

## Tesis de Posgrado

# Estudios de alteraciones tóxico- metabólicas del síndrome urémico

Nesse, Alcira Beatriz

1982

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias  
Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Nesse, Alcira Beatriz. (1982). Estudios de alteraciones tóxico-metabólicas del síndrome urémico. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1751\\_Nesse.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1751_Nesse.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Nesse, Alcira Beatriz. "Estudios de alteraciones tóxico-metabólicas del síndrome urémico". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1982.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1751\\_Nesse.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1751_Nesse.pdf)

Tesis 1751

ej. 2

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIOS DE ALTERACIONES TOXICO-METABOLICAS  
DEL SINDROME UREMICO

1751

ALCIRA BEATRIZ NESSE

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS QUIMICAS

- 1982 -

1751  
ej. 2

Agradezco al Dr. Juan Miguel Castagnino, Director de Tesis y Consejero de Estudios, el haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo, como así también su comprensión y permanente estímulo para el logro del mismo.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Elvira E. Arrizurieta por sus enseñanzas, por su valioso aporte en la selección y recolección del material biológico, por muchas horas de fructíferas discusiones, por su constante crítica y apoyo y por su amistad.

A los Dres. María del Carmen Samaniego y Salomón Muchnik por su orientación y colaboración en los temas inmunológicos y neurológicos.

A la Dra. Ana S. Haedo por su asesoramiento y colaboración en el tratamiento estadístico de los datos.

A las Dras. Lucía C. Kordich y María J. Tomio, a la Lic. Gabriela Monge y a todos mis amigos -compañeros y colaboradores- de la Cátedra de Análisis Biológicos de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, quienes de múltiples formas contribuyeron a facilitarme la tarea.

A todo el personal de los laboratorios de Nefrología Experimental, de Histocompatibilidad y de Neurofisiología del Instituto de Investigaciones Médicas (Facultad de Medicina) por su colaboración y compañerismo.

Agradezco, especialmente, a mi madre y a mi hermana Hilda quienes, con gran comprensión y permanente estímulo, facilitaron la concreción de este trabajo.

Finalmente, mi reconocimiento al CONICET por el apoyo económico otorgado.

## INDICE

|  | <u>Página</u> |
|--|---------------|
| INTRODUCCION   | 1             |
| OBJETIVOS  | 45            |
| MATERIALES Y METODOS   |               |
| 1. Determinación de creatinina                                   | 46            |
| 2. Determinación de urea   | 46            |
| 3. Determinación de inulina                                      | 46            |
| 4. Medición de pH  | 47            |
| 5. Determinación de sodio y potasio                              | 47            |
| 6. Determinación de osmolaridad                                  | 47            |
| 7. Determinación de ácido úrico                                  | 47            |
| 8. Determinación de calcio                                       | 48            |
| 9. Determinación de fosfato inorgánico                           | 48            |
| 10. Determinación de péptidos y proteínas                        | 48            |
| 11. Estudios hematológicos                                       | 49            |
| 12. Determinación de aminoácidos totales                         | 50            |
| 13. Fraccionamiento de aminoácidos y péptidos                    | 50            |
| 14. Hidrólisis de péptidos                                       | 52            |
| 15. Separación de péptidos                                       | 52            |
| 16. Separación de nucleótidos                                    | 54            |
| 17. Ensayos cualitativos para grupos químicos                    | 54            |
| 18. Fraccionamiento por cromatografía líquida de alta<br>presión | 56            |

|  |     |
|--|-----|
| 19. Detección de compuestos fluorescentes  | 57  |
| 20. Método cromatográfico para la separación de fracciones en líquidos biológicos        |     |
| 20.1. Estudios previos para establecer las condiciones experimentales de fraccionamiento | 58  |
| 20.2. Descripción del procedimiento analítico  | 65  |
| 20.3. Estudios de calibración  | 72  |
| 20.4. Muestras empleadas para la determinación de perfiles cromatográficos               | 88  |
| 20.5. Variables tabuladas para el A.F.C.   | 93  |
| 20.6. Toma y procesamiento de las muestras   | 95  |
| 20.7. Procedimiento cromatográfico para la separación de fracciones eritrocíticas        | 96  |
| 21. Técnicas para estudiar la respuesta linfoproliferativa                               | 97  |
| 22. Métodos para estudiar las propiedades neurotóxicas de las sustancias de BMPM         | 106 |
| 23. Métodos estadísticos   |     |
| 24. Drogas   |     |
| RESULTADOS   |     |
| 1. Fraccionamiento y caracterización de sustancias de BMPM en la uremia                  | 123 |
| 2. Estudios de identificación de las sustancias de BMPM                                  | 153 |
| 3. Fraccionamiento y caracterización de sustancias de BMPM en eritrocitos                | 175 |

|  |     |
|--|-----|
| 4. Estudios de toxicidad   | 183 |
| 5. Análisis factorial de correspondencias  | 204 |
| DISCUSION  |     |
| Discusión de la Metodología  | 210 |
| Discusión de los resultados de los perfiles cromato-<br>gráficos y de la caracterización de sustancias | 218 |
| Discusión de los estudios de toxicidad   | 242 |
| BIBLIOGRAFIA   | 252 |

ABREVIATURAS EMPLEADAS EN EL PRESENTE TRABAJO

IRC: insuficiencia renal crónica

IRA: insuficiencia renal aguda

FG: filtración glomerular

PM: peso molecular

PMM: peso molecular medio

BPM: bajo peso molecular

MM: moléculas medias

BMPM: bajo y mediano peso molecular

PTH: hormona paratiroidea

$C_{cr}$ : clearance de creatinina

$C_{ur}$ : clearance de urea

$C_{BMPM}$ : clearance de sustancias de bajo y mediano peso molecular

UAAI: unidades arbitrarias de área integrada

VE: volumen de elución

Abs: absorbancia

EAV: electroforesis por alto voltaje

HPLC: cromatografía líquida por alta presión

PHA: fitohemoaglutinina

MLC: cultivo mixto de linfocitos

UV: ultravioleta

i.v.: intravenosa

VCN: velocidad de conducción nerviosa

AFC: análisis factorial de correspondencias



## INTRODUCCION

Las enfermedades renales, como grupo genérico, aparecen como uno de los más serios depredadores de los seres humanos. Aunque, en años recientes, se ha producido un avance importante en el conocimiento y la comprensión de muchos aspectos de las enfermedades renales y sus consecuencias, poco se ha podido hacer para establecer un método de alivio permanente una vez que la enfermedad ha sido confirmada y aún no se han podido fijar pautas claras para posibilitar su cura.

La insuficiencia renal crónica (IRC) tiene numerosas etiologías, algunas de las cuales provocan síntomas sistémicos o renales evidente. Sin embargo, en la mayoría de los casos, la pérdida difusa de la función renal se desarrolla como un proceso silencioso hasta estados moderadamente avanzados, a tal punto que el mismo paciente no percibe que se está operando un proceso grave e irreversible. Este estadio silencioso de la IRC puede reconocerse en exámenes físicos o de laboratorio rutinarios, aunque muchas veces pequeñas modificaciones en los niveles sanguíneos de nitrógeno ureico (BUN) y de creatinina, leves alteraciones en el sedimento urinario o proteinuria y anemia ligeras pueden pasar desapercibidos. Los primeros síntomas orgánicos de la IRC generalmente apa

recen tarde en el curso de la enfermedad y también son vagos e inespecíficos. A medida que progresa el estado urémico se exacerbaban los síntomas y se generan trastornos que transforman a la alteración, primitivamente renal, en un síndrome con amplia repercusión general con manifestaciones tales como hiperparatiroidismo secundario, anemia, polineuropatía periférica, osteodistrofia, alteraciones en los sistemas inmunológico, de coagulación, y en los metabolismos de hidratos de carbono, de lípidos, de proteínas, de aminoácidos, mineral e hídrico, signos que configuran las características del síndrome urémico.

La expectativa de vida de los pacientes con IRC terminal, cambió radicalmente cuando se incorporaron a la terapéutica dialítica las cánulas permanentes (Quinton et al., 1960). Este hecho permitió acceder a la hemodiálisis crónica con la cual se amplió el terreno de la nefrología clínica como con ninguna otra innovación terapéutica. Este procedimiento, no sólo constituye un medio apropiado para el mantenimiento de la vida cuando desaparece la función renal sino que permitió, además, la introducción de otra importante modalidad terapéutica, el trasplante renal.

El empleo de la hemodiálisis en el tratamiento de la enfermedad renal ha sido, casi siempre, empírico. La efectividad de la técnica empleada se determina por el bienestar que presenta el paciente, ya que todavía no se ha podido identificar ninguna toxina

urémica con significado clínico. Teniendo en cuenta las funciones fisiológicas extremadamente complejas que cumple el riñón, resulta sorprendente el éxito que ha tenido esta técnica terapéutica ya que el proceso de diálisis puede reemplazar algunas funciones excretoras del riñón pero no puede esperarse que cumpla con las funciones de síntesis, catabolismo y regulación homeostática que realiza dicho órgano (Henderson et al., 1979).

La ausencia, hasta el presente, de una modalidad terapéutica con bases fisiológicas para resolver la complejidad del problema planteado en la IRC hace resaltar la importancia de la búsqueda de la(s) causa(s) que la generan.

Sin embargo, debe destacarse, que con la incorporación de las diálisis crónicas y el trasplante renal se ha acelerado, en los últimos diez a quince años, la investigación relacionada con la IRC, avanzándose en la comprensión de algunas alteraciones y síntomas de este complejo síndrome.

Se cree que los numerosos síntomas, signos físicos, hallazgos de laboratorio y perturbaciones bioquímicas y fisiológicas de la uremia no son producidas por uno sino por múltiples mecanismos, algunos de los cuales parecen haber sido elucidados. Varias manifestaciones pueden ser atribuidas a causas conocidas; por ejemplo, la hipertensión y posiblemente, los desórdenes lipídicos contribuirían al desarrollo acelerado de aterosclerosis, que con

duce a la producción de oclusiones coronarias y enfermedad vascular periférica. Otros hallazgos, como edema, hiponatremia, arritmias derivadas de la hiperkalemia e hiperventilación como respuesta a la acidosis serían el resultado de la incapacidad del riñón enfermo para mantener un balance hidroelectrolítico y ácido-base adecuado (Depner et al., 1979).

Son comunes, especialmente en la uremia avanzada, tanto la deficiencia como el exceso, es decir, el desbalance de nutrientes debido a desórdenes metabólicos y a una alimentación deficiente. Los hallazgos más frecuentes incluyen una ingesta calórica disminuída, pérdida de proteínas tisulares y de grasas de reserva, intolerancia a la glucosa, hipertrigliceridemia, alteración en el metabolismo de la vitamina D e inadecuada absorción de calcio, entre otros (Feldman et al., 1975).

A medida que progresa la insuficiencia renal disminuye la masa renal funcionante y los nefrones sobrevivientes deben sufrir adaptaciones para cumplir con la función renal e impedir, así, la aparición de desórdenes sistémicos severos que se producirían en ausencia de tal compensación. Si el elemento de control del sistema es una hormona, la concentración de la misma aumentará en la sangre al evolucionar la enfermedad renal. Si la hormona es capaz de influir en procesos de transporte o sobre otras funciones de órganos extrarrenales -además de su acción sobre el riñón- ello

podría producir efectos adversos de grandes dimensiones.

