolina	n	CE_{50} (M) Intervalo de Confianza 95 %	$E_{max} \pm e.e.$ (% relajación)
Control	10	$1,0 \times 10^{-7}$ ($7,1 \times 10^{-8}$ - $1,4 \times 10^{-7}$)	$58,7 \pm 4,1$
Indometacina 10^{-5} M	5	$4,9 \times 10^{-8}$ ($2,4 \times 10^{-8}$ - $1,0 \times 10^{-7}$)	$50,9 \pm 4,5$
L-NMMA 10^{-4} M	7	$1,4 \times 10^{-7}$ ($3,6 \times 10^{-8}$ - $5,5 \times 10^{-7}$)	$28,4 \pm 4,6^*$
L-NMMA 10^{-4} M+ L-arginina 10^{-3} M	7	$3,7 \times 10^{-8}$ ($1,7 \times 10^{-8}$ - $8,4 \times 10^{-8}$)	$59,7 \pm 4,1$
Indometacina 10^{-5} M+ L-NMMA 10^{-4} M	7	$2,8 \times 10^{-8}$ ($1,8 \times 10^{-8}$ - $4,5 \times 10^{-8}$)*	$25,1 \pm 2,6^*$
KCl 20 mM	6	---	$3,4 \pm 1,0^*$
BaCl ₂ 10^{-6} M	7	$3,2 \times 10^{-8}$ ($2,2 \times 10^{-8}$ - $4,7 \times 10^{-8}$)	$18,3 \pm 2,8^*$
BaCl ₂ 10^{-6} M+ Ouabaina 10^{-3} M	7	---	$8,1 \pm 2,9^*$

(*) $P < 0,05$ comparado con el control.

Tabla 7. Valores de concentración eficaz 50 (CE_{50} , molar, M) su intervalo de confianza del 95 % y del efecto máximo (E_{max} relajación expresada como porcentaje de la contracción inducida por la noradrenalina) \pm error estándar, (e.e.) en respuesta a la acetilcolina en anillos de vena cefálica procedentes de pacientes hemodializados. Efecto de los diferentes tratamientos sobre la respuesta a la acetilcolina.

DIALIZADO			
Acetilcolina	n	CE_{50} (M) Intervalo de Confianza 95 %	$E_{max} \pm e.e.$ (% relajación)
Control	9	$7,7 \times 10^{-8}$ ($4,8 \times 10^{-8}$ - $1,2 \times 10^{-7}$)	$75,2 \pm 2,6$
Indometacina 10^{-5} M	4	$5,0 \times 10^{-8}$ ($2,9 \times 10^{-8}$ - $8,5 \times 10^{-8}$)	$71,1 \pm 5,4$
L-NMMA 10^{-4} M	6	$6,7 \times 10^{-8}$ ($2,7 \times 10^{-8}$ - $1,7 \times 10^{-7}$)	$59,5 \pm 7,2^*$
L-NMMA 10^{-4} M+ L-arginina 10^{-3} M	6	$6,5 \times 10^{-8}$ ($4,6 \times 10^{-8}$ - $9,4 \times 10^{-8}$)	$77,7 \pm 2,9$
Indometacina 10^{-5} M+ L-NMMA 10^{-4} M	7	$3,0 \times 10^{-8}$ ($1,1 \times 10^{-8}$ - $8,1 \times 10^{-8}$)	$59,2 \pm 3,0^*$
KCl 20 mM	5	---	$4,9 \pm 0,3^*$
BaCl ₂ 10^{-6} M	7	$8,0 \times 10^{-8}$ ($4,9 \times 10^{-8}$ - $1,3 \times 10^{-7}$)	$49,7 \pm 4,9^*$
BaCl ₂ 10^{-6} M+ Ouabaina 10^{-3} M	7	---	$12,4 \pm 3,3^*$

(*) $P < 0,05$ comparado con el control.

1.2 Respuesta contráctil

1.2.1 Respuesta al cloruro potásico

La capacidad de contracción del músculo liso vascular se comprobó por su respuesta al KCl. La administración de KCl (5-100 mM) produjo contracción dependiente de la concentración en todos los grupos de estudio (Figura 17). Tras una primera fase de contracción exponencial, se alcanzó un tramo asintótico a partir de 60 mM, valor al que corresponde la respuesta máxima (Emax) (Tabla 8). En los segmentos venosos procedentes de pacientes urémicos hubo un marcado descenso del Emax. También se encontraron diferencias significativas en los valores de CE₅₀; fue menor en venas de no dializados que en venas de controles y dializados. Sin embargo no hubo diferencias significativas en los valores de CE₅₀ entre segmentos venosos de controles y de dializados.

Estos resultados indican que la insuficiencia renal crónica disminuye la capacidad de contracción del músculo liso vascular.

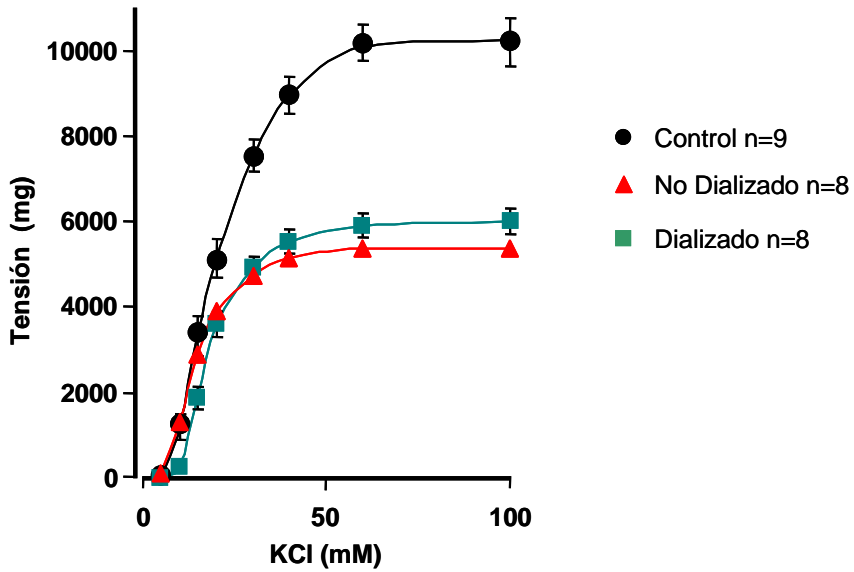


Figura 17. Curvas concentración-respuesta de la vena cefálica al KCl en los tres grupos de estudio.

Tabla 8. Valores de concentración eficaz 50 (CE_{50} , molar, M) su intervalo de confianza del 95 % y del efecto máximo (E_{max}) \pm error estándar (e.e.) en respuesta al KCl en anillos de vena cefálica de los tres grupos de estudio.

KCl	n	CE_{50} (mM) Intervalo de Confianza 95 %	$E_{max} \pm e.e.$ (% relajación)
Control	9	18,9 (17,0 - 21,1)	10153 \pm 565
No dializado	8	14,1 (12,1 -16,4)*	5385 \pm 386*
Dializado	8	18,3 (16,3 -20,4)	6008 \pm 295*

(*) $P < 0,05$ comparado con el control

1.2.2 Respuesta a la noradrenalina

La Figura 18 recoge las curvas concentración-respuesta a la noradrenalina en segmentos venosos de los tres grupos de estudio. La insuficiencia renal crónica disminuye el efecto máximo (E_{max}). La disminución en los valores de la CE_{50} sólo fue significativa en el caso del grupo de no dializados versus control (Tabla 9). En segmentos venosos de pacientes sometidos a hemodiálisis los valores de CE_{50} son ligeramente menores comparados con el control pero sin llegar a verse diferencias significativas.

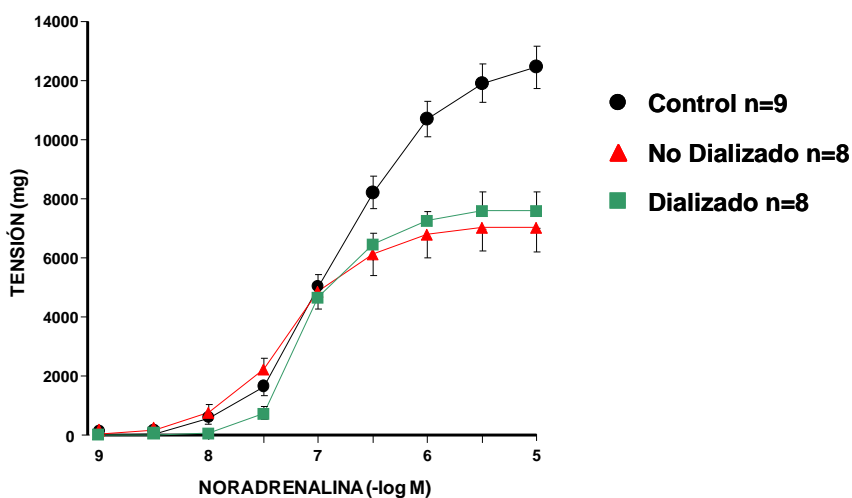


Figura 18. Curvas concentración respuesta a la noradrenalina en los tres grupos.

Tabla 9. Valores de concentración eficaz 50 (CE_{50} , molar, M) su intervalo de confianza del 95 % y del efecto máximo (E_{max}) \pm error estándar (e.e.) en respuesta a la noradrenalina en anillos de vena cefálica de los tres grupos de estudio.

Noradrenalina	n	CE_{50} (mM) Intervalo de Confianza 95 %	$E_{max} \pm e.e.$ (% relajación)
Control	9	$1,07 \times 10^{-7}$ ($7,43 \times 10^{-8}$ - $1,53 \times 10^{-7}$)	12551 ± 730
No dializado	8	$4,68 \times 10^{-8}$ ($2,91 \times 10^{-8}$ - $7,51 \times 10^{-8}$)	$7036 \pm 811^*$
Dializado	8	$8,94 \times 10^{-8}$ ($6,54 \times 10^{-8}$ - $1,22 \times 10^{-7}$)	$7614 \pm 630^*$

(*) $P < 0,05$ comparado con el control

Participación de prostaglandinas

La incubación con indometacina produce un desplazamiento hacia la izquierda de la curva concentración-respuesta a la noradrenalina en segmentos venosos del grupo control ($P < 0,05$) sin modificar el efecto máximo (Tabla 10). En los segmentos procedentes de pacientes con insuficiencia renal crónica, la incubación con indometacina no modificó la curva concentración-respuesta a la noradrenalina (Figura 19 y tablas 11 y 12). Estos resultados indican que la insuficiencia renal crónica reduce la participación de prostaglandinas relajantes en la respuesta contráctil a la noradrenalina. Esta inhibición no mejora con la hemodiálisis.

Participación de óxido nítrico

Se realizaron curvas concentración-respuesta a la noradrenalina, en presencia de un inhibidor de la NOS, para valorar la liberación de NO. En muestras del grupo control, la incubación con L-NMMA (10^{-4} M) desplazó la curva concentración-respuesta a la izquierda sin afectar al efecto máximo. La administración de L-arginina (10^{-3} M) revirtió los efectos del L-NMMA, indicando que la potenciación producida por L-NMMA es debida a la inhibición de la síntesis de NO (Figura 20 y tabla 10). En segmentos venosos procedentes de

pacientes urémicos la incubación con L-NMMA no modificó la respuesta contráctil (Figura 20 y tablas 11 y 12).

Estos resultados indican que la noradrenalina es capaz de inducir la liberación de NO en segmentos venosos procedentes de sujetos sanos, mientras que este mecanismo no se pone de manifiesto en segmentos de vena cefálica de pacientes con insuficiencia renal crónica.

La inhibición conjunta de COX y NOS con indometacina y L-NMMA no produjo mayor efecto que cada uno de los inhibidores por separado, descartando así, un sinergismo entre ambas vías (Figura 21 y tablas 10,11 y 12).

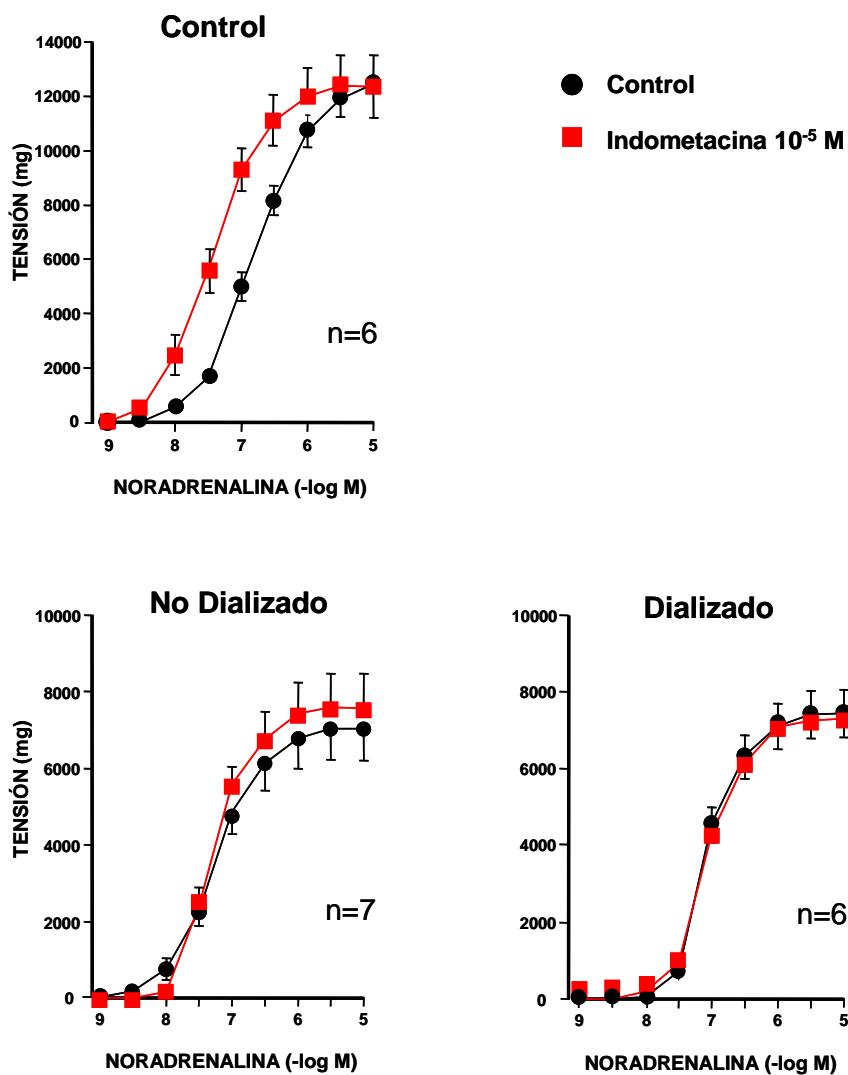


Figura 19. Curvas concentración-respuesta a la noradrenalina en ausencia (control) y en presencia de indometacina ($10^{-5}M$).

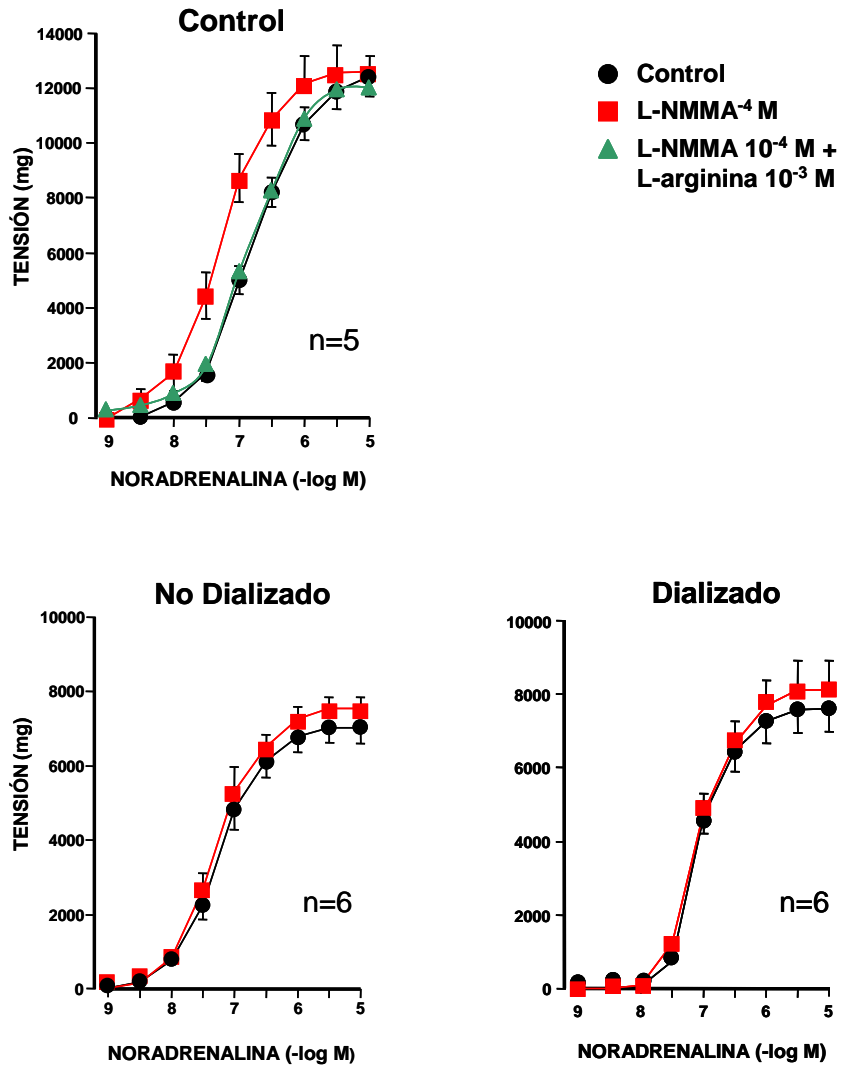


Figura 20. Curvas concentración respuesta a la noradrenalina en ausencia (control) y en presencia de L-NMMA (10^{-4} M) o L-NMMA (10^{-4} M) más L-arginina (10^{-3} M).