Este concepto de control biológico mediado por hormonas transmisoras, indujo a Bricker (1972) a sugerir la posibilidad del "comercio fisiológico" en la uremia. En algunos casos, un mecanismo compensatorio produce efectos beneficiosos sobre un sistema mientras perjudica a otros; es decir, que el organismo debería "pagar un precio" por las adaptaciones considerables que sufre la función renal para regular la concentración de solutos claves para el organismo. Si la ingesta del soluto particular no se restringe a medida que disminuye el número de unidades excretoras, la adaptación para evitar su acumulación se produciría a expensas de la aparición de alguna anomalía característica del síndrome urémico. Se ha propuesto que, a medida que disminuye la capacidad funcional de los nefrones, se produciría un aumento en la concentración del fosfato sérico por fallas en la excreción; esto conduciría a un aumento en la secreción de hormona paratiroidea (PTH). Esta hormona estimularía la adaptación de los nefrones residuales sobrevivientes para aumentar la excreción de fosfato, controlando, de esta manera, los niveles séricos del anión. Pero el aumento progresivo de la PTH durante el curso de la enfermedad, conduce al desarrollo de hiperparatiroidismo secundario. El efecto beneficioso para el organismo de la regulación de la concentración de fosfato, "se pagaría", en este caso, con un excesiva re-

sorción ósea debida al aumento de PTH.

Actualmente se reconoce que las funciones del riñón no están limitadas a la excreción de productos de deshecho, electrolitos y agua. Cada vez se le atribuye más importancia como órgano endocrino, que afecta la regulación de la presión sanguínea, la homeostasis cálcica y la eritopoyesis. También se ha establecido que los riñones catabolizan un número importante de hormonas peptídicas. Teniendo en cuenta esto, algunos de los síntomas y signos de la uremia se pueden adjudicar a perturbaciones endocrinas, ya sean de origen renoprivo o secundarias a alteraciones en la homeostasis (Bergström et al., 1978 a.). La producción insuficiente de eritopoyetina parece ser una causa importante de la anemia de la IRC y la síntesis excesiva de renina constituiría la causa de hipertensión severa en muchos pacientes con uremia avanzada. Defectos en el metabolismo de insulina y en la conversión de la vitamina D en su metabolito activo, 1,25-dihidroxi-colecalciferol, son otras perturbaciones de este tipo (Giovannetti et al., 1975).

Numerosas sustancias orgánicas e inorgánicas que son productos de deshecho o son ingeridas en cantidades inadecuadas, las que normalmente son eliminadas vía excreción urinaria, se acumulan en el organismo debido a la disminución del FG por el deterioro funcional durante el transcurso de la IRC. Se ha sugerido que esos compuestos ejercerían una acción tóxica sobre algunos

sistemas del organismo (de transporte celular, enzimáticos, etc.) y son muchos los desórdenes urémicos atribuidos a la acumulación de estas toxinas en los líquidos corporales.

En consecuencia, a la retención de productos tóxicos que no pueden ser eficientemente eliminados por el riñón incapacitado se suman la acumulación de sustancias que son normalmente catabolizadas por el riñón sano y la aparición o incremento de otras, producto de la alteración de la homeostasis o de perturbaciones endocrinas.

La teoría química como causa del síndrome urémico comenzó con Prévost y Dumas (1821) quienes descubrieron que la extirpación de los riñones producía un aumento de la concentración de urea plasmática. Desde ese momento, investigadores de todo el mundo han buscado las bases de las alteraciones urémicas en la presencia de sustancias retenidas en los líquidos del organismo. Hoy, después de 160 años todavía no se han podido explicar todas las manifestaciones tóxicas de la uremia por la simple acumulación de compuestos conocidos..

Se sabe que el síndrome clínico de la uremia, sea agudo o crónico, es una perturbación en parte reversible. Esta evidencia se basa en las observaciones de que los pacientes con insuficiencia renal pueden ser mantenidos asintomáticos mientras dure el

fallo funcional agudo y por varios años, en la IRC, mediante hemodiálisis con riñón artificial (Hegstrom et al., 1961). Estos resultados implican que la diálisis produce la remoción de ciertas sustancias difusibles, las cuales, cuando se encuentran presentes en elevadas concentraciones en los líquidos corporales, producirían los síntomas clínicos de la uremia (Balestri et al., 1970). También se sabe que el suministro de dietas pobres en proteínas provoca la disminución de algunos síntomas urémicos, especialmente de aquéllos del tracto gastrointestinal y se asocia con una disminución de la concentración de urea sanguínea. De esta observación se puede deducir que por lo menos algunas de las toxinas urémicas podrían ser producto del catabolismo proteico.

La flora bacteriana del intestino también parece estar involucrada en la patogénesis de la toxicidad urémica. Se ha visto que ratas libres de gérmenes a las que se les ha inducido uremia aguda experimental, sobreviven más que ratas con la misma enfermedad y su flora intestinal intacta. Es interesante destacar que varios metabolitos de los que se encuentran retenidos en el plasma urémico, tales como fenoles, aminas alifáticas y aromáticas, poliaminas, indoles y derivados, son producto del metabolismo bacteriano en el tracto intestinal (Bergström et al., 1978 a.).

Con el empleo de técnicas analíticas más sofisticadas, se encuentra cada vez un mayor número de sustancias cuyos niveles



están incrementados en el plasma urémico (Schreiner et al., 1961; Bergström et al., 1969, 1978 b) y, la mayoría de ellas, ha sido postulada en algún momento como la "toxina urémica". Una lista bastante completa de "candidatos" a toxinas se presenta en la Tabla I (Bergström et al., 1978 b; Schreiner et al., 1969).

El éxito de la diálisis en aliviar los síntomas urémicos mostró que, por lo menos, algunos de los productos tóxicos acumulados en la uremia deberían tener pesos moleculares (PM) por debajo de 5 000 g/mol, ya que las membranas convencionales empleadas son virtualmente impermeables a moléculas de tamaño mayor (Bergström et al., 1976).

El control homeostático del agua y de los iones inorgánicos y el balance ácido-base en el organismo se lleva a cabo, principalmente, a través de los riñones. Cuando la función renal se deteriora ese control no puede ejercerse eficazmente y se producen desequilibrios que pueden generar algunos de los síntomas urémicos tales como edema, convulsiones, insuficiencia cardíaca o perturbaciones neuromusculares (Schreiner et al., 1961; Randall et al. 1964; Arieff et al., 1976). Sin embargo, no se les puede atribuir el rol de verdaderas toxinas urémicas ya que muchos de los síntomas de la IRC ocurren en ausencia de severas alteraciones en los metabolismos hídrico y electrolítico.

Es muy probable, entonces, que otras sustancias acumuladas

Tabla I.- Sustancias postuladas como toxinas urémicas (\*)

| Urea                       | Hormonas         | Aminoácidos               |
|----------------------------|------------------|---------------------------|
| cianato, amonio, carbonato | PTH              | Polipéptidos              |
| Creatinina                 | natriurética (?) | Aminas alifáticas         |
| creatina                   | de crecimiento   | dimetilamina              |
| ácido guanidinosuccínico   | prolactina       | trimetilamina             |
| ácido guanidinoacético     | renina           | Aminas aromáticas         |
| ácido guanidinopropiónico  | glucagon         | Poliaminas                |
| ácido guanidinobutírico    | insulina         | Indoles                   |
| metilguanidina             | gastrina         | Indicán                   |
| n-acetilarginina           | calciotionina    | Carnitina                 |
| Acido úrico                | lisozima         | Mioinositol               |
| Acido hipúrico             | ribonucleasa     | Manitol                   |
| Fenoles y sus conjugados   | Agua             | Acido oxálico             |
| Acidos orgánicos           | Acido/base       | Piridina y derivados      |
| Acetofina                  | Minerales        | 3',5'-AMP cíclico         |
| 2,3-butilenglicol          | Fosfato          | $\beta_2$ -microglobulina |
| $\beta$ -hidroxibutirato   | Ca, Mg           | $\beta_2$ -glucoprotefnas |
| Acido glucurónico          | As               | "moléculas medias"        |

(\*) Bergström et al., 1978 b ; Schreiner et al., 1979.

sean tóxicas y afecten el transporte transmembrana de solutos y el metabolismo intermedio (por acción sobre sistemas enzimáticos).

Todas las sustancias presentadas en la Tabla I se han encontrado en mayor concentración en los líquidos corporales de los pacientes urémicos en comparación con la de sujetos controles, aunque, en algunos casos, es difícil evaluar la validez de esa aseveración debido a la imprecisión e inespecificidad de los métodos empleados para su determinación.

A raíz de la observación de que moléculas pequeñas, del tipo de urea y creatinina, difundían rápidamente a través de las membranas de diálisis, se supuso en un principio, que las toxinas urémicas deberían ser de tamaño similar a las nombradas.

En varios estudios se observaron correlaciones entre la concentración plasmática de alguna sustancia y la aparición de determinado síntoma urémico, adjudicándole una relación causa-efecto. Sin embargo, tales correlaciones, aunque positivas, no prueban la responsabilidad "tóxica" de una sustancia específica, ya que gran número de compuestos, normalmente excretados por los riñones, tienden a retenerse en conjunto a medida que se deteriora la función renal.

En algunos casos -creatinina (Shannon, 1935), derivados del triptofano y ácido úrico (Folin et al., 1924)- no se ha podido demostrar claramente la producción de un efecto tóxico.

Se encontraron numerosas anormalidades en los niveles de aminoácidos -aumento de la concentración de algunos aminoácidos no esenciales y disminución de la de esenciales (Young et al. 1970, 1973, 1975; Mc Gale et al. 1972), disminución en las relaciones fenilalanina/tirosina (Young et al., 1970, 1973; Pickford et al. 1973; Giordano et al., 1968; Kopple et al. 1972; Jones et al., 1975), disminución de histidina que se transforma en aminoácido esencial (Fürst, 1972) pero es poco probable que se deban a una disminuída excreción renal de aminoácidos sino, más bien, a una alteración secundaria debido al inadecuado estado nutricional, a cambios tóxicos en el metabolismo proteico y/o absorción intestinal alterada (Young et al., 1975; Condon et al., 1971; Gulyassy et al., 1970; Swendseid et al., 1973; Smith et al., 1974). Esta perturbación en el balance aminoacídico puede ejercer un efecto perjudicial por aumento de los requerimientos de aminoácidos, utilización anormal del nitrógeno e inhibición del crecimiento celular, pero no existe evidencia de que los aminoácidos, de por sí, ejerzan efectos tóxicos directos (Davies et al., 1975).

Algunas sustancias fueron suministradas a animales de experimentación o agregadas a tejidos, cultivos celulares o sistemas enzimáticos "in vitro" para registrar sus efectos tóxicos. Muchas de esas experiencias -cuando se probaron aminos (Young et al., 1964; Quastel et al., 1933), fenoles (Hicks et al. 1964) y

algunos compuestos guanidínicos (Balestri et al.,1972; Ku et al., 1974; Goubeaud et al.,1976; Leber et al.,1979)- sólo mostraron positividad cuando se emplearon concentraciones de las sustancias en cuestión mucho mayores que las que se encuentran en la IRC, aún en el estadio terminal.