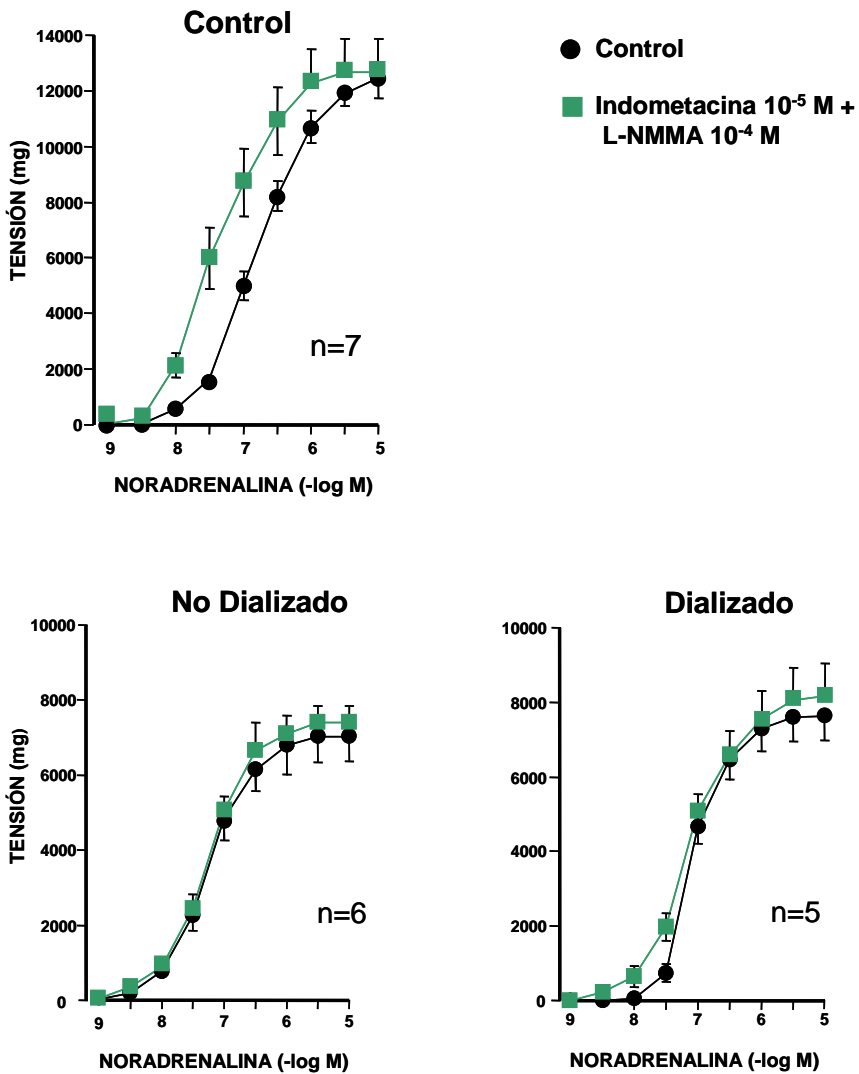


Figura 21. Curvas concentración respuesta a la noradrenalina en ausencia (control) y en presencia de indometacina (10^{-5} M) más L-NMMA (10^{-4} M).

Tabla 10. Valores de concentración eficaz 50 (CE_{50} , molar, M) su intervalo de confianza del 95 % y del efecto máximo (E_{max}) \pm error estándar (e.e.) de la noradrenalina en anillos de vena cefálica del grupo control, en ausencia (control) y en presencia de los diferentes tratamientos.

CONTROL			
Noradrenalina	n	CE_{50} (M) Intervalo de Confianza 95 %	$E_{max} \pm e.e.$
Control	9	$1,07 \times 10^{-7}$ ($7,43 \times 10^{-8}$ - $1,53 \times 10^{-7}$)	12551 ± 730
Indometacina 10^{-5} M	6	$2,66 \times 10^{-8}$ ($1,66 \times 10^{-8}$ - $4,26 \times 10^{-8}$) *	12379 ± 1144
L-NMMA 10^{-4} M	5	$4,36 \times 10^{-8}$ ($3,09 \times 10^{-8}$ - $6,16 \times 10^{-8}$) *	12618 ± 1020
L-NMMA 10^{-4} M+ L-arginina 10^{-3} M	5	$1,3 \times 10^{-7}$ ($9,74 \times 10^{-8}$ - $1,76 \times 10^{-7}$)	12180 ± 510
Indometacina 10^{-5} M+ L-NMMA 10^{-4} M	7	$4,77 \times 10^{-8}$ ($3,36 \times 10^{-8}$ - $6,78 \times 10^{-8}$) *	12663 ± 1197

(*) $P < 0,05$ comparado con el control.

Tabla 11. Valores de concentración eficaz 50 (CE_{50} , molar, M) su intervalo de confianza del 95 % y del efecto máximo (E_{max}) \pm error estándar (e.e.) de la noradrenalina en anillos de vena cefálica del grupo de no dializados, en ausencia (control) y en presencia de los diferentes tratamientos.

NO DIALIZADO			
Noradrenalina	n	CE ₅₀ (M) Intervalo de Confianza 95 %	E _{max} \pm e.e.
Control	8	4,68x10 ⁻⁸ (2,91 x10 ⁻⁸ -7,51 x10 ⁻⁸)	7036 \pm 811*
Indometacina 10 ⁻⁵ M	7	4,34 x10 ⁻⁸ (3,10 x10 ⁻⁸ -6,07 x10 ⁻⁸)	7582 \pm 898
L-NMMA 10 ⁻⁴ M	6	5,55 x10 ⁻⁸ (3,54 x10 ⁻⁸ -8,71 x10 ⁻⁸)	7549 \pm 916
Indometacina 10 ⁻⁵ M+ L-NMMA 10 ⁻⁴ M	6	5,06 x10 ⁻⁸ (3,29 x10 ⁻⁸ -7,77 x10 ⁻⁸)	7400 \pm 803

(*) $P < 0,05$ comparado con el control.

Tabla 12. Valores de concentración eficaz 50 (CE_{50} , molar, M) su intervalo de confianza del 95 % y del efecto máximo (E_{max}) \pm error estándar (e.e.) de la noradrenalina en anillos de vena cefálica procedentes de pacientes hemodializados, en ausencia (control) y en presencia de los diferentes tratamientos.

DIALIZADO			
Noradrenalina	n	CE_{50} (M) Intervalo de Confianza 95 %	$E_{max} \pm e.e.$
Control	8	$8,94 \times 10^{-8}$ ($6,54 \times 10^{-8}$ - $1,22 \times 10^{-7}$)	$7614 \pm 630^*$
Indometacina 10^{-5} M	6	$7,61 \times 10^{-8}$ ($5,82 \times 10^{-8}$ - $9,95 \times 10^{-8}$)	7471 ± 947
L-NMMA 10^{-4} M	6	$7,56 \times 10^{-8}$ ($5,82 \times 10^{-8}$ - $9,83 \times 10^{-8}$)	8318 ± 761
Indometacina 10^{-5} M+ L-NMMA 10^{-4} M	5	$5,69 \times 10^{-8}$ ($3,87 \times 10^{-8}$ - $8,37 \times 10^{-8}$)	8150 ± 894

(*) $P < 0,05$ comparado con el control.

Participación de canales de potasio

En este grupo de experimentos se tomó como control la respuesta a la noradrenalina de segmentos incubados con indometacina y L-NMMA para descartar los efectos mediados por prostaglandinas y NO.

En segmentos venosos procedentes del grupo control y de pacientes hemodializados, la curva concentración-respuesta a la noradrenalina se desplazó a la izquierda en presencia de iberiotoxina (10^{-7} M), (Figura 22) o charibdotoxina (10^{-7} M) (Figura 23). Mientras que ni la apamina (10^{-6} M) ni la glibenclamida (10^{-5} M) modificaron la curva concentración-respuesta a la noradrenalina (Figura 24). La combinación de iberiotoxina más apamina no potenció más que la iberiotoxina sola (Figura 22). La incubación conjunta de charibdotoxina y apamina no tuvo mayor efecto que la administración de charibdotoxina sola (Figura 23). En cuanto a los segmentos venosos procedentes del grupo de pacientes no dializados no se observó potenciación con los diferentes bloqueantes utilizados (Figuras 22, 23 y 24). Las tablas 13, 14 y 15 muestran los valores de concentración eficaz 50 y del efecto máximo de las curvas concentración-respuesta a la noradrenalina incubadas con los diferentes bloqueantes de los canales de K^+ para los segmentos venosos procedentes de individuos sanos, pacientes urémicos no dializados y pacientes urémicos hemodializados respectivamente.

Estos resultados ponen de manifiesto la participación de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} de alta conductancia en segmentos venosos del grupo control y del grupo de hemodializados en respuesta a la noradrenalina.

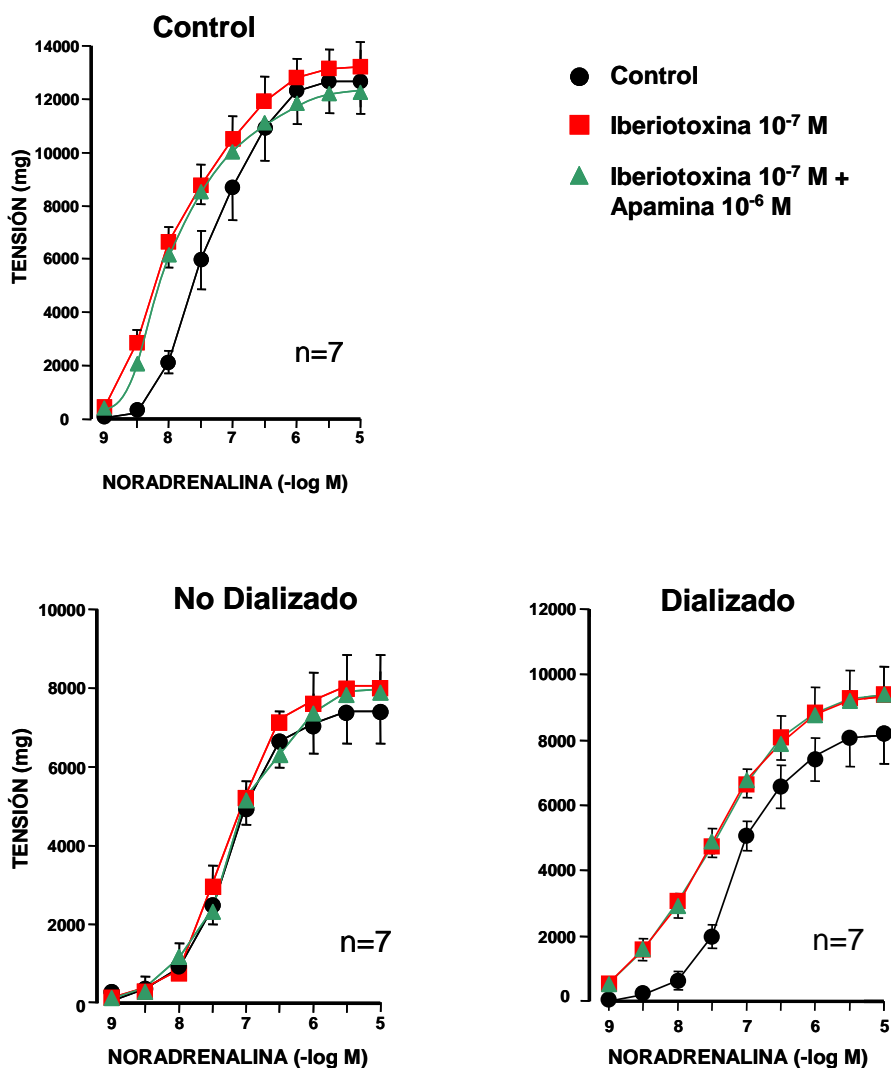


Figura 22. Curvas concentración-respuesta a la noradrenalina en ausencia (control) y presencia de iberiotoxina (10^{-7} M) y de iberiotoxina (10^{-7} M) más apamina (10^{-6} M). En todos los casos se incubó previamente con indometacina (10^{-5} M) y L-NMMA (10^{-4} M).

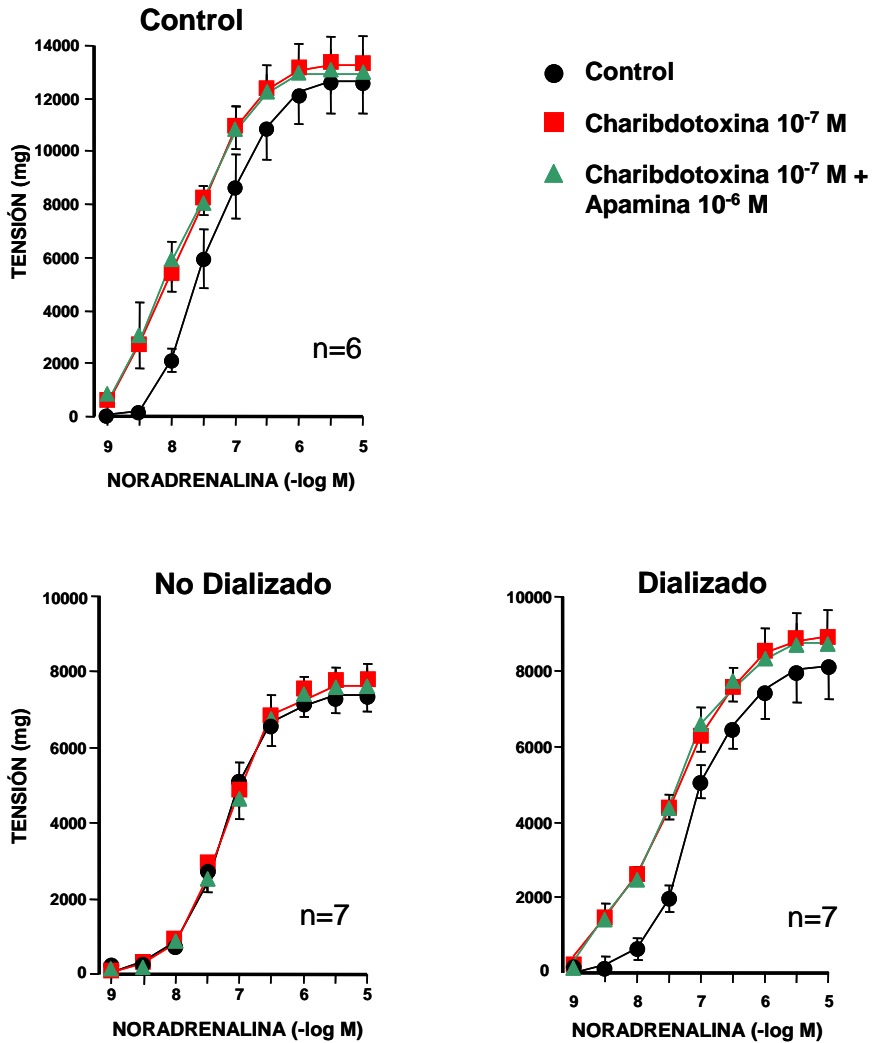


Figura 23. Curvas concentración respuesta a la noradrenalina en ausencia (control) y en presencia de charibdotoxina (10^{-7} M) o de charibdotoxina (10^{-7} M) más apamina (10^{-6} M). En todos los casos se incubó previamente con indometacina (10^{-5} M) y L-NMMA (10^{-4} M).

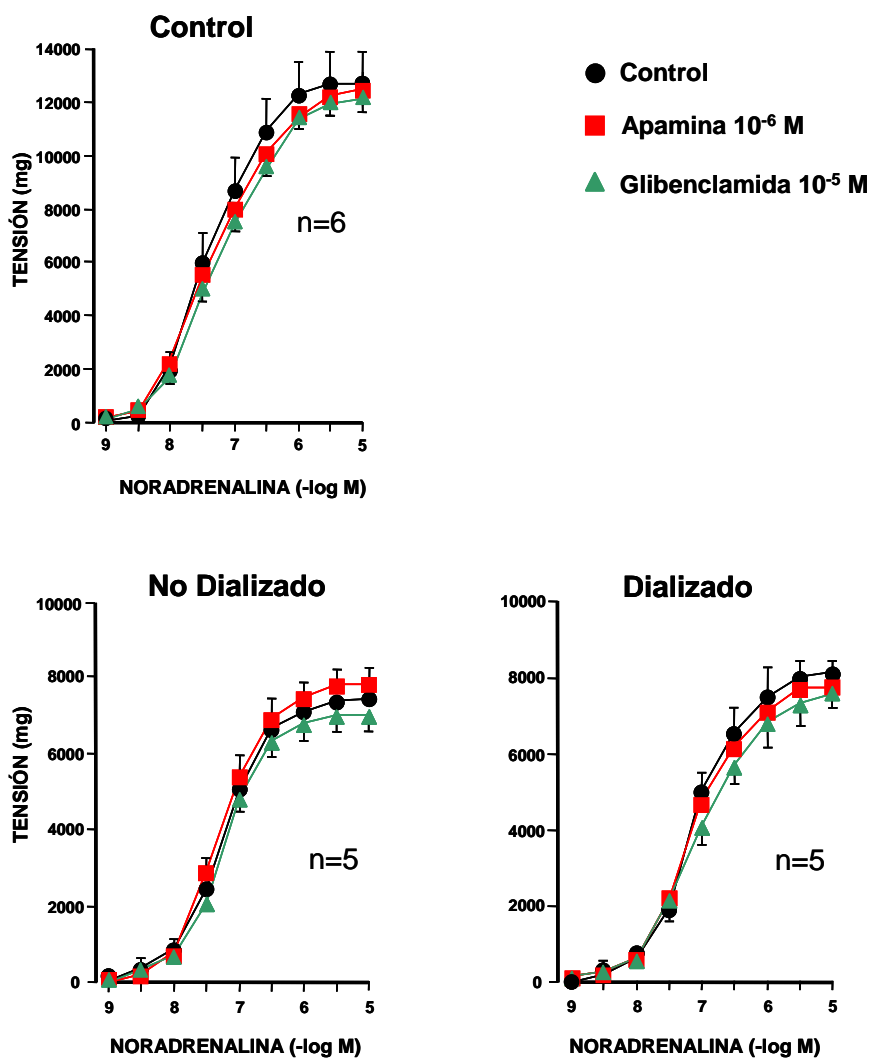


Figura 24. Curvas concentración-respuesta a la noradrenalina en ausencia (control) y en presencia de glibenclamida (10^{-5} M) o apamina (10^{-6} M). En todos los casos se incubó previamente con indometacina (10^{-5} M) y L-NMMA (10^{-4} M).

Tabla 13. Valores de concentración eficaz 50 (CE_{50} , molar, M) su intervalo de confianza del 95 % y del efecto máximo (E_{max}) \pm error estándar, (e.e.) de la noradrenalina en anillos venosos procedentes de sujetos control, En todos los casos se incubó con indometacina (10^{-5} M) y L-NMMA (10^{-4} M).

CONTROL			
Noradrenalina	n	CE_{50} (M) Intervalo de Confianza 95 %	$E_{max} \pm e.e.$
Control	7	$4,77 \times 10^{-8}$ ($3,36 \times 10^{-8}$ - $6,78 \times 10^{-8}$)	12663 ± 1197
Iberiotoxina 10^{-7} M	7	$1,24 \times 10^{-8}$ ($9,67 \times 10^{-9}$ - $1,58 \times 10^{-8}$)*	13262 ± 882
Charibdotoxina 10^{-7} M	6	$1,40 \times 10^{-8}$ ($8,04 \times 10^{-9}$ - $2,43 \times 10^{-8}$)*	13284 ± 1090
Apamina 10^{-6} M	6	$4,20 \times 10^{-8}$ ($3,05 \times 10^{-8}$ - $5,79 \times 10^{-8}$)	12478 ± 616
Iberiotoxina 10^{-7} M + Apamina 10^{-6} M	7	$1,05 \times 10^{-8}$ ($8,44 \times 10^{-9}$ - $1,32 \times 10^{-8}$)*	12314 ± 613
Charibdotoxina 10^{-7} M+ Apamina 10^{-6} M	6	$1,33 \times 10^{-8}$ ($6,73 \times 10^{-9}$ - $2,61 \times 10^{-8}$)*	12940 ± 641
Glibenclamida 10^{-5} M	6	$5,05 \times 10^{-8}$ ($3,45 \times 10^{-8}$ - $7,41 \times 10^{-8}$)	12095 ± 497

(*) $P < 0,05$ comparado con el control.