La urea es la sustancia que más se ha investigado en su posible rol como "toxina" urémica. Estudios "in vitro" (Somer et al.,1968; Kersting et al.,1977) e "in vivo" en animales de experimentación y en humanos (Schreiner et al.,1961) mostraron evidencias de que la urea ejerce efectos tóxicos. La administración de diversas dosis de urea (Gilboe et al.,1964; Balestri et al., 1970) o el agregado de la misma en el baño de diálisis (Grollman et al.,1959) provocaron la aparición de algunos síntomas urémicos como dolor de cabeza, fatiga, náuseas, vómitos, intolerancia a la glucosa y tendencia al sangrado. No se observaron, sin embargo, las severas alteraciones gastrointestinales, cardiovasculares, inmunológicas y neurológicas de la uremia (Merrill et al., 1953). Si bien no puede explicarse el amplio espectro de síntomas urémicos solamente por la acumulación de urea se la puede considerar como una "toxina" urémica leve (Bergström et al.,1978 b).

La validez de muchos de los primeros estudios es dudosa debido a la utilización de métodos químicos poco específicos. Con la creciente incorporación de técnicas más elaboradas para la se

paración y el análisis de compuestos orgánicos se podrán dilucidar muchos aspectos inciertos.

Como ya se ha expuesto, aún en los casos de solutos en los que se ha demostrado claramente su retención -como urea y creatinina- no se ha podido determinar fehacientemente una relación causa-efecto para alguna faceta del síndrome urémico. Esta discrepancia entre la acumulación de sustancias de bajo peso molecular (BPM) y la presencia de síntomas urémicos se hizo más manifiesta en pacientes tratados con diálisis peritoneal crónica, los que, a pesar de una poco eficiente remoción de sustancias de BPM, mantenían un buen estado clínico y desarrollaban menos neuropatía que los hemodializados (Tenckhoff et al., 1965 b, 1970). Scribner (1965) sugirió que la membrana peritoneal sería más permeable a sustancias de peso molecular mayor, las cuales resultarían, de esa forma, más eficientemente removidas. La mayor permeabilidad de la membrana peritoneal con respecto a solutos más grandes fue confirmada mediante el empleo de  $^{59}\text{Co}$ -Vitamina B<sub>12</sub> (1 355 g/mol) e  $^{14}\text{C}$ -Inulina (5 200 g/mol) como marcadores de peso molecular medio (Babb et al., 1973).

Se postuló que las diálisis inadecuadas provocaban la retención de compuestos de mayor peso molecular. Estos podrían ser removidos mediante diálisis prolongadas empleando una membrana de

poco espesor pero no lo serían mediante diálisis, ya fueran cortas o prolongadas, que emplearan membranas de gran espesor con baja permeabilidad para los compuestos de peso molecular medio (Shaldon, 1966). La observación de que la modificación del tiempo de la duración de la diálisis podía prevenir o revertir los síntomas de polineuropatía periférica, independientemente de los valores, prediálisis de urea y creatinina plasmáticas (Jebsen et al., 1967), fortaleció la hipótesis que atribuía un rol tóxico a las "moléculas medias". Estos hallazgos clínicos condujeron a Babb et al. a postular, en 1971, la Hipótesis del metro cuadrado-hora que relacionaba la eficacia de la diálisis para prevenir el desarrollo de neuropatía urémica con el número de horas de tratamiento y con la superficie activa de la membrana empleada. Posteriormente, los mismos autores la denominaron Hipótesis de las Moléculas Medias (Babb et al., 1972 a). Para probar esta hipótesis se ensayaron diversas estrategias dialíticas especialmente diseñadas para aumentar o disminuir los "presumibles" niveles de "moléculas medias" (MM) en los líquidos corporales, relacionando estos cambios de concentración con la sintomatología de los pacientes. Estos estudios condujeron a resultados controvertidos. Algunos atribuyeron a las MM un rol importante en el desarrollo de los síntomas urémicos, avalando la hipótesis (Millora et al., 1972; Shinaberger et al., 1972; Man et al., 1973 a; Manji et al., 1974; Mirahmadi et al.,

1974; Rattazzi et al.,1974; Teschan et al.,1975) mientras que otros concluyeron lo contrario (Cambi et al.,1972; Kjellstrand et al.,1973; Maiorca et al.,1974). Se diseñaron modelos matemáticos para calcular las concentraciones de MM endógenas (Kjellstrand et al.,1972 a; Sargent et al.,1974; Popovich et al.,1974, 1975), para cuyo desarrollo debían establecerse varias suposiciones tales como los compartimientos del organismo en que esas sustancias estarían distribuídas, su velocidad de generación y el valor del clearance renal, ya que, en los pacientes con IRC, la función renal, aún mínima, cumple un rol muy importante (Babb et al.,1972 b; Milutinovic et al.,1974). No siempre las suposiciones propuestas fueron correctas ni se tuvieron en cuenta las grandes diferencias individuales en las velocidades de producción de las distintas fracciones de MM.

La hipótesis de las MM ha producido un gran impacto en la tecnología dialítica. Se probaron nuevas membranas con resultados diversos (Cross et al.,1971; Stenzel et al.,1971; Kjellstrand et al.,1972 b; Fisher et al., 1973; Reiger et al.,1974; Barbour et al.,1975). La membrana de poliacrilonitrilo (PAN, RP-6, Rhone Poulanc) resultó ser muy permeable a las MM y, acoplada a un sistema de recirculación cerrado, podía mantener, simultáneamente, una concentración plasmática relativamente elevada de sustancias de BPM, mientras en los pacientes se observaba mejoría en su neu



ropatía ( Funck-Brentano et al.,1972; Man et al.,1973 a, 1973 b, 1974).

Se introdujeron nuevas técnicas para la remoción de sustancias. Así se incorporaron la ultrafiltración (Henderson et al., 1967; hemodiafiltración (Hamilton et al.,1971; Silverstein et al., 1974), adsorción empleando carbón activado microencapsulado . (Chang et al.,1973, 1974) y diálisis peritoneal continua ambulatoria (CAPD) (Popovich et al.,1978), entre otras. Sin embargo resulta difícil evaluar los resultados debido a que la mejoría o bienestar de los pacientes es una determinación subjetiva, por lo tanto difícil de estimar y a que no se han podido medir, simultáneamente, variaciones de las concentraciones de una o de varias toxinas específicas en los líquidos corporales. Además, como se desconoce la estructura química de la(s) sustancia(s) a ser removida(s) no se pueden establecer los factores que pudieran intervenir en el transporte de los compuestos a través de membranas biológicas y sintéticas. Tampoco se conocen los espacios de distribución de las sustancias ni su velocidad de difusión, por lo tanto, no se puede predecir si van a ser removidas más eficazmente por diálisis cortas con elevados flujos de dializado o por diálisis prolongadas, del tipo de las peritoneales, que permiten alcanzar estados de equilibrio a ambos lados de la membrana.

Como se ha mencionado, numerosas sustancias han sido postuladas como "toxinas urémicas" pero, hasta ahora, no se han encontrado buenas correlaciones entre sus concentraciones en los líquidos del organismo y los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, existen pruebas indirectas de la toxicidad urémica. Se han realizado numerosos ensayos, la mayoría de ellos "in vitro", que mostraron que el plasma, el suero, sus ultrafiltrados y los líquidos de dializado de los pacientes urémicos podrían afectar varios procesos biológicos.

Un aporte importante, en ese sentido, fueron los estudios de Smith y Welt (1970) quienes observaron que el plasma de pacientes urémicos, cuyos eritrocitos contenían una elevada concentración de sodio, inhibía la ATPasa de los glóbulos rojos normales. Este defecto fue atribuido a un soluto desconocido, el cual podría ser responsable, además, de la inhibición del transporte mediado por ATPasa a nivel del intestino y del cerebro (Minkoff et al., 1972; Kramer et al., 1974). Es probable que perturbaciones generalizadas en el transporte de solutos a través de las membranas celulares constituyan el común denominador de los desórdenes que afectan a tantos órganos en la uremia. Apoyarían esta sugerencia los hallazgos de inhibición de diversos sistemas de transporte cuando se ensayaron en presencia de suero total o ultrafiltrado de suero urémico. Estos estudios incluyen los transportes

de sodio a través de membranas celulares (Buckalew et al., 1974; Kramer et al., 1976), de calcio en mitocondrias (Russell et al., 1974), de fosfato en el glóbulo rojo (Kuroyanagi et al., 1964), de ácido úrico en cortes de hígado (White et al., 1975), de derivados del ácido hipúrico en tejidos renal y hepático (Bricker et al., 1968; Ciccone et al., 1968; Bourke et al., 1970; Orringer et al., 1971) y de aminoácidos en el músculo (Černáček et al., 1976). Los efectos de los mecanismos de transporte de membrana mediados por enzimas y que involucran sistemas hormonales tienen especial interés con respecto a la hipótesis del "comercio" de Bricker, mencionada anteriormente. Según ésta, la adaptación homeostática frente a la retención del sodio y a la expansión del volumen corporal estimularía la liberación de un factor humoral para provocar la disminución de la reabsorción tubular de sodio (Bricker et al., 1978). La hiperproducción de este factor podría cumplir un importante papel en la toxicidad urémica al causar la inhibición del transporte de sodio transmembrana, simultáneamente, en otras células, provocando alteraciones de la concentración iónica, el metabolismo, la respiración y la funcionalidad celular.

En otras investigaciones se observó que la presencia de suero urémico en el medio producía la inhibición "in vitro" de la eritropoyesis (Fisher et al., 1968; Lamperi et al., 1974; Moriyama et al., 1975), del crecimiento de fibroblastos (Rachmilewitz

1941), de la transformación linfocitaria (Newberry et al.,1971; Touraine et al.,1975a;Musatti et al.,1979) y de la función plaquetaria (Horowitz et al.,1967) y provocaba la estimulación de la autohemólisis de los glóbulos rojos normales (Giovanetti et al.,1966).

Una amplia variedad de procesos metabólicos mostraron alteración en presencia de suero urémico cuando se estudiaron mediante modelos "in vitro". Se encontró inhibición de la utilización de la glucosa y de la glicólisis (Morgan et al.,1964; Dzúrik et al.,1967), de la gluconeogénesis en hígado (Dzúrik et al.,1969), en riñón y en cerebro (Renner et al.,1965), del metabolismo mitocondrial (Glaze et al.,1967), de la fibrinolisis (Bennett et al.,1970),de la lipólisis (Boyer et al.,1970) y de la síntesis proteica (Delaporte et al.,1981). También se han reportado resultados que muestran la inhibición de diversas enzimas por acción del suero urémico. Entre ellas se encuentran lactato deshidrogenasa (Morgan et al.,1963; Emerson et al.,1965), lipasa (Boyer et al.,1970; Murase et al.,1975; Bagdade et al.,1976), xantina oxidasa (White et al.,1975), fenilalanina hidroxilasa (Young et al.,1973), ATPasa (Cole et al.,1968; Minkoff et al.,1972) y timidina quinasa (Korz et al.,1977).

Algunos resultados de inhibición no pudieron ser reproducidos por otros autores cuando se realizaron nuevos estudios.

La disparidad entre los procedimientos de extracción y los modelos biológicos experimentales proporciona una reproducibilidad limitada de las diferentes perturbaciones metabólicas que operan en la uremia.

Los resultados mencionados muestran que una variedad de alteraciones clínicas tales como anemia, deficiencia inmunológica, tendencia al sangrado, desórdenes de los metabolismos de lípidos y de carbohidratos podrían relacionarse con sustancias tóxicas o inhibidores presentes en la sangre y otros líquidos corporales de los pacientes urémicos.

Muchos otros trabajos, presentes en la bibliografía, con diversos resultados respecto de la presencia o no de inhibidores, son poco consistentes debido al empleo de diseños experimentales poco adecuados y/o a la falta de estudios controles paralelos.