Tabla 14. Valores de concentración eficaz 50 (CE_{50} , molar, M) su intervalo de confianza del 95 % y del efecto máximo (E_{max}) \pm error estándar, (e.e.) de la noradrenalina en anillos venosos procedentes de sujetos control, En todos los casos se incubó con indometacina (10^{-5} M) y L-NMMA (10^{-4} M).

NO DIALIZADO			
Noradrenalina	n	CE_{50} (M) Intervalo de Confianza 95 %	$E_{max} \pm e.e.$
Control	6	$5,06 \times 10^{-8}$ ($3,29 \times 10^{-8}$ - $7,77 \times 10^{-8}$)	7400 ± 803
Iberiotoxina 10^{-7} M	7	$4,86 \times 10^{-8}$ ($3,73 \times 10^{-8}$ - $6,32 \times 10^{-8}$)	8070 ± 765
Charibdotoxina 10^{-7} M	7	$5,58 \times 10^{-8}$ ($4,22 \times 10^{-8}$ - $7,38 \times 10^{-8}$)	7642 ± 472
Apamina 10^{-6} M	5	$4,65 \times 10^{-8}$ ($3,86 \times 10^{-8}$ - $5,59 \times 10^{-8}$)	7788 ± 995
Iberiotoxina 10^{-7} M + Apamina 10^{-6} M	7	$5,62 \times 10^{-8}$ ($4,91 \times 10^{-8}$ - $6,44 \times 10^{-8}$)	$8346 \pm$ 1069
Charibdotoxina 10^{-7} M+ Apamina 10^{-6} M	7	$6,73 \times 10^{-8}$ ($5,16 \times 10^{-8}$ - $8,78 \times 10^{-8}$)	7505 ± 561
Glibenclamida 10^{-5} M	5	$5,23 \times 10^{-8}$ ($4,27 \times 10^{-8}$ - $6,42 \times 10^{-8}$)	7381 ± 430

(*) $P < 0,05$ comparado con el control

Tabla 15. Valores de concentración eficaz 50 (CE_{50} , molar, M) su intervalo de confianza del 95 % y del efecto máximo (E_{max}) \pm error estándar, (e.e.) de la noradrenalina en anillos venosos procedentes de sujetos control, En todos los casos se incubó con indometacina (10^{-5} M) y L-NMMA (10^{-4} M).

DIALIZADO			
Noradrenalina	n	CE_{50} (M) Intervalo de Confianza 95 %	$E_{max} \pm e.e.$
Control	5	$5,69 \times 10^{-8}$ ($3,87 \times 10^{-8}$ - $8,37 \times 10^{-8}$)	8150 ± 894
Iberiotoxina 10^{-7} M	7	$2,29 \times 10^{-8}$ ($1,25 \times 10^{-8}$ - $4,17 \times 10^{-8}$)*	9370 ± 883
Charibdotoxina 10^{-7} M	7	$2,89 \times 10^{-8}$ ($2,22 \times 10^{-8}$ - $3,77 \times 10^{-8}$)*	8919 ± 729
Apamina 10^{-6} M	5	$6,21 \times 10^{-8}$ ($4,61 \times 10^{-8}$ - $8,36 \times 10^{-8}$)	7767 ± 690
Iberiotoxina 10^{-7} M + Apamina 10^{-6} M	7	$3,07 \times 10^{-8}$ ($1,93 \times 10^{-8}$ - $4,88 \times 10^{-8}$)*	9336 ± 314
Charibdotoxina 10^{-7} M+ Apamina 10^{-6} M	7	$2,95 \times 10^{-8}$ ($2,48 \times 10^{-8}$ - $3,50 \times 10^{-8}$)*	8742 ± 557
Glibenclamida 10^{-5} M	5	$7,59 \times 10^{-8}$ ($5,38 \times 10^{-8}$ - $1,07 \times 10^{-7}$)	7597 ± 576

(*) $P < 0,05$ comparado con el control

1.2.3 Respuesta al estímulo eléctrico

El estímulo eléctrico (15 V, 0,2 ms de duración, 1, 2 y 4 Hz durante 15 s), indujo contracción dependiente de la frecuencia en segmentos de los tres grupos de estudio. Esta contracción fue abolida al incubar con tetrodotoxina, guanetidina o prazosín, (todos a la concentración de 10^{-6} M), en todo el rango de frecuencias estudiado, lo cual indica que la contracción inducida por el estímulo eléctrico es debida a la liberación de noradrenalina de las terminaciones nerviosas perivasculares y a la activación de los receptores α_1 -adrenérgicos y no a un estímulo directo sobre el músculo liso vascular (Figura 25).

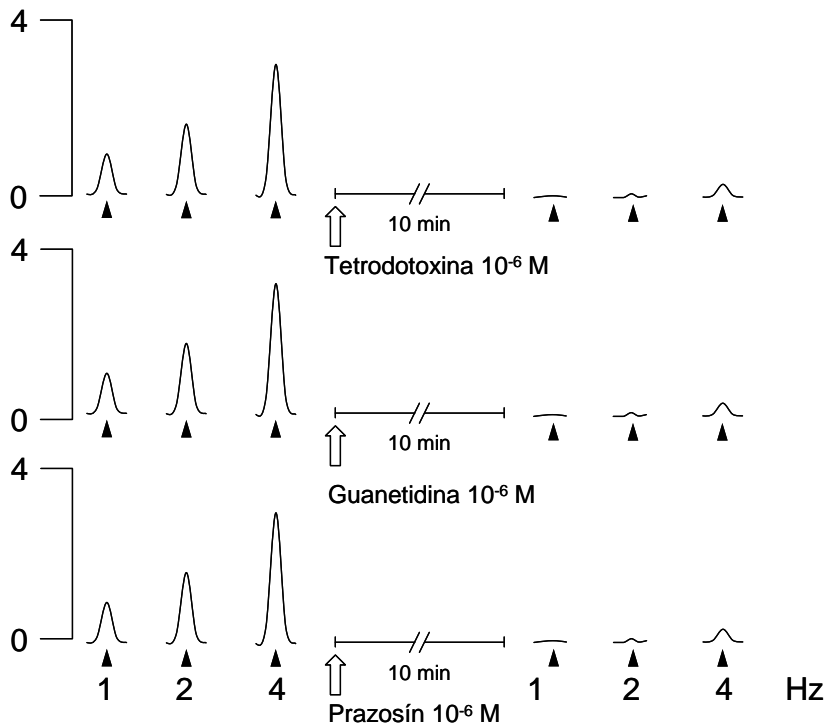


Figura 25. Ejemplo de registro de la respuesta al estímulo eléctrico perivasculares en segmentos venosos del grupo control.

La insuficiencia renal crónica produce una disminución significativa de la respuesta contráctil al estímulo eléctrico ($P < 0,05$) en la vena cefálica en todo el rango de frecuencias estudiado. La respuesta contráctil al estímulo eléctrico fue menor en el grupo de venas procedentes de pacientes hemodializados que en el grupo de no dializados, indicando que la hemodiálisis “per se” o el estado urémico mantenido puede dañar las terminaciones nerviosas perivasculares (Figura 26).

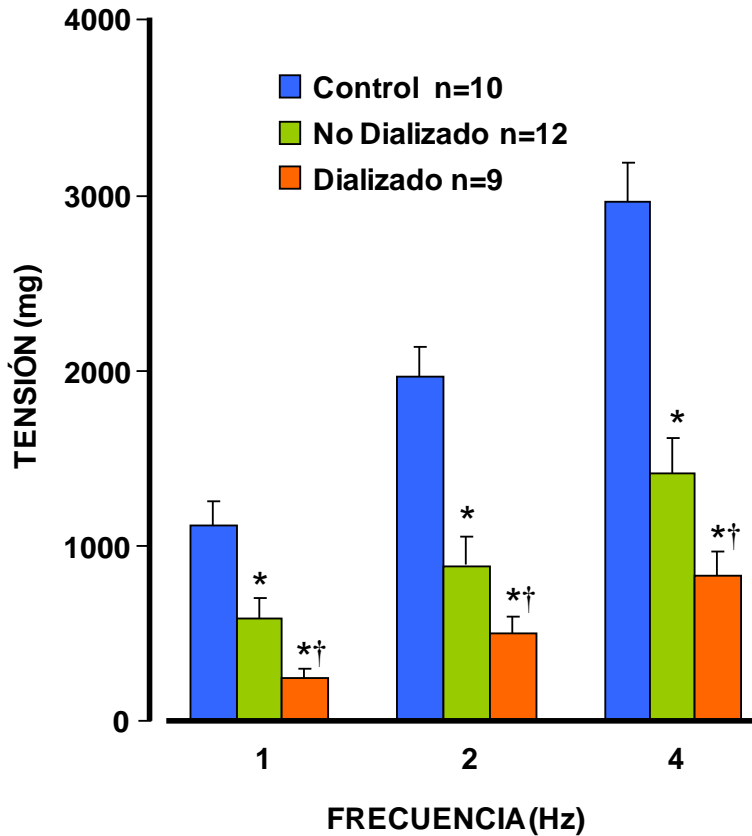


Figura 26. Respuesta contráctil al estímulo eléctrico en los tres grupos de estudio. (*) $P < 0,05$ comparado con el control. (†) $P < 0,05$ comparado con el grupo de no dializados.

Participación de prostaglandinas

Al igual que ocurría con la noradrenalina, la indometacina (10^{-5} M) potenció la respuesta contráctil al estímulo eléctrico en venas procedentes del grupo control ($P < 0,05$) sin modificar significativamente la respuesta en segmentos procedentes de pacientes con insuficiencia renal crónica, en todo el rango de

frecuencias estudiado (Figura 27). Estos resultados indican que el estímulo neurógeno es capaz de inducir la liberación de prostaglandinas relajantes en la vena cefálica de sujetos sanos, pero no en las venas de pacientes urémicos.

Participación de óxido nítrico

El L-NMMA (10^{-4} M) potenció la respuesta al estímulo eléctrico en segmentos del grupo control ($P < 0,05$) pero no en los segmentos de pacientes urémicos (Figura 27). Estos resultados sugieren que el estímulo eléctrico es capaz de inducir la liberación de óxido nítrico en la vena cefálica de sujetos sanos.

Sin embargo, la inhibición conjunta de la COX y la NOS con indometacina y L-NMMA produce un aumento de contracción mayor que al administrar cada uno de los inhibidores por separado. Esto lo observamos en venas procedentes de los tres grupos de estudio, indicando la existencia de un sinergismo entre ambas vías que no es alterado por la uremia.

Participación de canales de potasio

De nuevo la situación control de las curvas frecuencia-respuesta, requiere del bloqueo previo de la COX y la NOS con indometacina y L-NMMA respectivamente.

En estas condiciones, tanto la iberiotoxina (10^{-7} M) como la charibdotoxina (10^{-7} M) potenciaron la respuesta contráctil al

estímulo eléctrico en muestras de los tres grupos de estudio (Figuras 28 y 29). La apamina (10^{-6} M) no modificó la respuesta al estímulo eléctrico (Figura 30), ni la potenciación producida por la iberiotoxina (10^{-7} M) o por la charibdotoxina (10^{-7} M) (Figuras 28 y 29). Estos resultados indican que en los tres grupos de estudio hay una participación de los canales de K^{+} activados por Ca^{2+} de gran conductancia en respuesta al estímulo neurógeno.

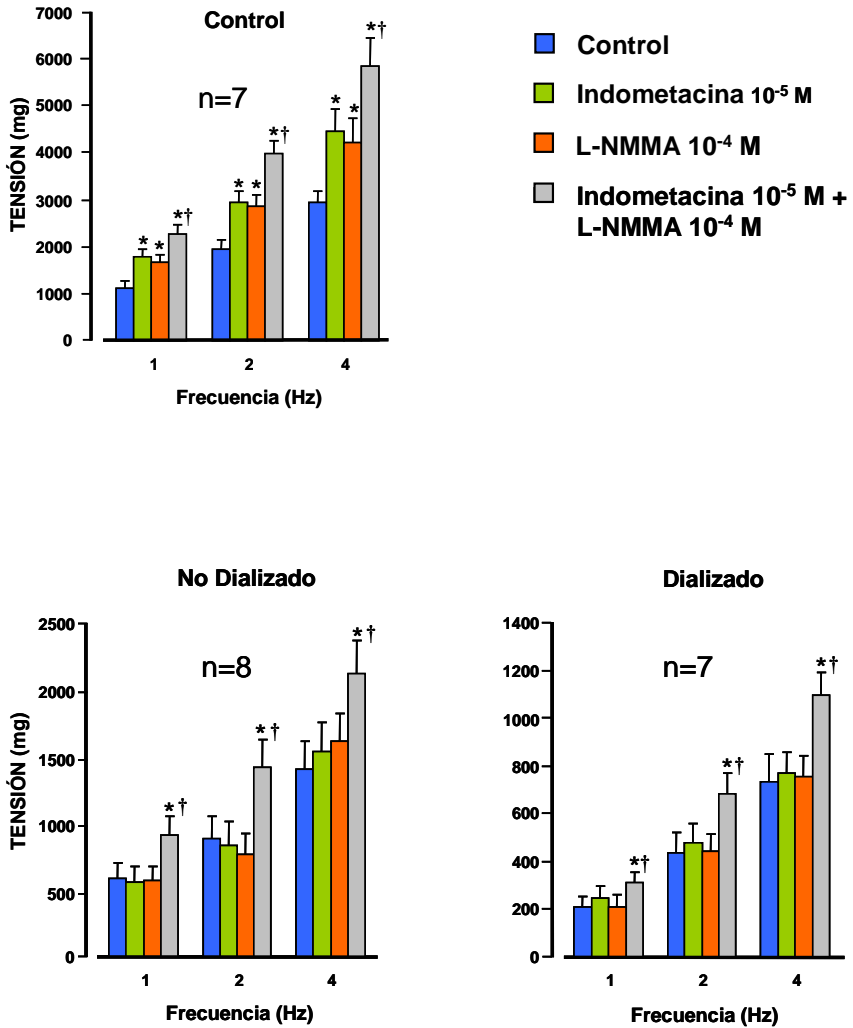


Figura 27. Respuesta contráctil al estímulo eléctrico en los tres grupos de estudio en ausencia (control) y en presencia de indometacina ($10^{-5} M$), L-NMMA ($10^{-4} M$), e indometacina ($10^{-5} M$) más L-NMMA ($10^{-4} M$). (*) $P < 0,05$ comparado con el control. (†) $P < 0,05$ comparado con el tratamiento con indometacina ($10^{-5} M$) o con L-NMMA ($10^{-4} M$).

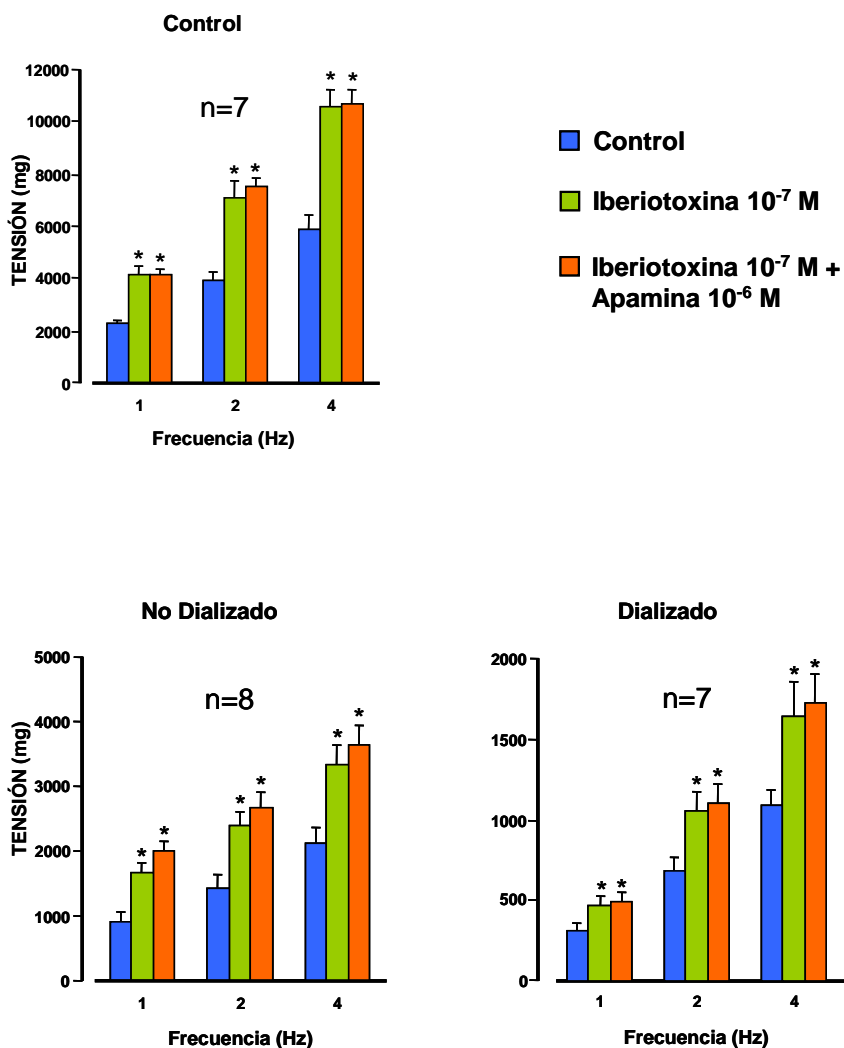


Figura 28. Respuesta contráctil al estímulo eléctrico en los tres grupos de estudio en ausencia (control) y en presencia de iberiotoxina (10^{-7} M), iberiotoxina (10^{-7} M) más apamina (10^{-6} M). En todos los casos se incubó con indometacina (10^{-5} M) y L-NMMA (10^{-4} M). (*) $P < 0,05$ comparado con el control.