Como respuesta a tantos estudios poco concluyentes se intentó, en los últimos años, la investigación de grupos de compuestos aislados de orina y suero de sujetos controles y de pacientes urémicos. Se prestó especial atención a compuestos llamados de peso molecular medio (PMM), comprendidos supuestamente entre 500 y 5 000 g/mol y de naturaleza peptídica, basándose en el hecho de que las diálisis y las dietas pobres en proteínas disminuían las concentraciones séricas de tales solutos y habiéndose descartado,

prácticamente, la toxicidad de las "moléculas pequeñas".

Los primeros reportes se encuentran en 1957 y 1958, antes de la postulación de la hipótesis de las MM, cuando Desi et al. y Fehér et al. aislaron, mediante resinas de intercambio iónico, una fracción del plasma urémico que resultó ser un péptido de bajo peso molecular extremadamente tóxico para animales de experimentación. Durante varios años no se prestó atención a la búsqueda de sustancias PMM hasta que Bricker et al., en su investigación de la hormona natriurética, encontraron, mediante filtración por geles de suero y orina de pacientes urémicos, una fracción de peso molecular menor de 1 000 g/mol que tenía la propiedad de inhibir el transporte transepitelial de sodio e inducir natriuresis en la rata (Bourgoignie et al., 1971, 1972, 1974; Kaplan et al., 1974).

Desde 1971, numerosos grupos de investigadores han intentado establecer métodos para la determinación de las "MM" en los líquidos biológicos. Las sustancias desconocidas fueron usualmente detectadas por sus propiedades de absorción de la luz ultravioleta a distintas longitudes de onda (206, 240, 254 y 280 nm) o por su capacidad para reaccionar con diversos reactivos (ninhidrina, reactivo de Folin o fluorescamina).

Independientemente de la discusión de las MM, Dzúrik et al. reportaron en 1971 la presencia de péptidos en orina y suero de

pacientes urémicos, no detectables en sujetos normales. La metodología empleada -electroforesis por alto voltaje- sólo permitió una valoración semicuantitativa y no proveyó información acerca del peso molecular del material peptídico. En otro estudio, los mismos autores separaron cuatro fracciones, empleando cromatografía de exclusión por Sephadex G-15, a partir de plasma y orina de pacientes urémicos no dializados. Encontraron que la fracción 3, ausente en los sujetos controles, pertenecía al rango de "PMM" (Dzúrik et al., 1973 a.). Mediante procedimientos preparativos secuenciales de cromatografía en Sephadex G-25 y DEAE-A 25 separaron y purificaron un factor inhibitorio de la utilización de la glucosa "in vitro" por diversos tejidos de rata (Dzúrik et al., 1973 b.). Concluyeron que se trataba de un péptido de naturaleza básica -por hidrólisis, electroforesis por alto voltaje y reacción con ninhidrina- con PM entre 1 000 y 1 500 g/mol (determinado por el tiempo de retención en la columna). Encontraron, además, que la acumulación de la fracción se relacionaba inversamente con el clearance de creatinina. Los mismos autores estudiaron la presencia y liberación de "MM" en tejidos de ratas (Dzúrik et al., 1978, 1981), observando grandes variaciones de los contenidos de sustancias de PMM en los distintos tejidos. No quedó totalmente aclarado si esas fracciones, obtenidas por cromatografía en Sephadex G-15, son equivalentes a las encontradas en líquidos

orgánicos urémicos, si bien los autores reportaron que la fracción 2 tisular contenía todas las subfracciones encontradas en suero urémico por cromatografía de intercambio.

Dall'Aglia et al., (1972) y Migone et al., (1974) fraccionaron suero, orina y líquidos de dializado de pacientes urémicos bajo tratamiento conservativo con hemodiálisis, empleando cromatografía en distintos tipos de Sephadex (G-100, G-75, G-25, G-15 y G-10) combinada con ultrafiltración a través de membranas selectivas (Amicon UM-05). Aislaron una fracción cuyo peso molecular, estimado por comparación con sustancias de referencia, se encontró entre 500 y 3 500 g/mol. La determinación de aminoácidos mediante cromatografía bidimensional y electroforesis por alto voltaje- después de hidrólisis, mostró que dicha fracción contenía material peptídico. Sin embargo, la recuperación de aminoácidos constituyó sólo parte del peso seco y del contenido de nitrógeno total. Mediante estudios seriados de concentrados de líquidos de hemodiálisis, los mismos autores, mostraron que la velocidad de remoción de sustancias de PMM a través de la membrana empleada (Cuprophan) se mantenía a lo largo de 4 horas de tratamiento (Migone et al., 1974).

Man et al. (1973 b, 1974) y Funck-Brentano et al. (1975) estudiaron el fraccionamiento de líquidos de dializado de pacientes con tratamiento de hemodiálisis empleando membranas de poli-



acrilonitrilo (PAN). Mediante cromatografía en Biogel P-2 y Sephadex G-25 y G-15 aislaron una fracción de peso molecular supuesto entre 1 300 y 1 700 g/mol que producía efectos tóxicos sobre cultivos de fibroblastos de células WI-38 y sobre crías de pescado. Igual respuesta, pero en diluciones menores, se observó al emplear la misma fracción obtenida a partir de orina normal. Los resultados iniciales fueron difíciles de evaluar porque no se especificaron las condiciones de la separación cromatográfica, los datos se compararon con los de un solo control (¿líquido de dializado del individuo control?) y no se emplearon sustancias de referencia. Posteriormente, los mismos autores encontraron una fracción ( $b_{4-2}$ ) cuyo tamaño era comparable al de la vitamina  $B_{12}$  y cuya concentración estaba más elevada en el suero de los pacientes urémicos con neuropatía que en el de aquéllos que no presentaban tal alteración (Man et al., 1976; y Funck-Brentano et al., 1978 a). Para realizar el fraccionamiento emplearon un sistema combinado de cromatografía de exclusión y de intercambio iónico (Cueille, 1978). Los ensayos "in vitro" de una prueba neurotóxica fueron positivos cuando se emplearon sueros de pacientes urémicos con neuropatía y también con la fracción  $b_{4-2}$ , por lo que se sugirió que, dentro de esa fracción, se encontraban sustancias con actividad neurotóxica.

El grupo de Hanicki et al. (1974) separó, por cromatografía

en Sephadex G-25 de plasma y de intercambio iónico en Dowex 50 Wx8 de líquido de diálisis de pacientes urémicos bajo tratamiento, fracciones ninhidrina positivas que fueron sometidas a diálisis para eliminación de los aminoácidos libres. El residuo no dializable -conteniendo las sustancias de PMM, supuestamente, entre 1 500 y 5 000 g/mol- mostró la presencia de diversas fracciones peptídicas cuando se lo sometió a electroforesis en capa delgada sobre Sephadex G-25. Analizadas posteriormente por Biogel P-6 las diferentes fracciones peptídicas, obtenidas a partir de líquido de dializado, mostraron perfiles semejantes y la presencia de un pico característico con propiedades de reacción positiva con ninhidrina y pobre absorción de la luz a 260 nm (Klein et al. 1978). El peso molecular de la fracción, calculado por extrapolación en la curva de calibración con sustancias de referencia, fue muy diferente al estimado a partir de la composición de aminoácidos y los autores interpretaron que tal fracción estaría compuesta por una mezcla de péptidos de estructura estrechamente semejante. La fracción de "MM" del dializado de dos pacientes urémicos produjo un efecto inhibitorio sobre el cultivo de linfocitos estimulado con fitohemoaglutinina (Hanicki et al., 1976) y sobre la migración leucocitaria (Cichocki et al., 1980).

Chang et al. (1974), empleando filtración por geles a través de Sephadex G-25 y G-15, también encontraron sustancias de

PMM -entre 300 y 500 g/mol por comparación con marcadores de PM- presentes en el suero urémico. Reportaron que el tratamiento de 2 horas de hemoperfusión, empleando carbón activado microencapsulado, produjo una reducción del nivel sérico de "MM" mayor que el obtenido con 6 a 10 horas de tratamiento dialítico convencional, observándose, además, mejoría en los signos de neuropatía cuando el tratamiento se prolongó durante 3-6 meses. Lamentablemente, el estudio se realizó en un solo paciente y no se investigó una población más representativa y a largo plazo.

Más consistentes fueron los resultados mostrados por el grupo de Fürst et al. (1974, 1975, 1976) y Gordon et al. (1975) quienes estudiaron 500 muestras de plasma, orina, líquidos de hemodiálisis y de diálisis peritoneal provenientes de 81 pacientes urémicos y no urémicos (incluyendo sujetos normales). Emplearon un sistema de filtración por geles de Sephadex G-15 por alta velocidad y encontraron una fracción (Fracción 7) presente en elevada concentración en el plasma de los pacientes urémicos no tratados y ausente del plasma normal, en pequeña concentración en el plasma de individuos urémicos bajo tratamiento dietético, en orinas urémicas y normales y, lo más impactante, en mayores concentraciones en el líquido de diálisis peritoneal que en el de hemodiálisis. Esto apoyaría las primeras sugerencias que indicaban la existencia de una mayor permeabilidad de la membrana peritoneal para

moléculas de PMM. Observaron evidencias de que esta fracción -de PM estimado por comparación con marcadores entre 1 200 y 1 400g/mol- incluía una mezcla peptídica. Por sucesivo fraccionamiento cromatográfico por elución con gradiente en Sephadex DEAE A-25 encontraron que la subfracción  $7_c$  estaría estrechamente relacionada con el síndrome urémico, siendo su nivel sérico independiente de las concentraciones plasmáticas de urea y de creatinina, pero con grandes variaciones entre los diferentes individuos (Bergström et al., 1980). Los resultados mostraron que los enfermos con síntomas urémicos tales como pericarditis, neuropatías, mal nutrición y grave retención de líquido, tendían a acumular sustancias de PMM ( $7_c$ ) mientras que aquéllos pacientes urémicos asintomáticos (dializados adecuadamente o en tratamiento conservativo exitoso) tenían menor proporción de fracciones en el rango de las "MM". Este hallazgo podría indicar que las sustancias estudiadas actuarían como toxinas urémicas. Los mismos autores encontraron que los sueros de los pacientes urémicos hemodializados que producían inhibición "in vitro" del cultivo mixto de linfocitos contenían una elevada concentración de la subfracción  $7_c$  mientras que ésta era significativamente más baja en aquéllos que no producían inhibición (Fehrman et al., 1980). Recientemente el mismo grupo de investigadores realizó la identificación del principal componente de la fracción  $7_c$ , detectando un doble con-

jugado del ácido o-hidroxibenzoico con ácido glucurónico y glicina con un PM de 371 g/mol, mucho menor que el calculado, inicialmente, para la misma fracción. Para la caracterización emplearon electroforesis por alto voltaje, isotacoforesis, espectrometría de masa e hidrólisis enzimática (Bergström et al., 1981; Zimmerman et al., 1981).

Otros autores intentaron separar y caracterizar fracciones en el rango de PMM, a partir de diferentes medios -plasma, líquidos pericárdico, cefalorraquídeo y peritoneal (Mamdani et al., 1979), suero, orina y hemolizado de glóbulos rojos (Chapman et al., 1980) -empleando técnicas de filtración molecular, electroforéticas o de cromatografía de intercambio iónico para la separación y espectrofotométricas y espectrofluorométricas para la detección de los compuestos (Peters et al., 1974). Estos estudios apoyarían a) el hallazgo de concentraciones elevadas de sustancias con presumibles PMM en la uremia, b) la presencia de una mezcla de compuestos en cada fracción y c) el comportamiento semejante al de péptidos de algunas sustancias de PMM. (Peters et al., 1974, 1975; Mamdani et al., 1979). Sin embargo, en algunos casos, las técnicas empleadas para la purificación y el análisis no fueron las apropiadas para obtener resultados determinantes (Menyhárt et al., 1981).

Además de los mencionados, muchos investigadores emplearon

cromatografía de filtración por geles y de intercambio iónico para separar fracciones urémicas en el rango de las "MM" con el propósito de estudiar su toxicidad. Se encontró que algunas fracciones, obtenidas a partir de plasma, orina y/o dializados, producían efectos inhibitorios sobre sistemas enzimáticos involucrados en la síntesis de hemoglobina (Goubeaud et al., 1976; Leber et al., 1979) y sobre la respiración mitocondrial (Rinaudo et al., 1979) o provocaban acción tóxica "in vivo" después de administradas a animales de experimentación (Menyhárt et al., 1977).

Hasta ahora, sólo unos pocos compuestos, de los llamados "MM" han sido aislados en forma relativamente pura y, menos aún, se ha llegado a una identificación completa con conocimiento de la composición de los mismos.

Además de los compuestos mencionados, aislados por los investigadores de Estocolmo (Bergström et al., 1981; Zimmerman et al., 1981) y París (Cueille et al., 1981), se encuentran los reportados por Lutz et al. (1976). Estos aislaron cuatro péptidos, mediante cromatografía de partición y electroforesis sobre papel. Estimaron el rango de PM -entre 1 300 y 1 800 g/mol- y determinaron las relaciones molares de los componentes aminoacídicos pero no establecieron su secuencia. Encontraron que uno de los péptidos contenía espermina y otro, un grupo guanidina y un resto glu

cídico. Los compuestos peptídicos mostraron poseer fuerte capacidad de unión con la insulina y uno de ellos inhibió la lipasa estimulada por la insulina.

Abiko et al., empleando ultrafiltración por membranas selectivas, cromatografía de filtración por geles y de intercambio iónico, aislaron un dipéptido con efecto inmunosupresor sobre la proliferación celular, a partir de suero urémico (Abiko et al., 1978a) y tres péptidos, a partir de ultrafiltrados de líquidos de diálisis extracorpórea de pacientes con uremia severa. Un heptapéptido, coincidente con las posiciones 13-19 de la  $\beta_2$ -microglobulina (Abiko et al., 1978 c) y un pentapéptido, correspondiente a las posiciones 123-127 de la cadena  $\beta$  del fibrinógeno (Abiko et al., 1979 b) produjeron un efecto inhibitorio sobre la formación de rosetas entre linfocitos humanos y eritrocitos de carnero (Abiko et al., 1979 a), sugiriendo que podrían ser la causa o contribuir a la alterada respuesta inmune de la uremia. Un tri péptido, también obtenido del líquido de dializado, parecería tener algún efecto neurotóxico "in vitro" (Abiko et al., 1978 b). En todos los casos determinaron la secuencia aminoacídica y sintetizaron los análogos, comparando la acción biológica. Estos son los primeros reportes en los que se demostró la estructura completa de nuevos péptidos, biológicamente activos, en el rango de PMM y que coinciden con fragmentos de proteínas habituales

del organismo. Sin embargo, cada uno de estos compuestos fue obtenido de material proveniente de un solo paciente y no es posible evaluar su rol como toxina urémica, ya que no se ha reportado su presencia en el plasma normal, no se conocen las concentraciones en plasmas urémicos ni su relación con la severidad de la enfermedad.

En un cuidadoso trabajo -el único en que se ha caracterizado totalmente una toxina- se muestra que la espermina es la responsable de la inhibición de la eritropoyesis "in vitro" (detectada por inhibición de la formación de colonias eritroides CFU-E) por acción del suero urémico. Para su identificación se emplearon  $^{14}\text{C}$ -espermina y antisuero anti-espermina (Radtke et al., 1981).

Los resultados de algunos de los estudios precedentes, a veces, resultaron contradictorios y no fueron del todo comparables debido a que se emplearon muestras provenientes de distintas fuentes (plasma, orina, líquidos de dializado, etc.) de pacientes en diferentes estadios de la enfermedad (no siempre bien determinados en los reportes), algunos de ellos sometidos a tratamientos dietéticos y/o dialíticos. Además, existen factores que influyen sobre el procedimiento metodológico empleado, que no fueron concordantes en todos los estudios, tales como dimensiones y relleno de la columna de cromatografía, composición y concentraciones de las soluciones eluyentes, velocidad de flujo del eluí-



do, longitud de onda de la detección o tratamiento previo de las muestras.

La separación de las "MM" por cromatografía de exclusión se basó en la posibilidad de que esta técnica discriminara diferentes compuestos de acuerdo con su tamaño molecular. Sin embargo, esto es sólo aproximadamente cierto, ya que algunos compuestos (especialmente aquéllos cíclicos y aromáticos) pueden ser retenidos en las columnas mientras que otros eluyen antes de lo esperado por su tamaño molecular. De esta manera, parece que algunas fracciones de "MM", aisladas en el rango de PM teóricos de 1 000 - 2 000 g/mol, podrían tener PM más bajos. Por la misma razón, se podría pensar que las sustancias de BPM no queden totalmente excluidas de las fracciones que incluyen las "MM" y serían estimadas junto con los compuestos de PMM. Tampoco se puede descartar su influencia sobre las pruebas de actividad biológica "in vitro".

Algunos autores intentaron la búsqueda de sustancias acumuladas en el plasma durante el transcurso de la IRC empleando, para ello, otros métodos analíticos muy sensibles y con elevado poder de resolución, los que permiten la detección de numerosos compuestos presentes en una muestra.

Mediante la utilización de una técnica de cromatografía gaseosa de elevada resolución se encontraron 79 picos en el suero urémico. Los perfiles cromatográficos de los sueros extraídos an

tes y después de una hemodiálisis mostraron la remoción de varios componentes por el tratamiento dialítico. Mediante espectrometría de masa se identificaron 26 fracciones, la mayoría de ellas, formadas por sustancias relacionadas con el metabolismo hidrocarbonado tales como aldosas, ácidos aldónicos y polioles. Además, se identificaron algunos ácidos orgánicos y compuestos nitrogenados (Schoots et al., 1979).

Bultitude et al. (1975) describieron un método para comparar muestras de sujetos normales con las de pacientes urémicos (en un caso, antes y después de una sesión de hemodiálisis). Después de un fraccionamiento preliminar por cromatografía de exclusión, empleando Sephadex G-10, estudiaron las fracciones por cromatografía gas-líquido. Detectaron entre 150 y 200 metabolitos identificando, mediante espectrometría de masa, 10 compuestos; aquéllos que aparecían específicamente o estaban incrementados en la uremia.

Los métodos que emplean cromatografía gas-líquido están limitados a la detección de compuestos volátiles o que, pueden, fácilmente, transformarse en volátiles por derivatización.

En otro trabajo se separaron más de 50 componentes con absorbancia en UV, presentes en sueros urémicos y líquidos de hemodiálisis, mediante cromatografía líquida de alta presión. Aproximadamente, la mitad de esas sustancias fueron identificadas por

sus espectros de absorción en el UV y por su comportamiento (tiempo de retención en las columnas) en cromatografías líquida y gaseosa por comparación con compuestos testigos.

La información presentada en esos trabajos está limitada a la enumeración de compuestos detectados en el suero o líquido de dializado de pacientes urémicos. En algunos casos se investigaron las condiciones para lograr una mejor separación y se identificaron algunas sustancias, pero éstas no fueron aisladas, no se estudiaron sus propiedades tóxicas ni se proveyó información acerca de sus tamaños moleculares. La sola presencia de esas sustancias en el plasma urémico no implica un rol tóxico de las mismas, aún cuando no hayan sido detectadas en sujetos normales.

La incorporación de nuevas técnicas en la investigación de "toxinas urémicas" contribuyó a ampliar enormemente la información acerca del número de compuestos retenidos en la uremia, ya presentados en la Tabla I, número que puede incrementarse todavía más a medida que se utilicen técnicas más sensibles, ya que algunas sustancias se detectan en cantidades ínfimas. Sin embargo, toda esa información no ha contribuido, todavía, a avanzar en el conocimiento del aspecto causal de los diversos síntomas de la enfermedad.

Hasta el momento no se ha podido identificar una sustancia que pueda ser incriminada como "toxina urémica", es decir, aqué-

lla que cumpliera con los siguientes postulados:

1) Que sus concentraciones plasmáticas y/o tisulares sean significativamente mayores en los pacientes urémicos que en los sujetos normales.

2) Que se puedan establecer correlaciones entre sus concentraciones y el grado de severidad de la IRC y la presencia de síntomas urémicos específicos.

3) Que se puedan reproducir sus efectos tóxicos en ensayos experimentales apropiados empleando concentraciones de la toxina comparables con las halladas en los líquidos corporales de los pacientes urémicos.

4) Que sea un compuesto químicamente identificable y que se pueda cuantificar en forma específica.

Entre los diversos síntomas que pueden presentar los pacientes con IRC, en el presente trabajo se ha prestado especial atención a) a los inmunológicos, como causa importante de incidencia de muerte secundaria a infecciones interrecurrentes y b) a los neuroológicos por las limitaciones individuales y sociales que introducen debido a la instalación de severos cuadros de invalidez.

Existen evidencias de que la incidencia de las infecciones está aumentada en la uremia. Algunos factores, presentes en la

IRC severa, apoyan la impresión de que hay una disminución de las defensas, tanto en el mecanismo humoral (Boulton-Jones et al., 1973) como en el celular, siendo éste el más afectado.

Varios son los hallazgos que muestran que la inmunidad celular está deprimida en la IRC:

1) Reducida respuesta de la hipersensibilidad retardada a una variedad de antígenos inyectados por vía intracutánea (PPD y antígenos de *Cándida*, entre otros) (Wilson et al., 1965).

2) Prolongada sobrevivencia del injerto de piel (Hume et al., 1955; Dammin et al., 1957; Wilson et al., 1965).

3) Pronunciada linfopenia.

4) Pobre respuesta inflamatoria frente al toxoide diftérico (Lang et al., 1966).

5) Deficiente función linfocitaria.

A partir de esos datos no se puede distinguir si la alteración de la función linfocitaria se debe a un defecto celular primario o a una acción del medio que rodea a las células, es decir, a la presencia de sustancias circulantes con acción tóxica o inhibitoria sobre la función celular.

La inmunidad celular se puede estudiar "in vitro" por la determinación de una serie de respuestas que involucran a los linfocitos T y a mediadores liberados de esos linfocitos frente a estímulos apropiados: células alogeneicas y activadores ines -

pecíficos como fitohemoaglutinina (PHA) o concanavalina A (Con-A)

Algunos investigadores reportaron hallazgos de disminución de la función linfocitaria "in vitro" por acción de suero o plasma urémico provenientes de humanos (Newberry et al., 1971; Touraine et al 1975a; Musatti et al., 1979) o de animales con insuficiencia renal crónica experimentalmente inducida (Raskova et al., 1978). Sin embargo, Kasakura et al. (1967) no pudieron demostrar una disminución de la proliferación celular de los linfocitos de sangre periférica normales suspendidos en el plasma de pacientes con IRC.