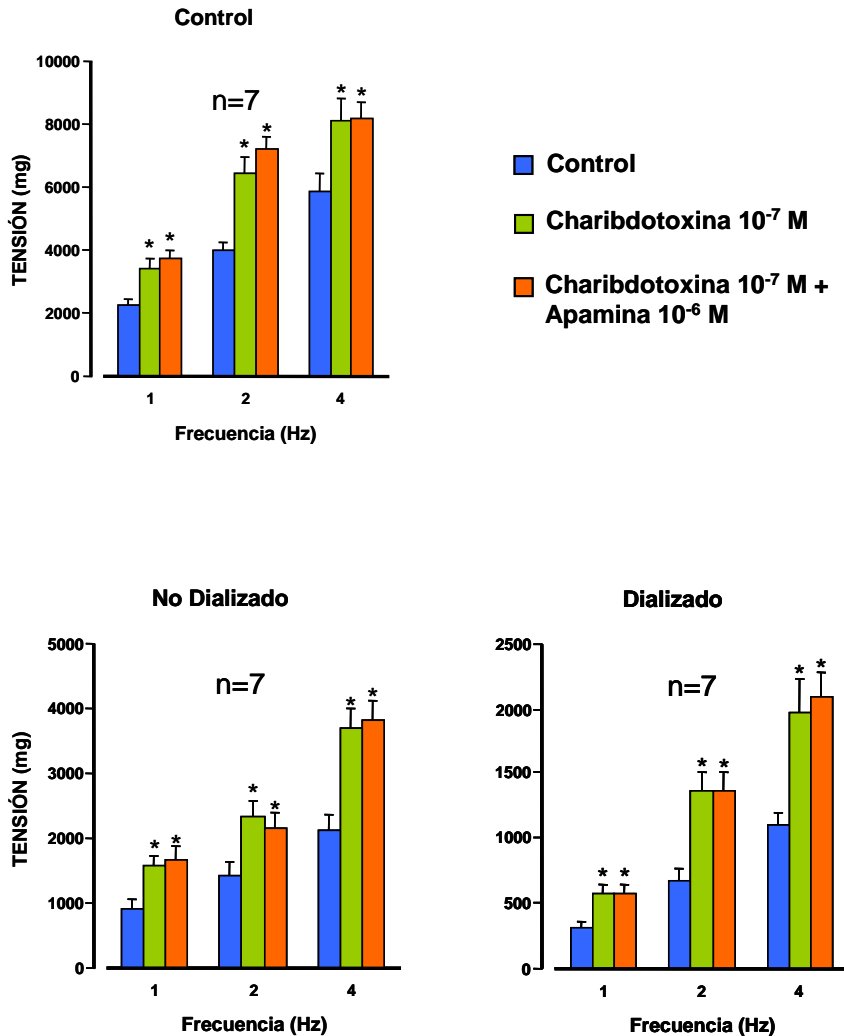


Figura 29. Respuesta contráctil al estímulo eléctrico en los tres grupos de estudio en ausencia (control) y en presencia charibdotoxina (10^{-7} M) y charibdotoxina (10^{-7} M) más apamina (10^{-6} M). En todos los casos se incubó con indometacina (10^{-5} M) y L-NMMA (10^{-4} M). (*) $P < 0,05$ comparado con el control.

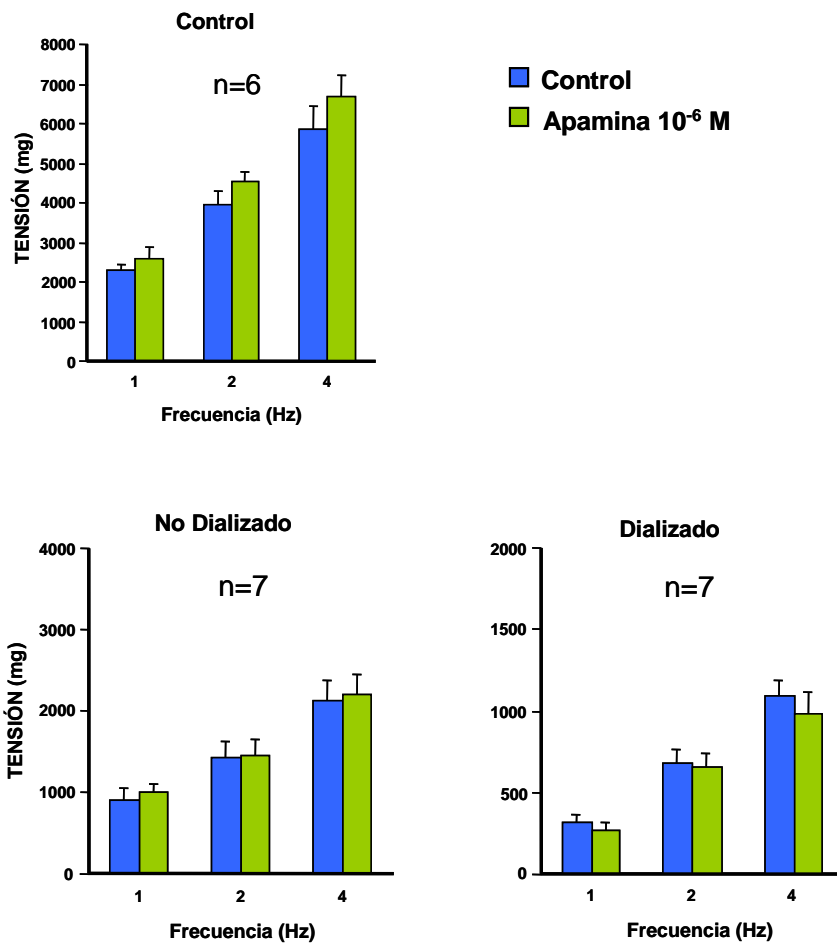


Figura 30. Respuesta contráctil al estímulo eléctrico en los tres grupos de estudio en ausencia (control) y en presencia de apamina (10^{-6} M). En todos los casos se incubó con indometacina (10^{-5} M) y L-NMMA (10^{-4} M).

1.2.4 Respuesta al cloruro cálcico

Los segmentos de vena cefálica procedentes de pacientes que han desarrollado insuficiencia renal crónica tienen una menor capacidad contráctil a estímulos como el KCl, la noradrenalina o el estímulo nervioso. Puesto que el calcio está implicado en la contracción del músculo liso vascular, se diseñaron experimentos para valorar su participación en las siguientes condiciones:

- En un medio sin calcio, que contenía KCl (100 mM)
- En un medio sin calcio con noradrenalina (10^{-6} M)

En estas condiciones se realizaron curvas concentración-respuesta al CaCl_2 (10^{-4} a 3×10^{-2} M).

El mecanismo de contracción del KCl implica la entrada de calcio extracelular al interior de la célula muscular lisa, por lo tanto si no hay calcio en el medio el KCl no produce contracción. En muestras incubadas en un medio sin calcio con 100 mM de KCl, la adición de CaCl_2 produce contracción dependiente de la concentración. En muestras procedentes de pacientes con insuficiencia renal crónica, la contracción máxima inducida por el CaCl_2 fue significativamente menor ($P < 0,05$) que la alcanzada en las muestras del grupo control. (Figura 31 y tabla 16). Estos resultados indican que la uremia altera los mecanismos de incorporación de Ca^{2+} extracelular independientes de receptor al

músculo liso vascular. Estos efectos no revierten con la hemodiálisis.

Para estudiar la entrada de calcio estimulada por receptor se realizaron curvas concentración-respuesta al CaCl_2 en un medio sin calcio y en presencia de noradrenalina (10^{-6} M). El efecto máximo (E_{max}) fue menor en los segmentos procedentes de pacientes con insuficiencia renal crónica, sometidos o no a hemodiálisis, indicando una menor entrada de calcio mediada por receptor (Figura 31 y tabla 17).

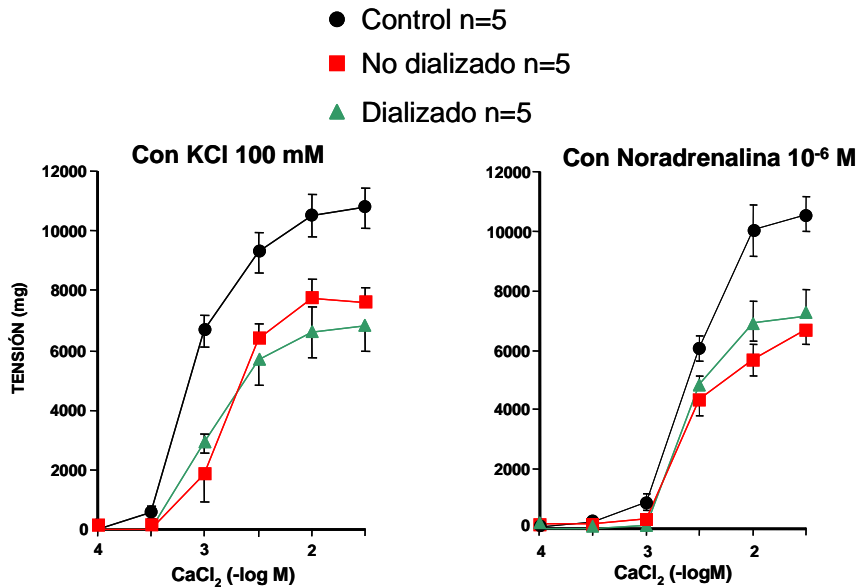


Figura 31. Curvas concentración respuesta al CaCl_2 en un medio sin calcio en presencia de KCl (100 mM) y en presencia de noradrenalina (10^{-6} M) en los tres grupos de estudio.

Tabla 16. Valores de concentración eficaz 50 (CE_{50} , molar, M) su intervalo de confianza del 95 % y del efecto máximo (Emax) \pm error estándar (e.e.), de las curvas concentración-respuesta al CaCl_2 en un medio sin calcio, en presencia de KCl (100 mM) en venas de pacientes de los tres grupos de estudio.

CaCl_2 con KCl 100 mM	n	CE_{50} (mM) Intervalo de Confianza 95 %	$\text{Emax} \pm \text{e.e.}$ (% relajación)
Control	5	$7,9 \times 10^{-4}$ ($7,1 \times 10^{-4} - 8,7 \times 10^{-4}$)	10782 ± 730
No dializado	5	$1,8 \times 10^{-3}$ ($1,6 \times 10^{-3} - 2,2 \times 10^{-3}$)*	$7619 \pm 998^*$
Dializado	5	$1,2 \times 10^{-3}$ ($1,0 \times 10^{-3} - 1,3 \times 10^{-3}$)*	$6792 \pm 790^*$

(*) $P < 0,05$ comparado con el control.

Tabla 17: Valores de concentración eficaz 50 (CE_{50} , molar, M) su intervalo de confianza del 95 % y del efecto máximo (E_{max}) \pm error estándar (e.e.), de las curvas concentración-respuesta al $CaCl_2$ en un medio sin calcio, en presencia de noradrenalina (NA) (10^{-6} M) en venas de pacientes de los tres grupos de estudio.

CaCl ₂ (medio con NA)	n	CE ₅₀ (mM) Intervalo de Confianza 95 %	E _{max} \pm e.e. (% relajación)
Control	5	3,0x10 ⁻³ (1,7x10 ⁻³ -5,3x10 ⁻³)	10028 \pm 879
No dializado	5	2,9x10 ⁻³ (2,1x10 ⁻³ - 4,0x10 ⁻³)	6725 \pm 519*
Dializado	5	2,6x10 ⁻³ (2,1x10 ⁻³ - 3,2x10 ⁻³)	7163 \pm 474*

(*) $P < 0,05$ comparado con el control.

La noradrenalina, además de permitir la entrada de calcio extracelular, es capaz de movilizar los depósitos de calcio intracelular. Por eso en un medio sin calcio una concentración adecuada de noradrenalina (10^{-6} M), es capaz de producir una pequeña contracción que será debida a la salida de calcio de los depósitos intracelulares. La contracción inducida por noradrenalina (10^{-6} M) en un medio sin calcio es menor en las muestras procedentes de pacientes urémicos. No se observaron diferencias debidas a la hemodiálisis (Figura 32).

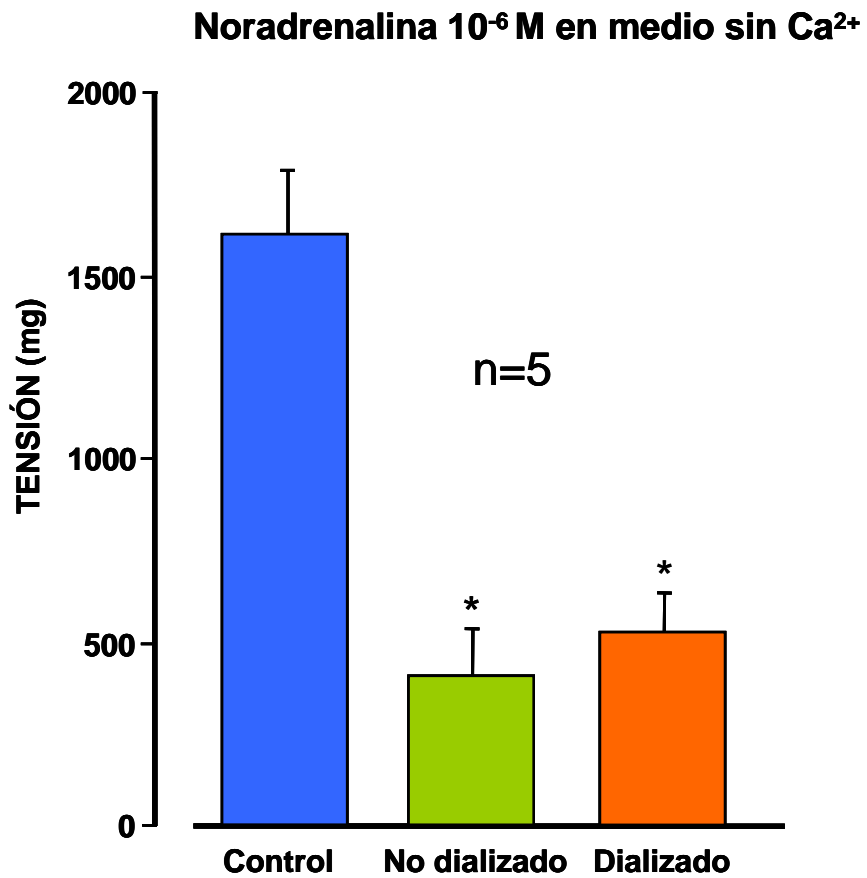


Figura 32. Efecto máximo contráctil a la noradrenalina (10^{-6} M) en medio sin calcio en los tres grupos de estudio. (*) $P < 0,05$ comparado con el control.

2 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Se midió la cantidad de ARN mensajero por RT-PCR de los genes que expresan la DDAH-1, eNOS, COX-1, COX-2 y los canales de K⁺ activados por calcio de gran conductancia en los tres grupos de estudio.

La DDAH-1, enzima encargada de metabolizar el ADMA y el L-NMMA, disminuyó su expresión génica en venas procedentes de pacientes urémicos. En el grupo de no dializados disminuyó un 64% y en el grupo de dializados un 80% respecto al control. Esto indica que el acúmulo de toxinas urémicas puede ser debido al déficit de DDAH-1 (Figura 33).

En cuanto a la expresión génica de la eNOS, se observó un aumento (el doble) en venas procedentes de pacientes urémicos no dializados. Sin embargo, no encontramos diferencias en la expresión génica de eNOS entre las venas procedentes de individuos sanos y pacientes urémicos sometidos a hemodiálisis prolongada (Figura 34).

La expresión génica de la COX-1 no se modificó en pacientes con insuficiencia renal crónica. Sin embargo, la isoforma inducible COX-2 se sobreexpresó un 67% en venas de pacientes urémicos sometidos a hemodiálisis (Figura 35).

La expresión génica de los canales de K^+ activados por calcio de alta conductancia fue mayor (1,7 veces más) en los segmentos venosos procedentes de pacientes urémicos no dializados con respecto al control (Figura 36).

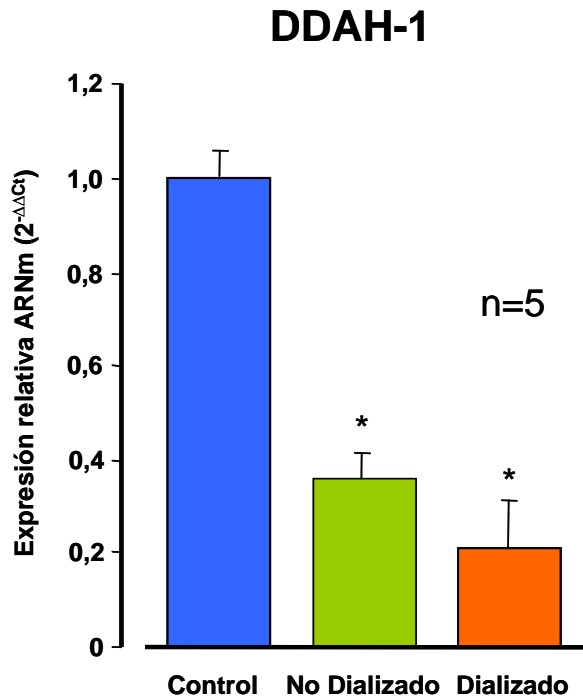


Figura 33. Expresión relativa de ARNm del gen DDAH-1 en vena cefálica de los tres grupos de estudio. (*) $P < 0,05$ comparado con el control.

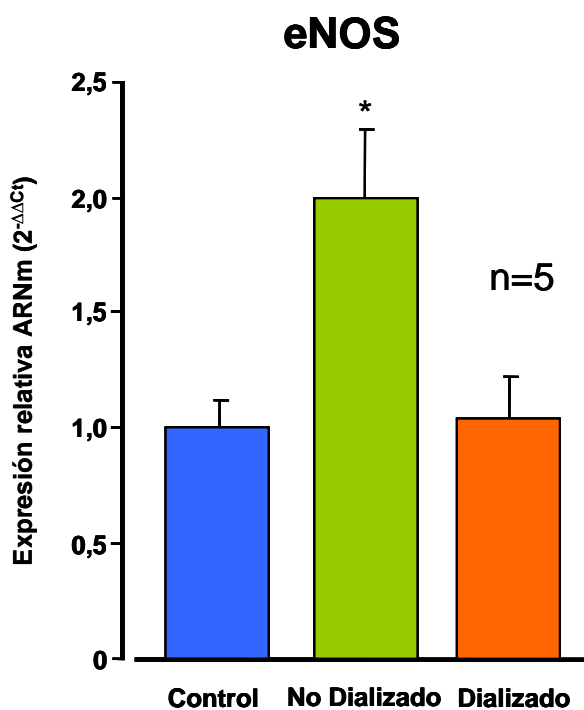


Figura 34. Expresión relativa de ARNm del gen de la eNOS en vena cefálica de los tres grupos de estudio. (*) $P < 0,05$ comparado con el control.

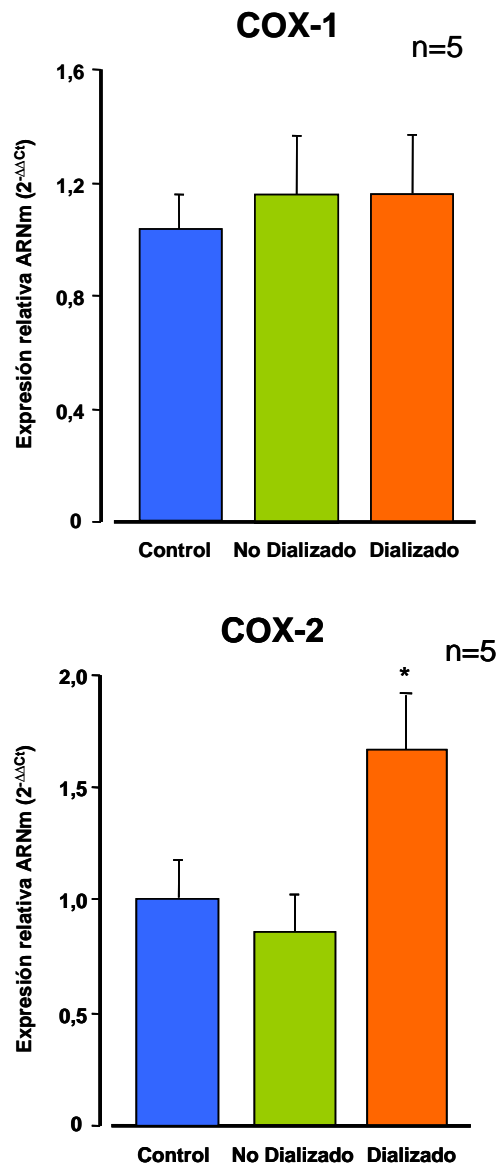


Figura 35. Expresión relativa de ARNm de los genes COX-1 y COX-2 en vena cefálica de los tres grupos de estudio. (*) $P < 0,05$ comparado con el control.