El suero de pacientes con otras enfermedades crónicas no mostró efecto supresor alguno.

Existe poca información acerca de la naturaleza del factor o factores inhibidores.

Miyakoshi et al. (1979) encontraron una fracción sérica inmunosupresora con acción más pronunciada inmediatamente después de la hemodiálisis. El compuesto activo tendría PM mayor de 50 000 g/mol, de probable naturaleza proteica y no sería dializable. Raskova et al. (1981) encontraron que una fracción lipoproteica de muy baja densidad (VLDL) con PM mayor de 200 000 g/mol, aislada del suero de ratas urémicas, producía inhibición de distintas funciones inmunológicas celulares "in vitro".

Varias fracciones en el rango supuesto de "pesos molecula-

res medios", obtenidas a partir de plasma, suero, orina o líquidos de dializado de pacientes urémicos, tendrían un rol importante en la inmunodeficiencia de la IRC. En presencia de tales fracciones se encontró:

a) Inhibición de la proliferación linfocitaria inducida "in vitro" por mitógenos inespecíficos (PHA o Con-A) o por células alogeneicas en el cultivo mixto de linfocitos (MLC) (Touraine et al 1975a; Hanicki et al., 1976; Abiko et al., 1978 b ; Fehrman et al., 1980).

b) Disminución de la velocidad de migración de los leucocitos (Cichocki et al., 1980).

c) Bloqueo de la actividad fagocítica de la sangre (Ringoir et al., 1980).

d) Inhibición de la formación de rosetas E (Abiko et al., 1979 a ; 1979 b ).

e) Inhibición de la proliferación de líneas celulares de origen normal o tumoral y líneas celulares leucémicas derivadas de leucemia linfoblástica aguda (Navarro et al., 1979).

f) Prolongación de la tolerancia al injerto de piel en ratas mantenidas con infusión continua de sustancias de "PMM" (Navarro et al., 1977).

g) Disminución significativa de la respuesta "injerto vs. huésped", inducida en ratones por la inyección de linfocitos alo

geneicos previamente incubados con sustancias de "PMM" (Navarro et al., 1977).

En los estudios nombrados existen controversias acerca del tamaño molecular de los inhibidores, de su difusibilidad a través de las membranas convencionales de diálisis y del posible mecanismo de acción tóxica. Este es, aún, desconocido; no obstante, parecería que la inhibición de la proliferación celular es el común denominador de los efectos inmunosupresivos encontrados "in vitro" e "in vivo".

El compromiso neurológico en los pacientes con IRC puede ser extenso, afectando tanto al sistema nervioso central (SNC) como al periférico y conduciendo a los enfermos, durante la etapa final de la enfermedad, a severos cuadros de invalidez que los limitan funcionalmente, con las consecuencias individuales y sociales que de ello derivan.

Los signos de la patología neuromuscular se desarrollan en las fases terminales del fallo renal crónico e involucran trastornos musculares del neurón periférico.

Las primeras descripciones que caracterizaron adecuadamente los trastornos neuromusculares fueron hechas hace, aproximadamente, 25 años con referencia a pacientes no dializados (Asbury et al., 1963) y en plan de hemodiálisis (Hegstrom et al., 1961),



siendo los rasgos de ambos grupos, similares.

Dyck et al. (1971) señalaron que los dos tercios de los pacientes sometidos a terapéutica convencional, dieta, restricción hídrica y hemodiálisis presentan neuropatía periférica moderada, concordando estos resultados con otros publicados previamente (Preswick et al., 1964).

La ausencia de uniformidad de criterio en el diagnóstico clínico de la neuropatía periférica ha hecho difícil la evalua-ción de esta complicación, así como también, el análisis de los resultados terapéuticos. Entre las diferencias que entorpecen la comparación de los datos de los distintos centros deben destacarse el empleo de diferentes aparatos (con características específicas de sus membranas de diálisis) y las modalidades terapéuticas disímiles, entre las cuales tienen especial significado las referidas a las horas semanales de hemodiálisis, velocidades de flujo sanguíneo y del baño de diálisis; además, pueden influir la composición de la dieta, medicación suplementaria y otras drogas indicadas por patologías intercurrentes (Köpple et al., 1978).

Hasta el momento no ha sido dilucidado el mecanismo que produce los reconocidos trastornos neurológicos en la IRC. La correlación entre los resultados de los exámenes clínicos, electromiográficos, histopatológicos y enzimáticos no siempre fue clara.

Se ha postulado que alguna o varias de las sustancias acu-

muladas en la uremia provocarían cambios estructurales y/o funcionales que culminarían con el establecimiento de la neuropatía (Formo et al., 1967). Esta posibilidad estaría apoyada por la mejoría observada luego del tratamiento con diálisis adecuada (Kotey-Ahuler et al., 1965; Tenckhoff et al., 1965a) y, más claramente aún, después del trasplante renal (Funck-Brentano et al., 1963; Tenckhoff et al., 1965a), condiciones que sustentaron la formulación de la hipótesis de las "MM", mencionada anteriormente (Babb et al., 1972 a ).

Se ha realizado una extensa y cuidadosa revisión de los diferentes mecanismos que pudieran estar involucrados en el desarrollo de la neuropatía urémica y una amplia discusión de los resultados reportados en la bibliografía sobre el tema (Delbono et al., 1982).

Funck-Brentano et al. estudiaron pacientes polineuríticos con IRC terminal, tres previamente dializados y uno no dializado. Los introdujeron en un plan de hemodiálisis crónica empleando membranas de poliacrilonitrilo (PAN) y una frecuencia de 9h semanales. A los seis meses de tratamiento los pacientes presentaban un estado satisfactorio, siendo posible la locomoción (aunque subnormal en todos ellos), menor la debilidad y mayor la sensación de bienestar. La velocidad de conducción nerviosa (VCN) fue notablemente superior, aunque lejos, todavía, de los valores nor

males. Los autores concluyeron que las responsables de la polineuritis serían sustancias cuyos PM se hallarían dentro del rango de las "MM", ya que las mismas dializaban fácilmente a través de membranas de PAN (Funck-Brentano et al., 1975). Los mismos autores evaluaron la neurotoxicidad de plasma y de dializados de pacientes renales crónicos polineuríticos mediante el empleo de un modelo "in vitro" de nervio aislado de rana (Man et al., 1973 b). Expresaron la capacidad de las muestras para disminuir la amplitud del potencial de acción evocado por un estímulo eléctrico mediante el denominado índice de inhibición (I.I.). Este índice fue elevado para los plasmas de tres de cuatro pacientes y, en general, se correlacionó con la severidad de los síntomas neurológicos. El I.I. fue cercano a cero cuando se empleó plasma de sujetos normales y de pacientes con IRC sin polineuritis. Correlacionaron los resultados de los ensayos de neurotoxicidad del plasma de los pacientes polineuríticos con la presencia de compuestos de "presumible PMM", la subfracción  $b_{4-2}$  obtenida por cromatografía de exclusión estérica y de intercambio iónico (Funck-Brentano et al., 1978 b). Atribuyeron la acción neurotóxica a algún componente del pico  $b_{4-2}$ . Posteriormente, ese grupo de investigadores desarrolló un proceso para purificar e identificar los componentes de dicha fracción. Los resultados preliminares indican la presencia de un poliol ácido (conjugado glucu

rónico) de 500-600 g/mol de PM, con una parte de la molécula cuya estructura no han podido identificar todavía (Cueille et al., 1981).

Ante la apariencia tan concluyente de los datos anteriores se oponen los resultados de Kjellstrand et al. (1973) quienes investigaron los factores que podían influir en el establecimiento de la neuropatía en 30 pacientes nefrectomizados. Los controlaron durante cinco meses y concluyeron que los factores más importantes a tener en cuenta para impedir la polineuropatía consistían en a) iniciar el tratamiento dialítico tempranamente, b) contar con la cooperación del paciente previniendo groseros cambios del peso corporal, c) evitar variaciones importantes de los niveles del potasio sérico y d) mantener un estricto control de la presión arterial. Agregaron que las sustancias de "PMM" no son individualmente tóxicas y que los niveles de las mismas no constituyen un indicador confiable de la neuropatía clínica, resultados también apoyados por Maiorca et al. (1974).

A pesar de todos los esfuerzos todavía no se ha podido elucidar el origen del daño neuropático de la insuficiencia renal crónica ni ha sido bien documentada la disminución de síntomas urémicos por el empleo de membranas más permeables que las convencionales de celulosa.

## OBJETIVOS

- 1) Calibración de una técnica para el estudio de las sustancias retenidas en la uremia, que permita diferenciar entre sustancias de BPM y de PMM.
- 2) Comprobación de la validez de la hipótesis de las MM.
- 3) Caracterización de perfiles cromatográficos plasmáticos de pacientes con IRC, IRA, pacientes no renales y sujetos contro - les, para tratar de determinar la selectividad de la retención y el efecto que, sobre la misma, ejerce el tiempo de evolución de la enfermedad renal.
- 4) Determinación de algunas propiedades de las sustancias urémicas, tales como mecanismos de excreción, difusibilidad a través de distintos tipos de membranas y velocidad de acumula - ción.
- 5) Caracterización química de compuestos acumulados en la uremia.
- 6) Investigación de la toxicidad de compuestos urémicos , "in vitro" e "in vivo", para determinar su acción sobre sistemas inmunológicos y neurológicos.

## MATERIALES Y METODOS

- 1) Determinación de creatinina. Método de Brod y Sirota (1948).  
La técnica se basa en la reacción de Jaffé. Se produce un compuesto coloreado entre la creatinina y el picrato alcalino, de composición no establecida, que se mide espectrofotométricamente.
  
- 2) Determinación de urea. Método de Yatzidis et al. (1964).  
Se desproteinizan las muestras con una mezcla de carbón activado y ácido tricloroacético, etapa que permite, además, la eliminación de sustancias interferentes. Al filtrado se le agrega reactivo de Ehrlich (p-dimetilaminobenzaldehído en medio ácido), produciéndose un compuesto coloreado que se mide espectrofotométricamente.
  
- 3) Determinación de inulina. Método de Hubbard et al. (1942).  
El plasma, desproteinado según la técnica de Somogyi, se trata con solución alcohólica de resorcina en medio clorhídrico. La determinación se basa en la reacción de Seliwanoff para los grupos fructosa del polisacárido.

4) Medición de pH. Método potenciométrico.

Se empleó un pHímetro Metrohm Modelo 632 (Metrohm, Suiza)

5) Determinación de sodio y potasio. Técnica de fotometría de llama.

Se empleó un espectrofotómetro de emisión de llama, con dilutor automático IL modelo 143 (USA).

6) Determinación de ósmolaridad. Método de descenso crioscópico.

Se determina el número de partículas en solución en las muestras por medición del descenso del punto de congelación de la solución comparado con el del agua.

Se emplearon los siguientes instrumentos:

Osmómetro Fiske, modelo G (para 2 ml de volumen de muestra) y Microosmómetro Fiske (para 0,2 ml de volumen de muestra) (Fiske Associates, Inc., Conn., USA).

7) Determinación de ácido úrico. (Kageyama, 1971).

El ácido úrico sérico, en presencia de uricasa, se oxida a allantoina y  $H_2O_2$ . Esta, en presencia de catalasa, produce la oxidación de metanol a formaldehído, el que reacciona con 2-acetilacetona para formar 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina. El producto se mide espectrofotométricamente.