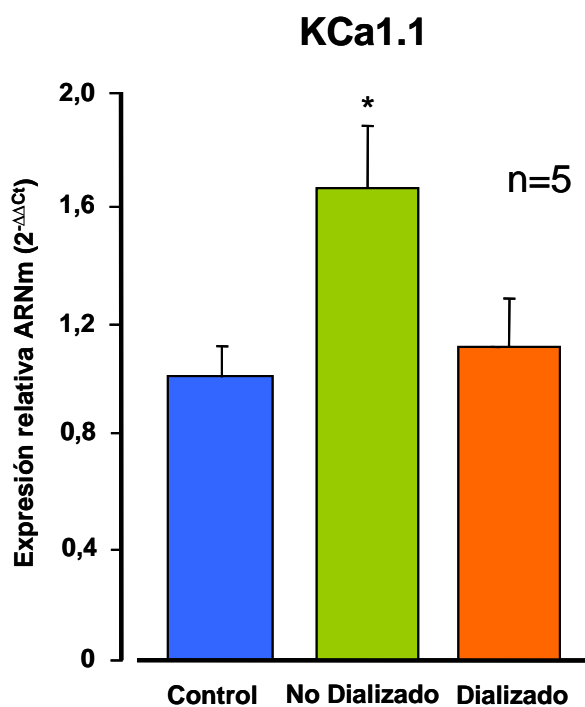


Figura 36. Expresión relativa de ARNm del gen del canal de K^+ activado por Ca^{2+} de alta conductancia en vena cefálica de los tres grupos de estudio. (*) $P < 0,05$ comparado con el control.

DISCUSIÓN

PROCEDENCIA DE LOS SEGMENTOS VENOSOS

La posibilidad de estudiar venas de pacientes urémicos surge como consecuencia de la realización de la fístula arteriovenosa para comenzar el tratamiento con hemodiálisis. Con el paso del tiempo la fístula original puede fracasar necesitándose una nueva anastomosis en el otro brazo. Según se describió de forma esquemática en la Figura 4, la anastomosis término-lateral obliga a la ligadura de uno de los extremos de la vena cefálica y es precisamente de ese extremo ligado de donde procede la rama colateral utilizada en nuestros experimentos. De esta forma, y debido a la amplia vascularización superficial de la mano, el procedimiento de obtención no entraña una anomalía en el retorno venoso de la mano ni altera el flujo de sangre por la fístula. Las causas del fracaso de las fístulas son múltiples, una de las más frecuentes es la trombosis.^{132,133}

El procedimiento que hemos utilizado permite el estudio *in vitro* de segmentos venosos sin riesgos ni actuaciones técnicas adicionales que puedan perjudicar al paciente. La utilización de los segmentos venosos cuenta con la aprobación del Comité Ético del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

VENTAJAS Y LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

En primer lugar, cualquier experimento *in vitro* relacionado con la respuesta vascular debe ser valorado con cautela cuando se intenta extrapolar a la situación *in vivo*. En el vaso aislado falta la regulación neurohormonal presente en el individuo sano o enfermo. Además, los mecanismos de adaptación que pueden aparecer en el enfermo sólo pueden vislumbrarse en el vaso aislado como manifestaciones circunscritas en el órgano efector que es la propia pared vascular. Sin embargo, el estudio de la respuesta del órgano efector ha constituido uno de los objetivos primordiales para conocer los fundamentos de las alteraciones cardiovasculares en la uremia. Este objetivo ha sido sistemáticamente inalcanzable en los estudios *in vivo* por las limitaciones éticas y las derivadas del procedimiento experimental en el enfermo. Precisamente la presencia de reflejos y otras adaptaciones cardiovasculares en los estudios clínicos constituye una limitación cuando se quiere valorar la respuesta del órgano efector.

En segundo lugar, los segmentos venosos utilizados en nuestro trabajo pertenecen a un vaso cutáneo, que no refleja necesariamente lo que pueda ocurrir en arterias o en los vasos profundos de resistencia (arterias de pequeño calibre y arteriolas).

Aunque el sistema venoso desempeña un papel primordial en la regulación de la presión arterial,¹³⁴ existen pocos estudios relacionados con la función de este sistema en la insuficiencia renal crónica a pesar de que la hipotensión arterial es un fenómeno frecuente en los pacientes hemodializados que puede causar complicaciones graves.¹³⁵ Aunque las causas de este fenómeno son desconocidas, en casi todos los mecanismos propuestos interviene la alteración de la respuesta del sistema venoso ante la hipovolemia como uno de los factores determinantes.^{136,137} Las venas cutáneas de las extremidades tienen una regulación nerviosa simpática considerable y una marcada respuesta a las catecolaminas, dos circunstancias que reflejan su participación activa en el retorno venoso al corazón.^{138,139} Una disminución de la respuesta del órgano efector puede significar una disminución en el retorno venoso y por consiguiente una reducción en la precarga cardíaca. Por otra parte, el estudio en venas superficiales del antebrazo evita los efectos adicionales asociados con la hipertrofia vascular y otros cambios estructurales que con frecuencia aparecen en arterias de pacientes con hipertensión.¹³⁸ Las venas humanas y, especialmente las de las extremidades superiores, no desarrollan aterosclerosis a menos que estén expuestas a las mismas condiciones hemodinámicas que las arterias, como ocurre en los injertos venosos.¹⁴⁰ Sin embargo, con la diálisis prolongada se pueden presentar alteraciones estructurales en las venas^{141,142} que

pueden representar un factor añadido en las alteraciones vasculares de la uremia.

La respuesta de esta vena a estímulos nerviosos y farmacológicos es cualitativamente (y a veces cuantitativamente) similar a la obtenida en arterias localizadas en la misma región (arteria radial) y en ramas arteriales cutáneas de otras regiones.^{143,144} La relajación dependiente del endotelio tiene características similares a las descritas en arterias y venas de diversas regiones,^{57,145} incluyendo vénulas humanas del antebrazo, que constituyen un lecho vascular de capacitancia.¹⁴⁶

En último lugar, la expresión génica de enzimas implicados en la función vascular podría estar alterada en la insuficiencia renal crónica o como consecuencia del tratamiento prolongado con hemodiálisis, justificando algunos de los cambios funcionales observados en esta patología. No hay que olvidar que en otros órganos o incluso en otros lechos vasculares, la expresión de los mismos genes podría no verse alterada de la misma forma.

Los resultados expuestos en este trabajo, utilizando segmentos de vena cefálica *in vitro*, indican que la insuficiencia renal crónica se acompaña de alteraciones en diversos sistemas:

- a) Disminución de la respuesta relajante dependiente de endotelio. Alteración en la participación del óxido nítrico y del factor hiperpolarizante derivado del endotelio.
- b) Hipocontractilidad del músculo liso vascular. Disminución de la síntesis o liberación de prostaciclina y NO. Alteración de la participación de los canales de potasio y del calcio.
- c) Alteraciones en la expresión de genes implicados en la reactividad vascular.

Estas conclusiones derivan de los resultados obtenidos agrupados en los siguientes apartados:

RESPUESTA RELAJANTE

La acetilcolina activa receptores muscarínicos localizados en el endotelio produciendo vasodilatación.¹²⁷ Por lo tanto, la destrucción del endotelio implica la desaparición de esta relajación.

Como han demostrado diversos autores, en la insuficiencia renal crónica existe una reducción en la bioactividad

del NO, probablemente por acúmulo de toxinas urémicas, ocasionando una disfunción endotelial.^{147,148} En concordancia con estos estudios, nuestros resultados indican una menor respuesta a la acetilcolina en muestras procedentes de pacientes con insuficiencia renal crónica. Además, como la respuesta relajante a la acetilcolina en segmentos venosos de pacientes hemodializados es mayor que la obtenida en los pacientes no dializados, podemos considerar que la hemodiálisis es capaz de mejorar la función endotelial, recuperando parte de la relajación endotelio-dependiente.

En la insuficiencia renal crónica se suman diferentes factores con un potencial riesgo aterogénico; destacamos el aumento de los niveles plasmáticos de homocisteína,⁶ el aumento de inhibidores específicos de la NOS, como el ADMA o el L-NMMA⁵⁵ y el incremento del estrés oxidativo.¹⁴⁹ También se ha asociado la disfunción vascular en la uremia a la existencia de unas micropartículas circulantes llamadas Annexin V+ cuyo origen es endotelial; estas partículas están elevadas en los pacientes con insuficiencia renal crónica.¹⁵⁰ Todos estos factores pueden ser responsables en mayor o en menor medida de la relajación disminuida a la acetilcolina en la uremia. Es posible que factores estructurales en la pared vascular también puedan limitar la relajación del músculo liso. En este sentido se ha

descrito un incremento en el espesor de la capa de músculo liso en vena ilíaca¹⁴¹ y braquial¹⁴² de pacientes sometidos a diálisis.

En la presente tesis nos hemos centrado en estudiar la participación de sustancias derivadas del endotelio (NO, PGI₂ y EDHF) en la respuesta a la acetilcolina en la vena cefálica humana y si existen alteraciones debidas a la insuficiencia renal crónica o al tratamiento prolongado con hemodiálisis.

Al igual que ocurre en otros lechos vasculares¹⁵¹ en la vena cefálica humana, las prostaglandinas relajantes no intervienen en la respuesta a la acetilcolina.

La acetilcolina libera óxido nítrico del endotelio^{127,152} y nuestros resultados lo corroboran, ya que el L-NMMA, inhibidor de la NOS, bloqueó parte de la relajación inducida por acetilcolina y en presencia de L-arginina, los efectos inhibidores del L-NMMA fueron completamente revertidos, lo que indica que la L-arginina compite con los inhibidores de la NOS para restaurar la síntesis de NO y la relajación derivada del endotelio. La inhibición con L-NMMA disminuye la respuesta a la acetilcolina en venas de individuos sanos y de pacientes urémicos no dializados, mientras que en venas de pacientes sometidos a hemodiálisis la participación de NO en respuesta a la acetilcolina es prácticamente nula. Puesto que, la relajación es menor en los pacientes urémicos no dializados que en los individuos sanos,

podemos deducir que la cantidad de NO producida también será menor. Por lo tanto, la insuficiencia renal crónica podría disminuir la producción o liberación de NO en la vena cefálica humana, contribuyendo así a la disfunción endotelial, que a su vez, predispone a la aparición de aterosclerosis en estos pacientes.

La disminución en la vasodilatación dependiente de endotelio que encontramos en la insuficiencia renal crónica podría ser debida al incremento de los niveles de inhibidores de la NOS como ADMA o L-NMMA que se da en el estado urémico.⁵⁵ El incremento de estas sustancias puede ser debido a la disminución de la DDAH, enzima responsable de la degradación de las dimetilargininas.⁶⁴ En este sentido, se ha descrito una disminución de la DDAH a nivel renal en ratas nefrectomizadas como responsable del incremento de ADMA.¹⁵³ Nuestros resultados indican una disminución de la expresión génica de la DDAH-1 en vena cefálica de pacientes urémicos, lo cual favorecería un aumento de compuestos guanidino que explicaría la disminución de la síntesis de NO en la uremia. Faltaría por dilucidar si la disminución en la expresión génica se traduce en una disminución de la síntesis proteica de la DDAH-1.

Algunos autores demuestran que el tratamiento con hemodiálisis, disminuye las concentraciones plasmáticas de toxinas urémicas.^{62,154} Sin embargo otros demuestran que siguen

aumentadas tras el tratamiento.^{55,63} Aunque la hemodiálisis aumente la síntesis de NO porque disminuya los niveles de inhibidores de la NOS con respecto a los pacientes urémicos no dializados, funcionalmente el bloqueo con L-NMMA de las curvas concentración-respuesta a la acetilcolina no disminuyó la relajación de forma significativa. Como demostraron nuestros resultados, la relajación al nitroprusiato fue menor en el grupo de pacientes hemodializados demostrando que aunque se recuperara la síntesis de NO, éste podría no ser activo. Otros autores ya han demostrado que en pacientes urémicos dializados existe una disminución de la bioactividad del NO, que contribuye a la disfunción vascular.¹⁴⁷ Esta disminución en la actividad del NO puede ser debida al acúmulo de sustancias inhibitoras de la NOS, pero este no parece ser el único motivo,¹⁵⁵ ya que de ser así cabría esperar que la función endotelial mejorara con la administración de L-arginina y esto no ocurre.¹⁵⁵ La hemodiálisis “per se” también puede disminuir la bioactividad del NO por incrementar los peróxidos lipídicos y disminuir los agentes antioxidantes.¹⁵⁶ El estrés oxidativo presente en los pacientes hemodializados¹⁵⁷ puede contribuir a la disfunción endotelial por aumentar la concentración de especies reactivas de oxígeno que disminuyen la bioactividad del NO.¹⁵⁸ Por otra parte, la actividad de la guanilato ciclasa podría estar disminuida y llevar a una reducción de la dilatación en respuesta al NO.¹⁵⁹

Factores estructurales como el aumento del espesor de la capa muscular lisa observado en pacientes sometidos a diálisis^{141,142} también podrían limitar la vasodilatación.

La inhibición de la síntesis de NO no bloquea totalmente la respuesta relajante a la acetilcolina. En todos los grupos de estudio queda una relajación remanente. Puesto que todos los experimentos se realizaron en presencia de indometacina, podemos descartar que esta relajación remanente sea debida a la participación de prostaglandinas vasodilatadoras. Esta relajación residual puede ser debida a la participación del factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF).^{160,161}

Como ya se comentó en la introducción no está clara la identidad ni los mecanismos por los cuales el EDHF relaja el músculo liso vascular. En humanos la existencia del EDHF ha sido demostrada *in vitro* e *in vivo*.^{83,162,163} Se han propuesto algunos candidatos que podrían ser EDHF, entre los que se incluyen iones K⁺ del endotelio,⁹⁵ ácido epoxieicosatrienoico,^{87,88} peróxido de hidrógeno,^{89,90} anandamida,⁹¹ y péptido natriurético tipo C.⁹² Es posible que la naturaleza del EDHF sea diferente dependiendo de la especie, incluso del lecho vascular.¹⁶⁴ En la arteria mamaria interna izquierda humana es el ácido 11,12-epoxieicosatrienoico, producido por una o varias isoformas del citocromo P 450 el responsable del 40% de la relajación dependiente de endotelio.¹⁶⁵ En pequeñas arterias, agonistas

dependientes de receptor como la acetilcolina, pueden inducir relajación por la apertura de canales de K^+ endoteliales que son sensibles a la combinación de la charibdotoxina y apamina, pero no a la combinación de iberiotoxina y apamina o a la iberiotoxina sola.^{95,162}

En nuestros resultados, la relajación remanente se bloqueó en presencia de 20 mM de KCl lo que indica la participación de canales de K^+ en esta respuesta. Puesto que esta relajación es sensible al tetraetilamonio, y no a la glibenclamida, parece que los canales implicados sean canales de K^+ activados por Ca^{2+} . Como la relajación es sensible a la iberiotoxina y a la charibdotoxina, y no lo es a la apamina, es posible que en este efecto estén implicados los canales de K^+ activados por Ca^{2+} de alta conductancia. El hecho de que sea sensible a la charibdotoxina, un bloqueante de canales de alta e intermedia conductancia, no nos permite descartar la participación de estos últimos. Sin embargo, puesto que el bloqueo con charibdotoxina no es mayor que el que se obtiene con iberiotoxina, sugiere que los canales de intermedia conductancia no participan. Además, el bloqueo de todos los canales de K^+ activados por Ca^{2+} con charibdotoxina más apamina frente al bloqueo de los canales de alta y baja conductancia con iberiotoxina más apamina, no presenta diferencias, lo cual indica que los canales de intermedia conductancia tienen una participación escasa o nula.

La interpretación de que sea un canal en particular el que participe en la liberación del EDHF resulta complicada. Es posible que la activación de los diversos canales esté relacionada con el tipo y tamaño del vaso. También podría variar según la patología.⁹⁷

Nuestros resultados sugieren que el EDHF participa en la relajación dependiente del endotelio en todos los grupos de estudio pero juega un papel especialmente importante en la relajación dependiente de endotelio en venas de pacientes tratados con hemodiálisis. En venas de dichos pacientes, la disminución de la relajación mediada por NO podría estar compensada por un incremento de la relajación causada por el EDHF lo cual representaría un mecanismo novedoso de regulación del tono vascular cuando la vía del NO está dañada.¹⁶⁶ Estos mecanismos vasodilatadores compensatorios se han sugerido tanto en humanos¹⁶⁷ como en animales.¹⁶⁸

En diversas preparaciones vasculares la acción del EDHF implica la participación de los canales rectificadores de K^+ y la bomba Na^+-K^+ que son inhibidos por bario y ouabaina respectivamente.^{95,169} En nuestros experimentos, esta combinación de inhibidores abolió la relajación resistente a L-NMMA e indometacina sugiriendo que el EDHF inducido por la acetilcolina activa la bomba Na^+-K^+ y los canales rectificadores de K^+ . Si la concentración de K^+ en el medio extracelular

aumenta ligeramente, los canales rectificadores de K^+ se activan sacando K^+ de la célula muscular y por tanto contribuyendo a la hiperpolarización de la célula muscular lisa.

La extrapolación de estos hallazgos a la situación *in vivo* debe hacerse con cautela. La función endotelial también está modulada por el estrés de flujo,¹⁷⁰ un factor que no puede considerarse en nuestros estudios *in vitro*.

En conclusión, nuestros resultados indican que en venas de pacientes sometidos a hemodiálisis durante un período prolongado de tiempo, la liberación de NO inducida por acetilcolina es abolida. La relajación inducida por acetilcolina en estas venas está mediada principalmente por el factor hiperpolarizante derivado del endotelio. En la relajación inducida por EDHF participarían los canales de K^+ activados por Ca^{2+} de alta conductancia, la bomba Na^+-K^+ , y los canales rectificadores de K^+ .

Finalmente este estudio ha demostrado que el EDHF puede representar un novedoso mecanismo adaptativo que suple la carencia de relajación mediada por el NO en la insuficiencia renal crónica.

RESPUESTA CONTRÁCTIL

El KCl a grandes concentraciones produce despolarización de la membrana seguida de contracción del músculo liso vascular, constituyendo una prueba de la capacidad contráctil. La respuesta contráctil al KCl (60 mM) en muestras procedentes de pacientes con insuficiencia renal crónica es menor que la del grupo control indicando que esta enfermedad disminuye la capacidad contráctil del músculo liso en este territorio venoso. Estos efectos podrían ser el resultado de los cambios estructurales en la pared vascular descritos en esta patología.^{141,142}

La menor capacidad contráctil al KCl y a la noradrenalina en las venas de los pacientes con insuficiencia renal crónica se podría relacionar con alteraciones en el calcio. En este sentido, la respuesta al CaCl₂ en un medio sin calcio (con KCl 100 mM o noradrenalina 10⁻⁶ M), es menor en muestras procedentes de pacientes urémicos. Estos resultados indican que la uremia puede alterar los mecanismos de incorporación de Ca²⁺ voltaje o receptor dependiente al músculo liso de la vena cefálica. Estos efectos no revierten con la hemodiálisis.