- 8) Determinación de calcio. Método de espectrofotometría por absorción atómica.

Se empleó un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin - Elmer, modelo 303 (Perkin-Elmer, Alemania).

- 9) Determinación de fosfato inorgánico. Método de Fiske y Subbarow (1925).

Se desproteíniza el plasma con ácido tricloroacético, se filtra y, a una alícuota del filtrado, se le agrega reactivo de molibdato de amonio. Este reacciona con el fosfato para formar fosfomolibdato amónico. El agregado de un agente reductor suave (ácido aminonaftolsulfónico) produce color azul de heteropolimolibdeno, que se mide espectrofotométricamente.

- 10) Determinación de péptidos y proteínas.

- a) Método de Lowry et al. (1961).

Se basa en dos reacciones: 1) una interacción inicial de la proteína y los  $\text{Cu}^{2+}$  en medio alcalino (relacionada con la reacción del biuret) y 2) una reducción de los ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico a azul de tungsteno y de molibdeno, respectivamente, debida a la acción del complejo Cu-proteína. El producto final se mide espectrofotométricamente.



b) Determinación espectrofluorométrica. (Udenfriend et al., 1972; Nakamura et al., 1976; Lai, 1977).

A 0,2 ml de muestra (conteniendo 0,2-5 nmol de péptidos) se le agrega 1 ml de solución reguladora de borato 0,5 mol/l, de pH 8,5. Se agrega a la mezcla 0,15 ml de solución de fluorescamina (20 mg/100 ml de acetona anhidra) con agitación vigorosa. Se mide la fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 390 nm y una de emisión de 475 nm.

Se empleó un espectrofotofluorómetro Aminco Bowman (American Instrument Co., Silverspring, M.D., USA).

Los resultados obtenidos con ambas técnicas se refieren a la curva de calibración con albúmina bovina.

#### 11) Estudios hematológicos.

- a) Volumen globular: macrohematocrito según Wintrobe, empleando EDTA disódico como anticoagulante.
- b) Recuento de leucocitos: en cámara de Neubauer, utilizando ácido acético-violeta de genciana como líquido diluyente.
- c) Recuento diferencial de leucocitos: observación microscópica de frotis de sangre capilar teñidos con colorante de

May Grünwald-Giemsa.

- 12) Determinación de aminoácidos totales. Método de Kachadurian et al.(1960), modificado por Siest et al.(1961).

A las muestras, desproteinizadas con ácido tungstico y en un medio con solución reguladora de EDTA (pH:3,7), se les agrega reactivo de ninhidrina en etilenglicol. Los grupos amino libres reaccionan con la ninhidrina para formar amoníaco e hidrindantina. Estos dos productos reaccionan con más ninhidrina produciendo un compuesto coloreado que se mide espectrofotométricamente.

- 13) Fraccionamiento de aminoácidos y péptidos. Técnica de electroforesis por alto voltaje (EAV). (Nesse et al.,1971).

Se emplearon las siguientes condiciones:

Soporte: papel de filtro SS 2043 b (Carl Schleicher & Schull, Dassel, Alemania), de 20 x 46 cm.

Siembra: 50-200 µl de muestra desproteinizada, cuando fue necesario, con ácido pícrico.

Electroforesis:

Solución reguladora: ácido fórmico 0,75 mol/l - ácido acético 1 mol/l (1:1, v/v); pH = 2.

Sistema de refrigeración: solvente Stoddard (Shell) o Var -

sol (Esso), refrigerado a 2-4°C.

Intensidad de corriente: 20-30 mA. Se empleó una fuente de alta tensión con voltaje variable de 0-2 000 volts (Vefben, Argentina).

Duración de la corrida: 50 min.

Reactivo de revelado: ninhidrina 0,25% (p/v) en metanol: colidina (95:5, v/v).

Desarrollo de color: 20 min a 100°C. Se utilizó una estufa de esterilización F.B.R. (Fernández, Berlusconi y Rocca, Argentina).

Reactivo de perpetuación: 2,45 g de  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  en  $\text{HNO}_3$  10%: $\text{H}_2\text{O}$ :metanol (0,2:4:95, v/v/v).

Reactivos de coloración específica:

- a) Histidina: reactivo de Pauly (ácido sulfanílico,  $\text{NaNO}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Coloración roja. (Merck-Darmstadt).
- b) Aminoácidos sulfurados:
  - i) Reactivo de ioduro de potasio y cloruro de platino. Todos los aminoácidos sulfurados producen manchas blancas sobre un fondo púrpura. (Nesse et al., 1971).
  - ii) Reactivo de nitroprusiato de sodio y cianuro de sodio. Los aminoácidos que poseen grupos tioles y disulfuros aparecen de color rojo. (Nesse et al., 1971).
- c) Urea y derivados del triptofano. Reactivo de Ehrlich (p-

dimetilaminobenzaldenído en medio ácido). Coloración amarilla. (Merck-Darmstadt)

- d) Compuestos fosforados. Se emplea el siguiente reactivo: 1 g de molibdato de amonio en  $H_2O:HCl \text{ conc.:}HClO_4:acetona$  (8:3:3:86, v/v/v/v). Se revela por vaporización, se calienta a  $80^\circ C$  durante 3 min y se irradia con luz UV. Coloración celeste.

14) Hidrólisis de péptidos

Se hidrolizaron los ultrafiltrados con PM entre 500 y 10000 g/mol, con HCl 6 N a  $100^\circ C$ . Se probó el grado de hidrólisis después de diferentes tiempos -2, 5, 8, 12 y 24 h- comprobándose que a las 12 h la hidrólisis ya se había completado. Ese tiempo se empleó para el resto de los procedimientos. Posteriormente, se lavaron los residuos hidrolizados con solución de  $NaCO_3H$  20 mmol/l y con agua destilada hasta pH neutro, evaporando al vacío en cada etapa.

15) Separación de péptidos. Técnica de electroforesis en disco con gel de poliacrilamida, según técnica de Ornstein.

Procedimiento: (Castagnino, 1968)

Preparación del gel: para preparar 6 discos de poliacrilamida al 15% se empleó la mezcla siguiente:

-8 ml de solución reguladora Lower TRIS (36,3 g de TRIS, 48 ml de HCl 1N, llevados a 100 ml con agua destilada; pH:8,8)

-16 ml de solución de acrilamida-bis-acrilamida (30 g de acrilamida, 0,8 g de bis-acrilamida llevados a 100 ml con agua destilada)

-8 ml de solución de persulfato de amonio (10% p/v), recién preparada

-0,015 ml de TEMED

Siembra: 50-100  $\mu$ l de muestra, por cada tubo, mezclados con una gota de azul de bromofenol 5% (p/v) y una gota de glicerina.

Condiciones de la electroforesis:

Solución reguladora: TRIS-glicina; pH:8,5 (28,8 g de glicina, 6 g de TRIS, llevados a 1000 ml con agua destilada). Antes de usar se diluye 1:2.

Intensidad de corriente: 4 mA/tubo. Voltaje: 100 V. Se empleó una fuente de poder Chemar modelo CHF-I-3 (Chemar, Argentina).

Tiempo de corrida: 5 h.

Revelado: azul de Coomasie R-250 (0,05% p/v, en metanol:ácido acético:H<sub>2</sub>O, 48:9:43, v/v/v). Tiempo de coloración: 1 h.

Decoloración: sucesivos lavados con solución acuosa de ácido acético 7% (v/v).

16) Separación de nucleótidos. Técnica cromatográfica de Wyatt.

Se emplearon las siguientes condiciones:

Soporte: tiras de papel de filtro Whatman N° 1, de 11,5 x 46 cm.

Preparación de la muestra: hidrólisis ácida con HCl 2 N en baño de agua a 100°C a reflujo durante 3 h. Tres lavados de los residuos con agua destilada y evaporación a sequedad en vacío después de cada etapa.

Siembra: siembra de todo el residuo seco disuelto en el menor volumen de agua destilada, a 5 cm del borde inferior, dejando 3 cm entre cada muestra.

Solvente de desarrollo: isopropanol:HCl conc.:H<sub>2</sub>O (170:41:39, v/v/v).

Desarrollo de la cromatografía: 17 h a temperatura ambiente (20-25°C). Secado en estufa a 50°C.

Detección: observación de compuestos fluorescentes a 254 nm.

17) Ensayos cualitativos para diversos grupos químicos.

Ensayos de toque sobre papel de filtro.

a) Aminoácidos y péptidos. (Nesse et al., 1971).

Se utiliza reactivo de ninhidrina 0,25% (p/v) en metanol con el cual se vaporizan las muestras sembradas en papel. El color desarrolla por calentamiento a 100°C.

b) Monosacáridos y alcoholes de monosacáridos. (Stahl,1969).

Se emplean los siguientes reactivos:

- i)  $\text{NaIO}_4$  0,1% (p/v)
- ii) 2,8 g de bencidina y 1,5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1N en etanol: $\text{H}_2\text{O}$ : acetona (80:70;30, v/v/v)

Se vaporizan las muestras, sembradas sobre el papel, con los reactivos i) e ii), sucesivamente.

c) Mucopolisacáridos. (Block et al.,1958).

Se sumerge el papel, con las muestras sembradas, en una solución de azul de toluidina 0,125% (p/v).

d) Sustancias reductoras. (Block et al.,1958).

- 1) Se vaporiza el papel, con las muestras sembradas, con una mezcla de volúmenes iguales de  $\text{AgNO}_3$  0,1 N y  $\text{NH}_4\text{OH}$  5 N. El desarrollo de color se lleva a cabo durante 5-10 min a 105°C.
- 2) El reactivo es una solución de ácido 3,5-dinitrobenzoico 1% (p/v) en  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2 N. Se vaporiza el papel con las muestras sembradas; el color desarrolla a 100°C durante 5-10 min.

e) Desoxi-azúcares y glicoles. (Stahl,1969).

Las muestras, sembradas sobre el papel, son vaporizadas con una solución acuosa de  $\text{HIO}_4$  33% (p/v). Después de la

oxidación con periodato, se vaporiza con solución alcohólica de p-nitroanilina 1% (p/v).

- 18) Fraccionamiento de sustancias con absorbancia en UV por cromatografía líquida de alta presión (HPLC). (Senftleber et al. 1976; Assenza et al. 1980)

Se empleó un equipo para cromatografía líquida por alta presión Waters (Waters Associated, Milford, Mass., USA):

2 bombas de flujo Waters modelo 6 000 A

Inyector Waters modelo U6K

Detector de absorbancia (254/280 nm) Waters modelo 440

Columnas: a) Precolumna

b) Columna  $\mu$ Bondapak/C<sub>18</sub>, 4 mm (d.i.) x 300 mm; tamaño de partícula 10  $\mu$ m

c) Módulo de compresión radial Waters y cartuchos para compresión radial (8 x 100 mm) rellenos con micropartículas esféricas de octadecilsilano (ODS)

Control de sistema Waters modelo 730

Condiciones de la cromatografía:

Siembra: 10-50  $\mu$ l , empleando jeringas Hamilton serie 800, 801 N y 805 N.

Solventes de desarrollo:



- a) Acetato de sodio 25 mmol/l; pH : 4,5 .
- b) Gradiente cóncavo programado durante 90 min empleando solución acuosa de acetato de sodio 25 mmol/l (pH : 4,5) como eluyente inicial y ácido acético 0,1 mol/l en metanol como eluyente final. Flujo de solvente de 1,0 ml/min.
- c) Gradiente lineal empleando  $\text{KPO}_4\text{H}_2$  20 mmol/l (pH : 5,7), como eluyente inicial y una solución de metanol:H<sub>2</sub>O (3:2; v/v) como eluyente final. El gradiente lineal fue programado de 0 a 40% del eluyente final durante un período de 35 min. Flujo de solvente de 1,5 ml/min.