La noradrenalina, además de permitir la entrada de calcio extracelular, es capaz de movilizar los depósitos de calcio intracelular. Por eso en un medio sin calcio una concentración

adecuada de noradrenalina, en este caso 10^{-6} M, es capaz de producir una pequeña contracción que será debida a la salida de calcio de los depósitos intracelulares. Nuestros resultados han demostrado que esta contracción es menor en las venas procedentes de pacientes urémicos. Esto puede indicar una disminución de la capacidad de almacenamiento de calcio en la uremia o una disminución en la liberación de calcio intracelular en respuesta a la noradrenalina.

Se sabe que en la insuficiencia renal crónica hay una disminución de la actividad de la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ en células del músculo liso y en otros tejidos.¹⁷¹ La inhibición de la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ permite aumentar el sodio en el interior celular, lo que haría disminuir la entrada de calcio.¹⁷²

Todos estos factores pueden contribuir a la disminución de la respuesta contráctil en venas de pacientes urémicos.

Respuesta a la noradrenalina

La noradrenalina produce una contracción dependiente de la concentración. Esta respuesta es menor en muestras de pacientes con insuficiencia renal crónica. Sin embargo, otros autores han demostrado que en arterias cutáneas de resistencia la respuesta a la noradrenalina es mayor en pacientes urémicos. Estas diferencias pueden ser debidas al tipo de vaso utilizado (arteria frente a vena) o a diferencias regionales.¹⁴⁸ En este caso

el incremento de la respuesta a la noradrenalina puede ser secundario a cambios en la estructura de la pared arterial en la insuficiencia renal crónica incluyendo el aumento de la rigidez que reduciría la distensibilidad de las arterias.¹⁴⁸

Se ha descrito un aumento de los niveles de noradrenalina en plasma de pacientes con insuficiencia renal crónica, que podría disminuir la expresión de los receptores adrenérgicos y explicar una menor respuesta a la noradrenalina en los segmentos vasculares de pacientes urémicos.¹⁷³

Estudios previos han demostrado que la prostaciclina es la prostaglandina más abundante en el sistema venoso.^{174,175} En nuestro estudio, la inhibición con indometacina incrementa la respuesta contráctil a la noradrenalina en el grupo control, confirmando que la estimulación de los adrenoceptores induce la liberación de prostanoïdes vasodilatadores, como se ha descrito en venas de la mano.¹⁷⁵ Sin embargo, esto no ocurre en muestras de pacientes urémicos por lo que cabe deducir que la uremia inhibe la producción de prostaglandinas relajantes o bien aumenta la producción de prostaglandinas contráctiles en respuesta a la noradrenalina. El enzima clave para la formación de prostaglandinas es la ciclooxigenasa en sus dos isoformas COX-1 y COX-2.¹⁷⁶ Se ha relacionado la COX-1 con la síntesis de prostaglandinas contráctiles³⁴ y la COX-2 con la de prostaglandinas relajantes.³⁵ Nuestros resultados indican que no

hay diferencias en la expresión génica de la COX-1, lo cual estaría en consonancia con que no se produzca un aumento de prostaglandinas contráctiles. Sin embargo, la hemodiálisis aumenta la expresión génica de la COX-2 lo que podría traducirse en un aumento en la producción de prostaglandinas relajantes. A nivel de reactividad vascular, no observamos indicios de una mayor participación de prostaglandinas relajantes en pacientes urémicos sometidos a hemodiálisis, en respuesta a la noradrenalina. En pacientes sometidos a hemodiálisis se ha observado una microinflamación crónica¹⁷⁷ que podría ser la responsable de la inducción de la expresión génica de la COX-2. Las variaciones en la expresión génica no implican necesariamente un cambio a nivel funcional, como nos ocurre en este caso, puesto que podría tratarse de un fallo postranscripcional.

En los segmentos venosos del grupo control, el L-NMMA incrementa la respuesta contráctil a la noradrenalina, indicando que la noradrenalina induce la liberación de NO endotelial. La noradrenalina estimula los α -adrenoceptores de la célula endotelial¹⁷⁸ o activa mecanismos indirectos que consisten en una cascada de señales que empiezan en el músculo liso y que terminan en la célula endotelial.¹⁷⁹ Por lo tanto, si suprimimos el efecto relajante del NO, la noradrenalina produce una contracción mayor.^{128,178} Esto es lo que ocurre en el grupo control. Sin

embargo, no sucede lo mismo en venas procedentes de pacientes urémicos, donde la incubación con L-NMMA no modifica la curva concentración-respuesta a la noradrenalina. Este hecho podría ser debido a que la uremia produce una disfunción endotelial en la cual está afectada la vía de síntesis de NO. Las células endoteliales producen metilargininas en cantidades suficientes para inhibir la producción de NO.¹⁸⁰ El acúmulo de estas toxinas urémicas en los pacientes con insuficiencia renal crónica⁵⁵ puede ser la causa de la inhibición de la NOS y por consiguiente de la disminución en la síntesis de NO.

Hay otros factores que pueden contribuir a la disminución de la producción o liberación de NO. La hemodiálisis “per se” produce una disminución de la bioactividad del NO por incremento de los peróxidos lipídicos y una disminución de agentes antioxidantes.¹⁵⁶ El estrés oxidativo presente en los pacientes hemodializados¹⁵⁷ puede contribuir a la disminución de la bioactividad del NO.¹⁵⁸

El calcio unido a la calmodulina interviene en la activación de la NOS.^{181,182} La disminución en la entrada de calcio observada en las venas de pacientes urémicos también podría afectar a la correcta síntesis y liberación de NO por las células endoteliales.

La inhibición conjunta de la COX y la NOS no produjo mayor respuesta a la noradrenalina. Por lo tanto nuestros resultados indican que en la vena cefálica humana no se produce un sinergismo entre la producción de prostaciclina y NO inducida por noradrenalina, contrariamente a lo descrito por otros autores.¹⁸³

La respuesta relajante a la acetilcolina en la vena cefálica está mediada por NO y por EDHF, en cuyo mecanismo intervienen los canales de potasio activados por calcio de alta conductancia y es posible que sean estos mismos canales los que participen modulando la respuesta contráctil a la noradrenalina. Nuestros resultados muestran que tanto la iberiotoxina como la charibdotoxina potencian la contracción a la noradrenalina en venas procedentes del grupo control y dializados, sugiriendo la activación de canales de K^+ activados por Ca^{2+} de alta conductancia. Sin embargo ni la apamina ni la glibenclamida tienen efecto sobre la respuesta contráctil a la noradrenalina, lo que descarta la participación de canales de K^+ activados por Ca^{2+} de baja conductancia y los canales de K^+ sensibles a ATP, al igual que ocurría en la relajación inducida por la acetilcolina.

En muestras de pacientes urémicos no dializados el bloqueo con iberiotoxina o charibdotoxina no modifica la respuesta contráctil inducida por la noradrenalina, indicando una disminución en la participación de los canales de K^+ activados

por Ca^{2+} de alta conductancia. Estudios previos en carótida de rata, también han demostrado que la uremia produce una disminución de la participación de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} .¹⁸⁴

La hemodiálisis a la que son sometidos estos pacientes recupera la participación de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} de alta conductancia en respuesta a la noradrenalina.

Con nuestros resultados podemos decir que en el grupo control y en el de pacientes dializados, los canales de K^+ activados por Ca^{2+} de alta conductancia participan en la respuesta a la noradrenalina. Precisamente son los dos grupos en los que hemos observado mayor respuesta a la acetilcolina, indicando que tienen mejor función endotelial dependiente de EDHF.

En la insuficiencia renal crónica se acumula potasio en plasma¹⁸⁵ y la hemodiálisis es capaz de eliminar este exceso. Los urémicos no dializados tendrían un incremento de la concentración de potasio extracelular dificultando la función de los canales de potasio en respuesta a la noradrenalina y a la acetilcolina. La hemodiálisis normaliza la hiperkalemia¹⁸⁶ y recupera la funcionalidad de estos canales que participan en el mecanismo de acción del EDHF. El aumento de expresión del gen que codifica los canales de K^+ activados por Ca^{2+} de alta conductancia en venas de pacientes urémicos no dializados,

podría ser debido a un intento por compensar la baja funcionalidad de estos canales.

No hay que olvidar que la participación de estos canales de K^+ no excluye un posible papel de otro tipo de canales de K^+ que bajo nuestras condiciones experimentales pueden permanecer inactivados. La naturaleza de estos canales puede depender tanto del lecho vascular, como de la patología.⁹⁷

Respuesta al estímulo eléctrico

En la literatura existen pocos datos sobre la caracterización del estímulo neurógeno de la vena cefálica humana. Hemos determinado que la vena cefálica contrae en respuesta al estímulo eléctrico de forma frecuencia-dependiente. Esta respuesta es debida a la liberación de noradrenalina de las terminaciones nerviosas perivasculares que ejerce su acción sobre receptores α_1 adrenérgicos localizados en el músculo liso vascular. La respuesta al estímulo eléctrico está disminuida en muestras procedentes de pacientes urémicos. Puesto que la entrada de calcio extracelular está disminuida en la insuficiencia renal crónica, ésta podría ser una de las causas de la disminución de la respuesta contráctil al estímulo eléctrico. Además, la uremia produce lesiones en las terminaciones nerviosas vasculares,¹⁸⁷⁻¹⁸⁹ que no mejoran con la hemodiálisis.^{190,191} En este sentido, nuestros resultados demuestran que la hemodiálisis disminuye la

capacidad del vaso para contraer en respuesta al estímulo eléctrico.

Al igual que ocurría al administrar noradrenalina, la contracción inducida por el estímulo eléctrico en el grupo control se potencia con la inhibición de la COX o de la NOS, de lo que podríamos deducir que el estímulo neurógeno en venas de individuos sanos es capaz de liberar noradrenalina que a su vez induciría la liberación de prostaciclina y NO, que atenuarían la contracción del músculo liso vascular. Este efecto potenciador de la indometacina o el L-NMMA no se observa en las venas de los pacientes urémicos, indicando una menor participación de prostaglandinas relajantes y NO en respuesta a la noradrenalina liberada por el estímulo eléctrico.

En los tres grupos de estudio, la inhibición conjunta de la COX y la NOS produjo una mayor contracción en respuesta al estímulo eléctrico que la inhibición de cada una de ellas por separado indicando un posible sinergismo entre ambas vías, que sólo se daría a nivel presináptico, puesto que no lo observamos en las curvas concentración-respuesta a la noradrenalina.

Se ha demostrado que las neuronas producen prostaciclina y que su síntesis aumenta con la adición de ácido araquidónico y la estimulación eléctrica.¹⁹² También se ha estudiado

ampliamente la liberación de NO por las terminaciones nitrérgicas perivasculares.^{143,193-195}

Se ha descrito que la prostaglandina E₁ y el VIP modulan receptores presinápticos en nervios adrenérgicos y en consecuencia inhiben la liberación de noradrenalina.^{196,197} De la misma forma la prostaciclina podría estar actuando sobre los receptores presinápticos, disminuyendo la liberación de noradrenalina. También el NO puede actuar sobre la terminación adrenérgica disminuyendo la liberación de noradrenalina.¹⁹³

Se ha demostrado que las sustancias que activan la guanilato ciclasa y aumentan los niveles de GMPc disminuyen el flujo de noradrenalina en respuesta al estímulo neurógeno.¹⁹⁸ Sin embargo, no hay datos concluyentes que demuestren que el AMPc ejerza el mismo efecto sobre la liberación de noradrenalina de la terminación adrenérgica. En vena safena humana se ha observado una mayor contracción al estímulo eléctrico al bloquear la guanilato ciclasa.¹⁹⁹ En nuestro trabajo inhibimos la producción de NO con L-NMMA. Por lo tanto los niveles de GMPc disminuirían, no ejercería el efecto inhibitorio sobre la terminación adrenérgica y se liberaría más noradrenalina en respuesta al estímulo eléctrico. Además se ha descrito un sinergismo a nivel de los segundos mensajeros AMPc y GMPc.²⁰⁰ En nuestros resultados este sinergismo se da únicamente a nivel presináptico. En este sentido un estudio en arteria mesentérica de

ratas hipertensas pone de manifiesto que la incubación con un inhibidor de la prostaciclina sintasa disminuye la liberación de NO inducida por la estimulación neurógena, indicando que la prostaciclina estimula la liberación de NO neuronal.¹⁹⁵

Este sinergismo, como ya habíamos comentado sólo se observa a nivel presináptico y en los tres grupos de estudio. Al inhibir la COX se impide la producción de la prostaciclina tanto endotelial como neuronal. Debido a la disminución de la participación de prostaciclina endotelial en la uremia, la cantidad de prostaciclina que participaría en respuesta al estímulo eléctrico sería insuficiente para observar potenciación de la respuesta contráctil al incubar con indometacina en las venas de pacientes urémicos. Lo mismo sucedería al inhibir la NOS; se impediría la participación de NO tanto neuronal como endotelial pero este último está marcadamente disminuido en las venas de pacientes urémicos, por lo tanto la cantidad de NO que participa en respuesta al estímulo eléctrico es muy pequeña y por eso no se observa potenciación al administrar sólo L-NMMA.

La inhibición únicamente de una de las vías, bien de la COX o bien de la NOS, no resulta suficiente para potenciar la respuesta contráctil al estímulo eléctrico. Sin embargo, al inhibir conjuntamente ambas vías sí que observamos dicha potenciación, indicando un sinergismo exclusivamente presináptico que no se

altera ni con la insuficiencia renal crónica ni con el tratamiento prolongado con hemodiálisis.

El bloqueo de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} de alta conductancia potencia la contracción inducida por el estímulo eléctrico en los tres grupos de estudio, indicando la participación de dichos canales.

En el grupo de pacientes urémicos no dializados, la incubación con los bloqueantes de estos canales no potenció la contracción inducida por la noradrenalina exógena, lo que indica que la noradrenalina no es capaz de inducir la liberación del EDHF a través de estos canales. Por lo tanto el efecto potenciador sólo se da a nivel presináptico. En las venas de pacientes urémicos no dializados la relajación mediada por EDHF en respuesta a la acetilcolina está disminuida comparada con el grupo control y el de pacientes hemodializados. Por consiguiente en los pacientes urémicos no dializados podríamos concluir que los canales de K^+ activados por Ca^{2+} que participan en la respuesta contráctil al estímulo eléctrico se localizan a nivel presináptico. En apoyo a esta hipótesis se ha descrito la existencia de canales de K^+ activados por Ca^{2+} en las neuronas.²⁰¹

Así pues, en la vena cefálica de los tres grupos de estudio la respuesta contráctil al estímulo eléctrico es atenuada por la salida de K^+ a través de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} de

alta conductancia localizados a nivel presináptico. En el grupo control y en el de pacientes hemodializados, también participarían de canales de K^+ activados por Ca^{2+} de alta conductancia postsinápticos.

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Como ya se ha comentado, el estudio de la expresión génica puede mostrar alteraciones debidas a la enfermedad, que no lleguen a hacerse patentes cuando realizamos un estudio funcional.

La DDAH-1 se infraexpresa en la vena cefálica de enfermos urémicos. Esta podría ser la causa del incremento de toxinas urémicas en los pacientes con insuficiencia renal crónica.⁵⁵

La COX-1 no se altera con la insuficiencia renal crónica, pero el tratamiento de estos pacientes con hemodiálisis supone un aumento de la isoforma inducible COX-2, que no se traduce en cambios notables en la respuesta funcional. Quizás la sobreexpresión de la COX-2 sea debida al tratamiento con hemodiálisis durante un largo periodo de tiempo. Se ha observado una microinflamación crónica que aumenta la morbilidad cardiovascular en pacientes sometidos a hemodiálisis.¹⁷⁷ En estos pacientes existe un aumento de niveles plasmáticos de

marcadores inflamatorios como la proteína C reactiva o la IL-6.²⁰² La sobreexpresión de la COX-2 puede ser debida a este estado de inflamación crónica que sufren los pacientes hemodializados.

Un estudio reciente en arteria radial de pacientes urémicos pone de manifiesto un aumento de la expresión proteica de la eNOS, que no se traduce en un aumento de la actividad del NO.²⁰³ En nuestros resultados, la expresión génica de la eNOS aumenta en la vena cefálica de pacientes urémicos no dializados, sin embargo la producción de NO no parece estar aumentada debido probablemente a que la eNOS se encuentra inhibida por las toxinas urémicas. La hemodiálisis disminuiría estos inhibidores hasta unos niveles que permitirían restablecer la expresión de la eNOS.

La hiperkalemia y la disfunción endotelial presente en los pacientes urémicos no dializados disminuirían la participación de los canales de K⁺ activados por Ca²⁺ de alta conductancia en la respuesta vascular. Esta disminución en la funcionalidad de los canales de K⁺ podría ser la responsable de la sobreexpresión génica observada en el grupo de urémicos no dializados.

CONCLUSIONES FINALES

1. En las venas de pacientes urémicos, la respuesta a la acetilcolina está disminuida, indicando una disfunción endotelial. La hemodiálisis restablece en parte la relajación dependiente de endotelio pero no mediada por NO, sino por EDHF, que implica la participación de canales de K^+ activados por Ca^{+2} de alta conductancia, rectificadores de potasio y la bomba Na^+-K^+ .
2. En la uremia el músculo liso vascular se muestra hiporreactivo ante estímulos constrictores y dilatadores debido probablemente a una disminución de la entrada de calcio extracelular y a alteraciones metabólicas.
3. En la uremia disminuye la participación de prostaciclina, NO y canales de K^+ activados por Ca^{+2} de alta conductancia en respuesta a la noradrenalina pero sólo la participación de estos últimos se recupera con la hemodiálisis.
4. La uremia disminuye la participación de prostaglandinas y NO en respuesta al estímulo neurógeno, pero no altera la participación de los canales de K^+ activados por Ca^{+2} de alta conductancia. A nivel presináptico existe un sinergismo entre la prostaciclina y el NO o entre sus segundos mensajeros AMPc y GMPc que no se altera por la insuficiencia renal crónica.

5. La expresión génica de la DDAH-1 disminuye en la insuficiencia renal crónica pudiendo ser la causa del acúmulo de ADMA y L-NMMA. La eNOS se sobreexpresa en las venas de los pacientes urémicos no dializados. La insuficiencia renal crónica no afecta a la expresión de la COX-1. Sin embargo la COX-2 se sobreexpresa en los pacientes urémicos sometidos a hemodiálisis, probablemente debido a la microinflamación crónica que padecen. La expresión génica de los canales de K⁺ activados por Ca²⁺ de alta conductancia aumenta en el grupo de venas procedentes de pacientes urémicos no dializados y vuelve a la normalidad con la hemodiálisis.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Lazarus JM, Brenner BM. Chronic Renal Failure. In: Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Casper DL et al., editors. *Harrison's, Principles of internal medicine*. New York: McGraw-Hill; 1998. p. 1513-20.
- (2) Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G. Traditional and emerging cardiovascular risk factors in end-stage renal disease. *Kidney Int Suppl* 2003;S105-S110.
- (3) Levey AS, Eknoyan G. Cardiovascular disease in chronic renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 1999;14:828-33.
- (4) van GC, Stam F, Stehouwer CD. Homocysteine metabolism in renal failure. *Kidney Int Suppl* 2001;78:S234-S237.
- (5) Perna AF, Ingrosso D, Lombardi C, Cesare CM, Acantora F, Satta E, De Santo NG. Homocysteine in uremia. *Am J Kidney Dis* 2003;41:S123-S126.
- (6) Perna AF, Capasso R, Acantora F, Satta E, Lombardi C, Ingrosso D, Violetti E, Romano MM, De Santo NG. Toxic effects of hyperhomocysteinemia in chronic renal failure and in uremia: cardiovascular and metabolic consequences. *Semin Nephrol* 2006;26:20-3.
- (7) Amann K, Tyralla K, Gross ML, Eifert T, Adamczak M, Ritz E. Special characteristics of atherosclerosis in chronic renal failure. *Clin Nephrol* 2003;60 Suppl 1:S13-S21.
- (8) Campean V, Neureiter D, Varga I, Runk F, Reiman A, Garlachs C, Achenbach S, Nonnast-Daniel B, Amann K. Atherosclerosis and vascular calcification in chronic renal failure. *Kidney Blood Press Res* 2005;28:280-9.
- (9) Krasniak A, Drozd M, Pasowicz M, Chmiel G, Michalek M, Szumilak D, Podolec P, Klimeczek P, Konieczynska M, Wicher-Muniak E, Tracz W, N'guyen KT, Souberbielle JC, Drueke TB, Sulowicz W. Factors involved in vascular calcification and atherosclerosis in maintenance haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2006.
- (10) Guerin A, Pannier B, London G. Atherosclerosis versus arterial stiffness in advanced renal failure. *Adv Cardiol* 2007;44:187-98.
- (11) Prinsen BH, de Sain-van der Velden MG, de Koning EJ, Koomans HA, Berger R, Rabelink TJ. Hypertriglyceridemia in patients with chronic renal failure: possible mechanisms. *Kidney Int Suppl* 2003;S121-S124.
- (12) Zanos S, Mitsopoulos E, Sakellariou G. Parathyroid hormone levels, calcium-channel blockers, and the dyslipidemia of nondiabetic hemodialysis patients. *Ren Fail* 2005;27:163-9.
- (13) Vaziri ND. Dyslipidemia of chronic renal failure: the nature, mechanisms, and potential consequences. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;290:F262-F272.

- (14) Fazelzadeh A, Mehdizadeh A, Ostovan MA, Raiss-Jalali GA. Incidence of cardiovascular risk factors and complications before and after kidney transplantation. *Transplant Proc* 2006;38:506-8.
- (15) Sarnak MJ, Levey AS. Cardiovascular disease and chronic renal disease: a new paradigm. *Am J Kidney Dis* 2000;35:S117-S131.
- (16) Fort J. Chronic renal failure: a cardiovascular risk factor. *Kidney Int Suppl* 2005;S25-S29.
- (17) Canavese C, Cesarani F, Stratta C, Maddalena E, Messina M, Segoloni GP. [Vascular calcification after kidney transplantation. Preliminary results]. *Minerva Urol Nefrol* 1999;51:11-5.
- (18) Parfrey PS, Foley RN. The clinical epidemiology of cardiac disease in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:1606-15.
- (19) Christian RC, Fitzpatrick LA. Vascular calcification. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1999;8:443-8.
- (20) London GM, Guerin AP, Pannier B, Marchais SJ, Safar ME. Large artery structure and function in hypertension and end-stage renal disease. *J Hypertens* 1998;16:1931-8.
- (21) Goldberger S, Thompson A, Guha A. Autonomic neuropathy in chronic renal failure. *Clin Res* 1971;19:531-7.
- (22) Campese V, Romoff N, Levitan D, Lane K, Massry S. Mechanisms of autonomic nervous system dysfunction in uremia. *Kidney Int* 1981;20:246-53.
- (23) Henrich W, Katz F, Molinoff P, Schrier R. Competitive effects of hypokalemia and volume depletion on plasma renin activity, aldosterone, and catecholamine concentrations in hemodialysis patients. *Kidney Int* 1977;12:279-84.
- (24) Cucho J, Prinseau J, Selz F, Ruget G, Baglin A. Plasma free, sulfo- and glucuro-conjugated catecholamines in uremic patients. *Kidney Int* 1986;30:566-72.
- (25) Agarwal A, Anand I, Sakhuja V, Chugh K. Effect of dialysis and renal transplantation on autonomic dysfunction in chronic renal failure. *Kidney Int* 1991;40:489-95.
- (26) Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993;329:2002-12.
- (27) Vane JR, Ånggård EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 1990;323:27-36.
- (28) Luscher TF. The endothelium. Target and promoter of hypertension? *Hypertension* 1990;15:482-5.

-
- (29) Best LC, Holland TK, Jones PB, Russell RG. The interrelationship between thromboxane biosynthesis, aggregation and 5-hydroxytryptamine secretion in human platelets in vitro. *Thromb Haemost* 1980;43:38-40.
- (30) Ambler J, Birch J, Maguire ED, Wallis RB. Role of thromboxane A₂. *Adv Exp Med Biol* 1985;192:293-308.
- (31) Burch RM, Axelrod J. Dissociation of bradykinin-induced prostaglandin formation from phosphatidylinositol turnover in Swiss 3T3 fibroblasts: evidence for G protein regulation of phospholipase A₂. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:6374-8.
- (32) Hamberg M, Svensson J, Wakabayashi T, Samuelsson B. Isolation and structure of two prostaglandin endoperoxides that cause platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974;71:345-9.
- (33) Therland KL, Stubbe J, Thiesson HC, Ottosen PD, Walter S, Sorensen GL, Skott O, Jensen BL. Cyclooxygenase-2 is expressed in vasculature of normal and ischemic adult human kidney and is colocalized with vascular prostaglandin E₂ EP₄ receptors. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:1189-98.
- (34) Belton OA, Duffy A, Toomey S, Fitzgerald DJ. Cyclooxygenase isoforms and platelet vessel wall interactions in the apolipoprotein E knockout mouse model of atherosclerosis. *Circulation* 2003;108:3017-23.
- (35) McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini IA, Kapoor S, Lawson JA, FitzGerald GA. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:272-7.
- (36) Wang JL, Cheng HF, Zhang MZ, McKanna JA, Harris RC. Selective increase of cyclooxygenase-2 expression in a model of renal ablation. *Am J Physiol* 1998;275:F613-F622.
- (37) Harris RC, Jr. Cyclooxygenase-2 inhibition and renal physiology. *Am J Cardiol* 2002;89:10D-7D.
- (38) Palmer RMJ, Rees DD, Ashton DS, Moncada S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;153:1251-6.
- (39) Rees DD, Palmer RMJ, Hodson HF, Moncada S. A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation. *Br J Pharmacol* 1989;96:418-24.
- (40) Moncada S, Higgs A, Furchgott R. International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacol Rev* 1997;49:137-42.

- (41) Veelken R, Hilgers KF, Hartner A, Haas A, Bohmer KP, Sterzel RB. Nitric oxide synthase isoforms and glomerular hyperfiltration in early diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:71-9.
- (42) Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-42.
- (43) Etienne P, Pares-Herbute N, Monnier L. Enhanced antiproliferative effect of nitric oxide in cultured smooth muscle cells from diabetic rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996;27:140-6.
- (44) Levillain O, Hus-Citharel A, Morel F, Bankir L. Localization of arginine synthesis along rat nephron. *Am J Physiol* 1990;259:F916-F923.
- (45) Featherston WR, Rogers QR, Freedland RA. Relative importance of kidney and liver in synthesis of arginine by the rat. *Am J Physiol* 1973;224:127-9.
- (46) Mendes Ribeiro AC, Hanssen H, Kiessling K, Roberts NB, Mann GE, Ellory JC. Transport of L-arginine and the nitric oxide inhibitor NG-monomethyl-L-arginine in human erythrocytes in chronic renal failure. *Clin Sci (Lond)* 1997;93:57-64.
- (47) Tizianello A, De FG, Garibotto G, Gurreri G, Robaudo C. Renal metabolism of amino acids and ammonia in subjects with normal renal function and in patients with chronic renal insufficiency. *J Clin Invest* 1980;65:1162-73.
- (48) De Deyn PP, Marescau B, Swartz RD, Hogaerth R, Possemiers I, Lowenthal A. Serum guanidino compound levels and clearances in uremic patients treated with continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Nephron* 1990;54:307-12.
- (49) Rysz J, Guga P, Grycewicz T, Mudyna J, Luciak M. Blood serum and neutrophil L-arginine concentrations and nitric oxide release by neutrophils in chronic uremic patients and healthy persons. *Med Sci Monit* 2003;9:CR311-CR315.
- (50) Waldman S, Murad F. Biochemical mechanisms underlying vascular smooth muscle relaxation: the guanylate cyclase-cyclic GMP system. *J Cardiovasc Pharmacol* 1988;12:S115-S118.
- (51) Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J* 1989;3:2007-18.
- (52) Segarra G, Medina P, Vila JM, Chuan P, Domenech C, Torondel B, Lluch A. Inhibition of nitric oxide activity by arginine analogs in human renal arteries. *Am J Hypertens* 2001;14:1142-8.
- (53) Beasley D, Schwartz J, Brenner BM. Interleukin 1 induces prolonged L-arginine dependent cyclic guanosine monophosphate and nitric production in rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1991;87:602-8.

-
- (54) Noris M, Benigni A, Boccoardo P. Enhanced nitric oxide synthesis in uremia: Implications for platelet dysfunction and dialysis hypotension. *Kidney Int* 1993;44:445-50.
- (55) Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992;339:572-5.
- (56) MacAllister RJ, Whitley GSJ, Vallance P. Effects of guanidino and uremic compounds on nitric oxide pathways. *Kidney Int* 1994;45:737-42.
- (57) Segarra G, Medina P, Ballester R, Lluch P, Aldasoro M, Vila JM, Lluch S. Effects of some guanidino compounds on human cerebral arteries. *Stroke* 1999;30:2206-11.
- (58) Baylis C. Arginine, arginine analogs and nitric oxide production in chronic kidney disease. *Nat Clin Pract Nephrol* 2006;2:209-20.
- (59) Brunini TM, Mendes-Ribeiro AC, Ellory JC, Mann GE. Platelet nitric oxide synthesis in uremia and malnutrition: A role for L-arginine supplementation in vascular protection? *Cardiovasc Res* 2007;73:359-67.
- (60) Aiello S, Noris M, Remuzzi G. Nitric oxide/L-arginine in uremia. *Miner Electrolyte Metab* 1999;25:384-90.
- (61) Sarkar SR, Kaitwatcharachai C, Levin NW. Nitric oxide and hemodialysis. *Semin Dial* 2004;17:224-8.
- (62) Bergamini S, Vandelli L, Bellei E, Rota C, Manfredini P, Tomasi A, Albertazzi A, Iannone A. Relationship of asymmetric dimethylarginine to haemodialysis hypotension. *Nitric Oxide* 2004;11:273-8.
- (63) Boger RH, Zoccali C. ADMA: a novel risk factor that explains excess cardiovascular event rate in patients with end-stage renal disease. *Atheroscler Suppl* 2003;4:23-8.
- (64) Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K. Purification and properties of a new enzyme, NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase, from rat kidney. *J Biol Chem* 1989;264:10205-9.
- (65) MacAllister RJ, Parry H, Kimoto M, Ogawa T, Russell RJ, Hodson H, Whitley GS, Vallance P. Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Br J Pharmacol* 1996;119:1533-40.
- (66) Kimoto M, Whitley GS, Tsuji H, Ogawa T. Detection of NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase in human tissues using a monoclonal antibody. *J Biochem (Tokyo)* 1995;117:237-8.
- (67) Kang ES, Cates TB, Harper DN, Chiang TM, Myers LK, Acchiardo SR, Kimoto M. An enzyme hydrolyzing methylated inhibitors of nitric oxide

- synthase is present in circulating human red blood cells. *Free Radic Res* 2001;35:693-707.
- (68) Leiper JM, Santa MJ, Chubb A, MacAllister RJ, Charles IG, Whitley GS, Vallance P. Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases. *Biochem J* 1999;343 Pt 1:209-14.
- (69) Kimoto M, Tsuji H, Ogawa T, Sasaoka K. Detection of NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase in the nitric oxide-generating systems of rats using monoclonal antibody. *Arch Biochem Biophys* 1993;300:657-62.
- (70) Tojo A, Welch WJ, Bremer V, Kimoto M, Kimura K, Omata M, Ogawa T, Vallance P, Wilcox CS. Colocalization of demethylating enzymes and NOS and functional effects of methylarginines in rat kidney. *Kidney Int* 1997;52:1593-601.
- (71) Bogumil R, Knipp M, Fundel SM, Vasak M. Characterization of dimethylargininase from bovine brain: evidence for a zinc binding site. *Biochemistry* 1998;37:4791-8.
- (72) Tran CT, Fox MF, Vallance P, Leiper JM. Chromosomal localization, gene structure, and expression pattern of DDAH1: comparison with DDAH2 and implications for evolutionary origins. *Genomics* 2000;68:101-5.
- (73) Ueda S, Kato S, Matsuoka H, Kimoto M, Okuda S, Morimatsu M, Imaizumi T. Regulation of cytokine-induced nitric oxide synthesis by asymmetric dimethylarginine: role of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circ Res* 2003;92:226-33.
- (74) Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Ogawa T, Cooke JP. Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 1999;99:3092-5.
- (75) Millatt LJ, Whitley GS, Li D, Leiper JM, Siragy HM, Carey RM, Johns RA. Evidence for dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase I in chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 2003;108:1493-8.
- (76) Okubo K, Hayashi K, Wakino S, Matsuda H, Kubota E, Honda M, Tokuyama H, Yamamoto T, Kajiya F, Saruta T. Role of asymmetrical dimethylarginine in renal microvascular endothelial dysfunction in chronic renal failure with hypertension. *Hypertens Res* 2005;28:181-9.
- (77) Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Nature of endothelium-derived relaxing factor: are there two relaxing mediators? *Circ Res* 1987;61:1161-1167.

-
- (78) Suzuki H. The electrogenic Na-K pump does not contribute to endothelium-dependent hyperpolarization in the rabbit ear artery. *Eur J Pharmacol* 1988;156:295-7.
- (79) Chen G, Suzuki H, Weston AH. Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. *Br J Pharmacol* 1988;95:1165-74.
- (80) Chen G, Suzuki H. Some electrical properties of the endothelium-dependent hyperpolarization recorded from rat arterial smooth muscle cells. *J Physiol* 1989;410:91-106.:91-106.
- (81) Nakashima M, Mombouli JV, Taylor AA, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization caused by bradykinin in human coronary arteries. *J Clin Invest* 1993;92:2867-71.
- (82) Petersson J, Zygmunt PM, Brandt L, Högestätt ED. Substance P-induced relaxation and hyperpolarization in human cerebral arteries. *Br J Pharmacol* 1995;115:889-94.
- (83) Urakami-Harasawa L, Shimokawa H, Nakashima M, Egashira K, Takeshita A. Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. *J Clin Invest* 1997;100:2793-9.
- (84) Wallerstedt SM, Bodelsson M. Endothelium-dependent relaxation by substance P in human isolated omental arteries and veins: relative contribution of prostanoids, nitric oxide and hyperpolarization. *Br J Pharmacol* 1997;120:25-30.
- (85) Nishikawa Y, Stepp DW, Chilian WM. Nitric oxide exerts feedback inhibition on EDHF-induced coronary arteriolar dilation in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000 Aug ;279 (2):H459 -65279:H459-H465.
- (86) Popp R, Brandes RP, Ott G, Busse R, Fleming I. Dynamic modulation of interendothelial gap junctional communication by 11,12-epoxyeicosatrienoic acid. *Circ Res* 2002;90:800-6.
- (87) Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, Harder DR. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ Res* 1996;78:415-23.
- (88) Fisslthaler B, Popp R, Kiss L, Potente M, Harder DR, Fleming I, Busse R. Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature* 1999;401:493-7.
- (89) Matoba T, Shimokawa H, Kubota H, Morikawa K, Fujiki T, Kunihiro I, Mukai Y, Hirakawa T, Takeshita A. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in human mesenteric arteries. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290:909-13.

- (90) Yada T, Shimokawa H, Hiramatsu O, Kajita T, Shigeto F, Goto M, Ogasawara Y, Kajiya F. Hydrogen peroxide, an endogenous endothelium-derived hyperpolarizing factor, plays an important role in coronary autoregulation in vivo. *Circulation* 2003;107:1040-5.
- (91) Randall MD, Alexander SP, Bennet T, Boyd EA, Fry JR, Gardiner SM, Kemp PA, McCulloch AI, Kendall DA. An endogenous cannabinoid as an endothelium-derived vasorelaxant. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;229:114-20.
- (92) Chauhan SD, Nilsson H, Ahluwalia A, Hobbs AJ. Release of C-type natriuretic peptide accounts for the biological activity of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:1426-31.
- (93) Busse R, Edwards G, Feletou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH. EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci* 2002;23:374-80.
- (94) Griffith TM, Chaytor AT, Taylor HJ, Giddings BD, Edwards DH. cAMP facilitates EDHF-type relaxations in conduit arteries by enhancing electrotonic conduction via gap junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:6392-7.
- (95) Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ, Weston AH. K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature* 1998;396:269-72.
- (96) Davis MJ, Hill MA. Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiol Rev* 1999;79:387-423.
- (97) Sobey CG. Potassium channel function in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:28-38.
- (98) Robertson BE, Nelson MT. Aminopyridine inhibition and voltage dependence of K⁺ currents in smooth muscle cells from cerebral arteries. *Am J Physiol* 1994;267:C1589-C1597.
- (99) Knot HJ, Nelson MT. Regulation of membrane potential and diameter by voltage-dependent K⁺ channels in rabbit myogenic cerebral arteries. *Am J Physiol* 1995;269:H348-H355.
- (100) Sobey CG, Faraci FM. Inhibitory effect of 4-aminopyridine on responses of the basilar artery to nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1999;126:1437-43.
- (101) Quan L, Sobey CG. Selective effects of subarachnoid hemorrhage on cerebral vascular responses to 4-aminopyridine in rats. *Stroke* 2000;31:2460-5.
- (102) Aiello EA, Walsh MP, Cole WC. Phosphorylation by protein kinase A enhances delayed rectifier K⁺ current in rabbit vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1995;268:H926-H934.

-
- (103) Zhao YJ, Wang J, Rubin LJ, Yuan XJ. Roles of K⁺ and Cl⁻ channels in cAMP-induced pulmonary vasodilation. *Exp Lung Res* 1998;24:71-83.
- (104) Yuan XJ, Tod ML, Rubin LJ, Blaustein MP. NO hyperpolarizes pulmonary artery smooth muscle cells and decreases the intracellular Ca²⁺ concentration by activating voltage-gated K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:10489-94.
- (105) Zhao YJ, Wang J, Rubin LJ, Yuan XJ. Inhibition of K(V) and K(Ca) channels antagonizes NO-induced relaxation in pulmonary artery. *Am J Physiol* 1997;272:H904-H912.
- (106) Aiello EA, Clement-Chomienne O, Sontag DP, Walsh MP, Cole WC. Protein kinase C inhibits delayed rectifier K⁺ current in rabbit vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1996;271:H109-H119.
- (107) Quayle JM, Nelson MT, Standen NB. ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol Rev* 1997;77:1165-232.
- (108) Jackson WF. Ion channels and vascular tone. *Hypertension* 2000;35:173-8.
- (109) Nelson MT, Cheng H, Rubart M, Santana LF, Bonev AD, Knot HJ, Lederer WJ. Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science* 1995;270:633-7.
- (110) Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 1995;268:C799-C822.
- (111) Faraci FM, Sobey CG. Role of potassium channels in regulation of cerebral vascular tone. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998;18:1047-63.
- (112) Faraci FM, Heistad DD. Regulation of the cerebral circulation: role of endothelium and potassium channels. *Physiol Rev* 1998;78:53-97.
- (113) Nichols CG, Lopatin AN. Inward rectifier potassium channels. *Annu Rev Physiol* 1997;59:171-91.
- (114) Iadecola C. Regulation of the cerebral microcirculation during neural activity: is nitric oxide the missing link? *Trends Neurosci* 1993;16:206-14.
- (115) Paulson OB, Newman EA. Does the release of potassium from astrocyte endfeet regulate cerebral blood flow? *Science* 1987;237:896-8.
- (116) Caesar K, Akgoren N, Mathiesen C, Lauritzen M. Modification of activity-dependent increases in cerebellar blood flow by extracellular potassium in anaesthetized rats. *J Physiol* 1999;520 Pt 1:281-92.
- (117) Edwards FR, Hirst GD, Silverberg GD. Inward rectification in rat cerebral arterioles; involvement of potassium ions in autoregulation. *J Physiol* 1988;404:455-66.

- (118) Quayle JM, McCarron JG, Brayden JE, Nelson MT. Inward rectifier K⁺ currents in smooth muscle cells from rat resistance-sized cerebral arteries. *Am J Physiol* 1993;265:C1363-C1370.
- (119) Knot HJ, Zimmermann PA, Nelson MT. Extracellular K⁽⁺⁾-induced hyperpolarizations and dilatations of rat coronary and cerebral arteries involve inward rectifier K⁽⁺⁾ channels. *J Physiol* 1996;492 (Pt 2):419-30.
- (120) Johnson TD, Marrelli SP, Steenberg ML, Childres WF, Bryan RM, Jr. Inward rectifier potassium channels in the rat middle cerebral artery. *Am J Physiol* 1998;274:R541-R547.
- (121) Zaritsky JJ, Eckman DM, Wellman GC, Nelson MT, Schwarz TL. Targeted disruption of Kir2.1 and Kir2.2 genes reveals the essential role of the inwardly rectifying K⁽⁺⁾ current in K⁽⁺⁾-mediated vasodilation. *Circ Res* 2000;87:160-6.
- (122) Chrissobolis S, Ziogas J, Chu Y, Faraci FM, Sobey CG. Role of inwardly rectifying K⁽⁺⁾ channels in K⁽⁺⁾-induced cerebral vasodilatation in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:H2704-H2712.
- (123) Knot HJ, Standen NB, Nelson MT. Ryanodine receptors regulate arterial diameter and wall [Ca²⁺] in cerebral arteries of rat via Ca²⁺-dependent K⁺ channels. *J Physiol* 1998;508 (Pt 1):211-21.
- (124) Eichler I, Wibawa J, Grgic I, Knorr A, Brakemeier S, Pries AR, Hoyer J, Kohler R. Selective blockade of endothelial Ca²⁺-activated small- and intermediate-conductance K⁺-channels suppresses EDHF-mediated vasodilation. *Br J Pharmacol* 2003;138:594-601.
- (125) Kohler R, Degenhardt C, Kuhn M, Runkel N, Paul M, Hoyer J. Expression and function of endothelial Ca⁽²⁺⁾-activated K⁽⁺⁾ channels in human mesenteric artery: A single-cell reverse transcriptase-polymerase chain reaction and electrophysiological study in situ. *Circ Res* 2000;87:496-503.
- (126) Brescia MJ, Cimino JM, Appel K, Hurwich BJ. Chronic hemodialysis using venipuncture and a surgically created arteriovenous fistula. *N Engl J Med* 1966;275:1089-92.
- (127) Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-6.
- (128) Martínez MC, Vila JM, Aldasoro M, Medina P, Chuan P, Lluch S. The human deferential artery: endothelium-mediated contraction in response to adrenergic stimulation. *Eur J Pharmacol* 1994;261:73-8.
- (129) Martínez MC, Cases E, Vila JM, Aldasoro M, Medina P, Marco V, Lluch S. Influence of endothelial nitric oxide on neurogenic contraction of human pulmonary arteries. *Eur Respir J* 1995;8:1328-32.

-
- (130) Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:7276-80.
- (131) Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402-8.
- (132) Porile JL, Richter M. Preservation of vascular access. *J Am Soc Nephrol* 1993;4:997-1003.
- (133) Hunter DW, Castaneda-Zuniga WR, Coleman CC, Young AT, Salomonowitz E, Mercado S, Amplatz K. Failing arteriovenous dialysis fistulas: evaluation and treatment. *Radiology* 1984;152:631-5.
- (134) Guyton AC, Hall JE. *Textbook of medical physiology, ninth edition*. Philadelphia: Saunders company; 1996.
- (135) Kooman JP, Wijnen JAG, Draaijer P, Van Bortel LMAB, Gladziwa U, Peltemburg HG, Struyker-Boudier HAJ, van Hooff JP, Leunissen KML. Compliance and reactivity of the peripheral venous system in chronic intermittent hemodialysis. *Kidney Int* 1992;41:1041-8.
- (136) Chaignon M, Chen W, Tarazi RC, Nakamoto S, Bravo E. Blood pressure response to hemodialysis. *Hypertension* 1981;3:333-9.
- (137) Kooman JP, Gladziwa U, Bocker G, Van Bortel LMAB, van Hooff JP, Leunissen KML. Role of the venous system in hemodynamics during ultrafiltration and bicarbonate dialysis. *Kidney Int* 1992;42:718-26.
- (138) Haynes WG, Hand MF, Johnstone HA, Padfield PL, Webb DJ. Direct and sympathetically mediated vasoconstriction in essential hypertension: Enhanced responses to endothelin-1. *J Clin Invest* 1994;94:1359-64.
- (139) Webb DJ. The pharmacology of human blood vessels in vivo. *J Vasc Res* 1995;2-15.
- (140) Barboriak JJ, Pinter K, Korn M. Atherosclerosis in aortocoronary grafts. *Lancet* 1974;2:621-4.
- (141) Kooman JP, Daemen MJAP, Wijnen R, Verluyten-Goessens MJ, van Hooff JP, Leunissen KML. Morphological changes of the venous system in uremic patients. A histopathologic study. *Nephron* 1995;69:454-8.
- (142) Feinfeld DA, Batista R, Rabia M, Babich D. Changes in venous histology in chronic hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1999;34:702-5.
- (143) Segarra G, Medina P, Domenech C, Martínez-León JB, Vila JM, Aldasoro M, Lluch S. Neurogenic contraction and relaxation of human penile deep dorsal vein. *Br J Pharmacol* 1998;124:788-94.

- (144) Borbujo J, García-Villalón AL, Valle J, Gómez B, Diéguez G. Postjunctional alpha-1 and alpha-2 adrenoceptors in human skin arteries. An *in vitro* study. *J Pharmacol Exp Ther* 1989;249:284-7.
- (145) Medina P, Acuña A, Martínez-León JB, Otero E, Vila JM, Aldasoro M, Lluch S. Arginine vasopressin enhances sympathetic constriction through the V₁ vasopressin receptor in human saphenous vein. *Circulation* 1998;97:865-70.
- (146) Blackman DJ, Morris-Thurgood JA, Atherton JJ, Ellis GR, Anderson RA, Cockcroft JR, Frenneaux MP. Endothelium-derived nitric oxide contributes to regulation of venous tone in humans. *Circulation* 2000;101:165-70.
- (147) Mittermayer F, Schaller G, Pleiner J, Vyhytil A, Sunder-Plassmann G, Horl WH, Wolzt M. Asymmetrical dimethylarginine plasma concentrations are related to basal nitric oxide release but not endothelium-dependent vasodilation of resistance arteries in peritoneal dialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:1832-8.
- (148) Morris ST, McMurray JJ, Spiers A, Jardine AG. Impaired endothelial function in isolated human uremic resistance arteries. *Kidney Int* 2001;60:1077-82.
- (149) Maggi E, Bellazzi R, Falaschi F, Frattoni A, Perani G, Finardi G, Gazo A, Nai M, Romanini D, Bellomo G. Enhanced LDL oxidation in uremic patients: an additional mechanism for accelerated atherosclerosis? *Kidney Int* 1994;45:876-83.
- (150) Amabile N, Guerin AP, Leroyer A, Mallat Z, Nguyen C, Boddaert J, London GM, Tedgui A, Boulanger CM. Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:3381-8.
- (151) Ortega J, Vila JM, Mauricio MD, Segarra G, Medina P, Martínez-León JB, Lluch S. Nitric oxide mediates abnormal responsiveness of thyroid arteries in methimazole-treated patients. *Eur J Endocrinol* 2005;152:551-6.
- (152) Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327:524-6.
- (153) Matsuguma K, Ueda S, Yamagishi S, Matsumoto Y, Kaneyuki U, Shibata R, Fujimura T, Matsuoka H, Kimoto M, Kato S, Imaizumi T, Okuda S. Molecular mechanism for elevation of asymmetric dimethylarginine and its role for hypertension in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:2176-83.
- (154) Wahbi N, Dalton RN, Turner C, Denton M, Abbs I, Swaminathan R. Dimethylarginines in chronic renal failure. *J Clin Pathol* 2001;54:470-3.
- (155) Cross JM, Donald AE, Kharbada R, Deanfield JE, Woolfson RG, MacAllister RJ. Acute administration of L-arginine does not improve arterial endothelial function in chronic renal failure. *Kidney Int* 2001;60:2318-23.

-
- (156) Miyazaki H, Matsuoka H, Itabe H, Usui M, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T. Hemodialysis impairs endothelial function via oxidative stress. Effects of vitamin E-coated dialyzer. *Circulation* 2000;101:1002-6.
- (157) Annuk M, Zilmer M, Lind L, Linde T, Fellstrom B. Oxidative stress and endothelial function in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:2747-52.
- (158) Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest* 1997;100:2153-7.
- (159) Passauer J, Bussemaker E, Range U, Plug M, Gross P. Evidence In vivo showing increase of baseline nitric oxide generation and impairment of endothelium-dependent vasodilation in normotensive patients on chronic hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:1726-34.
- (160) Taylor SG, Weston AH. Endothelium-derived hyperpolarising factor: a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium. *Trends Pharmacol Sci* 1988;9:272-4.
- (161) Feletou M, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Br J Pharmacol* 1988;93:515-24.
- (162) Coats P, Johnston F, MacDonald J, McMurray JJ, Hillier C. Endothelium-derived hyperpolarizing factor. Identification and mechanisms of action in human subcutaneous resistance arteries. *Circulation* 2001;103:1702-8.
- (163) Katz SD, Krum H. Acetylcholine-mediated vasodilation in the forearm circulation of patients with heart failure: indirect evidence for the role of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Am J Cardiol* 2001;87:1089-92.
- (164) Campbell WB, Harder DR. Prologue: EDHF-what is it? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H2413-H2416.
- (165) Archer SL, Gragasin FS, Wu X, Wang S, McMurtry S, Kim DH, Platonov M, Koshal A, Hashimoto K, Campbell WB, Falck JR, Michelakis ED. Endothelium-derived hyperpolarizing factor in human internal mammary artery is 11,12-epoxyeicosatrienoic acid and causes relaxation by activating smooth muscle BK_{Ca} channels. *Circulation* 2003;107:769-76.
- (166) Brandes RP, Behra A, Lebherz C, Boger RH, Bode-Boger SM, Phivthong-Ngam L, Mugge A. N(G)-nitro-L-arginine- and indomethacin-resistant endothelium-dependent relaxation in the rabbit renal artery: effect of hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1997;135:49-55.
- (167) Joannides R, Richard V, Haefeli WE, Benoist A, Linder L, Luscher TF, Thuillez C. Role of nitric oxide in the regulation of the mechanical properties of peripheral conduit arteries in humans. *Hypertension* 1997;30:1465-70.

- (168) Kilpatrick EV, Cocks TM. Evidence for differential roles of nitric oxide (NO) and hyperpolarization in endothelium-dependent relaxation of pig isolated coronary artery. *Br J Pharmacol* 1994;112:557-65.
- (169) Petersson J, Zygmunt PM, Hogestatt ED. Characterization of the potassium channels involved in EDHF-mediated relaxation in cerebral arteries. *Br J Pharmacol* 1997;120:1344-50.
- (170) Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1986;250:H1145-H1149.
- (171) Kaji D, Kahn T. Na⁺-K⁺ pump in chronic renal failure. *Am J Physiol* 1987;252:785-93.
- (172) Blaustein MP. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca²⁺ stores and cell responsiveness. *Am J Physiol* 1993;264:1367-87.
- (173) Daul A, Wang X, Michel M, Brodde O. Arterial hypotension in chronic hemodialyzed patients. *Kidney Int* 1987;32:728-35.
- (174) Moncada S, Herman AG, Higgs EA, Vane JR. Differential formation of prostacyclin PGX or PGI₂ by layers of the arterial wall. An explanation for the anti-thrombotic properties of the vascular endothelium. *Thromb Res* 1977;11:323-44.
- (175) Callow ID, Campisi P, Lambert ML, Feng Q, Arnold JM. Enhanced in vivo alpha1- and alpha2-adrenoceptor-mediated vasoconstriction with indomethacin in humans. *Am J Physiol* 1998;275:H837-H843.
- (176) Smith WL. The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. *Biochem J* 1989;259:315-24.
- (177) Friedrich B, Alexander D, Janessa A, Haring HU, Lang F, Risler T. Acute effects of hemodialysis on cytokine transcription profiles: Evidence for C-reactive protein-dependency of mediator induction. *Kidney Int* 2006;70:2124-30.
- (178) Angus JA, Cocks TM, Satoh K. The alpha adrenoceptors on endothelial cells. *Fed Proc* 1986;45:2355-9.
- (179) Dora KA, Doyle MP, Duling BR. Elevation of intracellular calcium in smooth muscle causes endothelial cell generation of NO in arterioles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:6529-34.
- (180) Fickling SA, Leone A, Nussey SS, Vallance P. Synthesis of N^G,N^G dimethylarginine by human endothelial cells. *Endothelium* 1993;1:137-40.
- (181) Chen PF, Wu KK. Structural elements contribute to the calcium/calmodulin dependence on enzyme activation in human endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 2003;278:52392-400.

-
- (182) Newman E, Spratt DE, Mosher J, Cheyne B, Montgomery HJ, Wilson DL, Weinberg JB, Smith SM, Salerno JC, Ghosh DK, Guillemette JG. Differential activation of nitric-oxide synthase isozymes by calmodulin-troponin C chimeras. *J Biol Chem* 2004;279:33547-57.
- (183) Salvemini D, Currie MG, Mollace V. Nitric oxide-mediated cyclooxygenase activation. A key event in the antiplatelet effects of nitrovasodilators. *J Clin Invest* 1996;97:2562-8.
- (184) Kohler R, Eichler I, Schonfelder H, Grgic I, Heinau P, Si H, Hoyer J. Impaired EDHF-mediated vasodilation and function of endothelial Ca-activated K channels in uremic rats. *Kidney Int* 2005;67:2280-7.
- (185) Garcia NH, Baigorria ST, Juncos LI. Hyperkalemia, renal failure, and converting-enzyme inhibition: an overrated connection. *Hypertension* 2001;38:639-44.
- (186) Cheng CJ, Chiu JS, Huang WH, Lin SH. Acute hyperkalemic paralysis in a uremic patient. *J Nephrol* 2005;18:630-3.
- (187) Savazzi GM. Pathogenesis of cerebral atrophy in uraemia. State of the art. *Nephron* 1988;49:94-103.
- (188) Fraser CL, Arieff AI. Nervous system complications in uremia. *Ann Intern Med* 1988;109:143-53.
- (189) Laaksonen S, Voipio-Pulkki L, Erkinjuntti M, Asola M, Falck B. Does dialysis therapy improve autonomic and peripheral nervous system abnormalities in chronic uraemia? *J Intern Med* 2000;248:21-6.
- (190) Tzamaloukas AH, Agaba EI. Neurological manifestations of uraemia and chronic dialysis. *Niger J Med* 2004;13:98-105.
- (191) Heidbreder E, Schafferhans K, Heidland A. Disturbances of peripheral and autonomic nervous system in chronic renal failure: effects of hemodialysis and transplantation. *Clin Nephrol* 1985;23:222-8.
- (192) Snitsarev V, Whiteis CA, Chapleau MW, Abboud FM. Neuronal prostacyclin is an autocrine regulator of arterial baroreceptor activity. *Hypertension* 2005;46:540-6.
- (193) Hatanaka Y, Hobara N, Honghua J, Akiyama S, Nawa H, Kobayashi Y, Takayama F, Gomita Y, Kawasaki H. Neuronal nitric-oxide synthase inhibition facilitates adrenergic neurotransmission in rat mesenteric resistance arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;316:490-7.
- (194) Vials AJ, Crowe R, Burnstock G. A neuromodulatory role for neuronal nitric oxide in the rabbit renal artery. *Br J Pharmacol* 1997;121:213-20.

- (195) Ferrer M, Salaiques M, Balfagon G. Endogenous prostacyclin increases neuronal nitric oxide release in mesenteric artery from spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 2004;506:151-6.
- (196) Molderings GJ, Gothert M, Van Ahlen H, Porst H. Modulation of noradrenalina release in human corpus cavernosum by presynaptic prostaglandin receptors. *Int J Impotence* 1992;4:19-26.
- (197) Bratveit M, Helle KB. Inhibition by VIP and atriopeptin II on the field stimulation evoked release of [3H]noradrenaline in the rat portal vein. *Regul Pept* 1991;33:331-7.
- (198) Greenberg SS, Diecke FP, Cantor E, Peevy K, Tanaka TP. Inhibition of sympathetic neurotransmitter release by modulators of cyclic GMP in canine vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 1990;187:409-23.
- (199) Fabi F, Argiolas L, Chiavarelli M, Del BP. Nitric oxide-dependent and -independent modulation of sympathetic vasoconstriction in the human saphenous vein. *Eur J Pharmacol* 1996;309:41-50.
- (200) de WC, von BP, Pohl U. Synergistic action of vasodilators that increase cGMP and cAMP in the hamster cremaster microcirculation. *Cardiovasc Res* 1994;28:1513-8.
- (201) Ocana M, Cendan CM, Cobos EJ, Entrena JM, Baeyens JM. Potassium channels and pain: present realities and future opportunities. *Eur J Pharmacol* 2004;500:203-19.
- (202) Jofre R, Rodriguez-Benitez P, Lopez-Gomez JM, Perez-Garcia R. Inflammatory syndrome in patients on hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:S274-S280.
- (203) Gomez-Fernandez P, Perez-Requena J, Sanchez-Margalet V, Esteban J, Murillo-Carretero M, maraz-Jimenez M. [Vascular damage in chronic renal failure. The increase of vascular nitrotyrosine and cytochines accumulation is accompanied by an increase of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression]. *Nefrologia* 2005;25:155-62.