Temperatura de desarrollo de la cromatografía: 15-20°C.

Detección: absorbancia en UV (254 nm).

19) Detección de compuestos fluorescentes.

Después de cada fraccionamiento de sustancias sobre papel -por cromatografía o electroforesis- se investigó la presencia de compuestos fluorescentes, bajo luz UV de longitud de onda de excitación de 254 nm, empleando una lámpara UV Mineralight, onda corta, UVS-11 (Ultra-Violet Products Inc., San Gabriel, California, USA).

20) METODO CROMATOGRAFICO PARA LA SEPARACION DE FRACCIONES EN LIQUIDOS BIOLOGICOS

20.1. Estudios previos para establecer las condiciones experimentales de fraccionamiento

ELECCION DEL RELLENO Y DIMENSIONES DE LA COLUMNA PARA EL FRACCIONAMIENTO

Se emplearon columnas de vidrio de diferentes dimensiones - 1,5 x 30 cm; 1,2 x 60 cm y 2,4 x 100 cm- rellenas con Sephadex G-75 para fraccionar muestras de plasmas controles y urémicos. Con las dos primeras no se pudo obtener una buena separación de las distintas fracciones con absorbancia en UV. Con la columna de 2,4 x 100 cm se obtuvieron los resultados que se muestran en la Figura 1: a) Buena separación entre las sustancias de alto PM (que incluyen las proteínas plasmáticas) y las de PM bajo, detectadas por su absorbancia a 280 nm; b) diferencias entre los perfiles correspondientes a los sujetos controles y a los pacientes urémicos. En una etapa posterior se concentraron los eluidos correspondientes a las fracciones de BPM (suma de los eluidos de las fracciones II y III) a través de membranas Diaflo UM-05 y se recromatografiaron en columnas de Sepha-

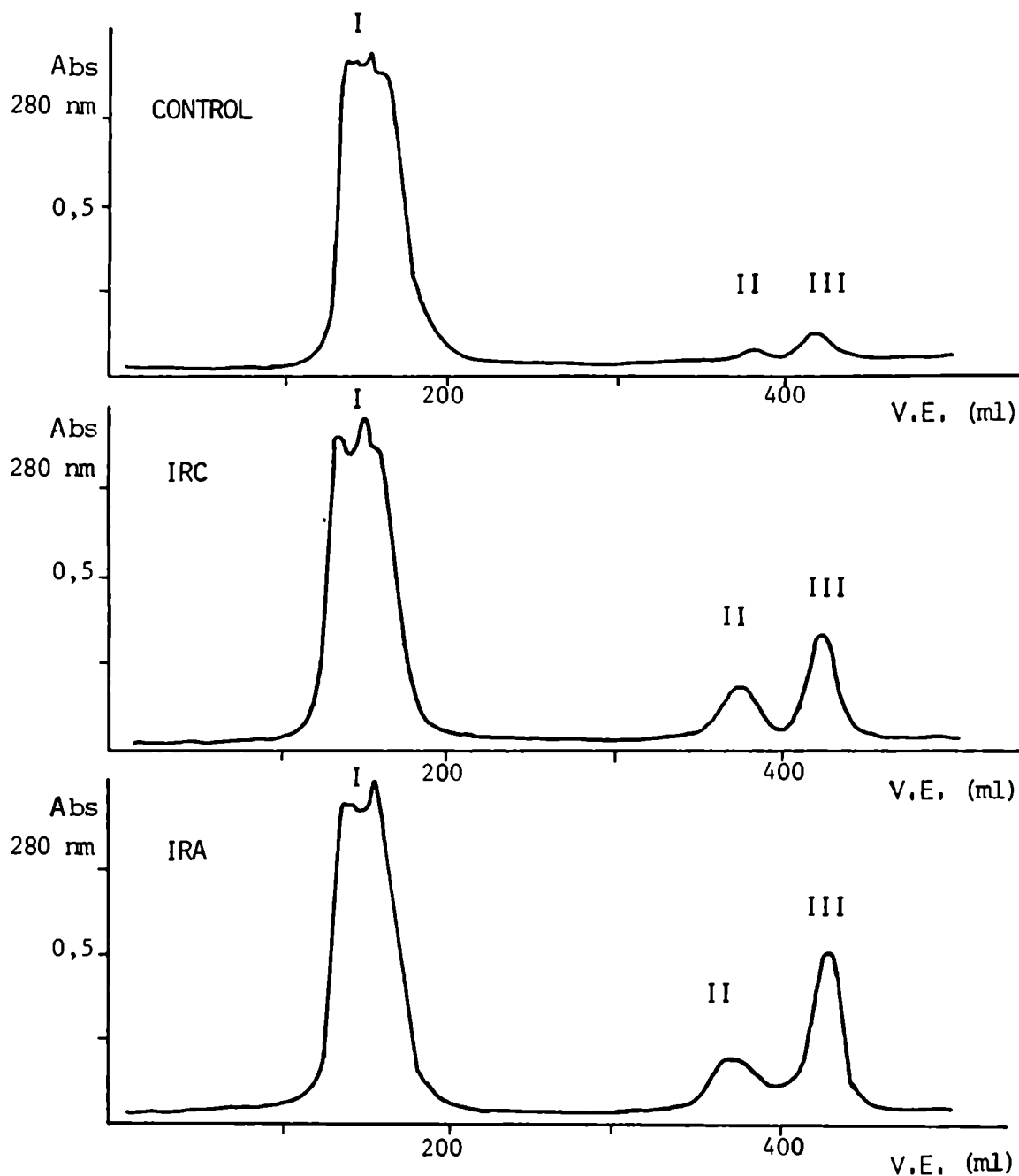


Figura 1.- Perfiles cromatográficos de sustancias con absorbancia a 280 nm, presentes en los plasmas de un sujeto control y de pacientes con IRC e IRA. Fraccionamiento: columna de Sephadex G-75; eluyente NaCl 30 mmol/l; siembra 3,5 ml de plasma.

dex G-25 o G-15, de 1 x 60 cm, completándose la secuencia que se esquematiza en la Figura 2. Se obtuvieron, por este procedimiento, perfiles correspondientes a sustancias con absorbancia en UV, cuyos PM estaban acotados entre 500 y 5 000 g/mol. Los datos de PM de las sustancias fueron calculados en base al límite de exclusión molecular de la columna de Sephadex y al tamaño de retención de las membranas UM-05.

Mediante este esquema se procesaron 8 muestras de plasma control, 10 muestras de plasma de pacientes con IRC y 3 muestras de plasma de pacientes con IRA.

Los resultados de los perfiles cromatográficos de los concentrados de la suma de las fracciones II y III se observan en la Figura 3 y muestran: a) diferencias entre los plasmas urémicos y los controles; b) similitud entre los dos tipos de patología urémica (IRC e IRA).

Se obtuvieron perfiles semejantes en la recromatografía en Sephadex G-25 y en G-15.

Los resultados de aplicar el análisis completo descrito en la Fig. 2 no fueron muy satisfactorios y el procedimiento resultó demasiado laborioso y prolongado como para ser empleado en estudios clínicos.

Se ideó, entonces, un sistema combinando ultrafiltra -

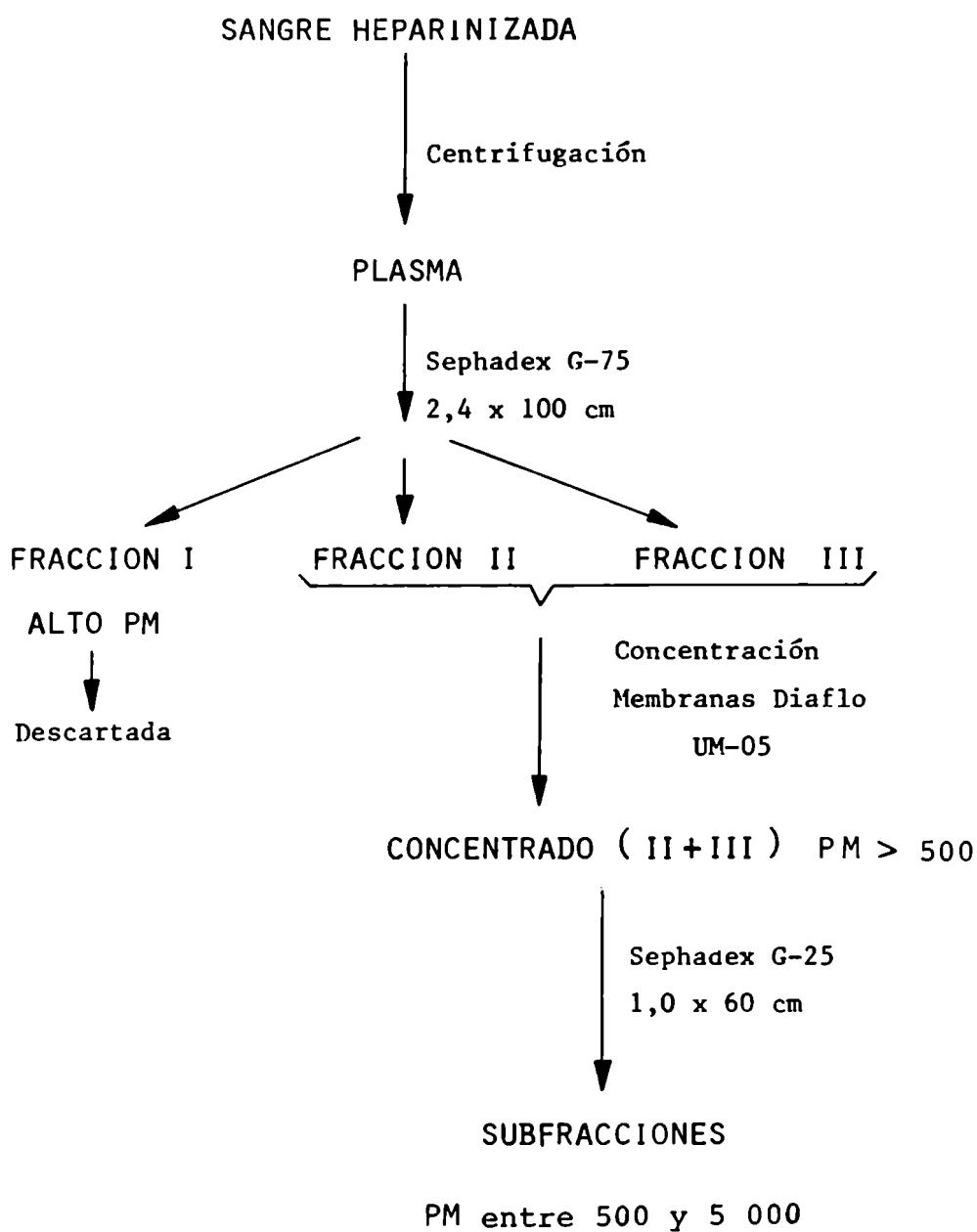


Figura 2.- Secuencia del fraccionamiento de sustancias con absorbanza en UV (280 nm) y PM entre 500 y 5 000 g/mol presentes en el plasma de sujetos controles y de pacientes urémicos.

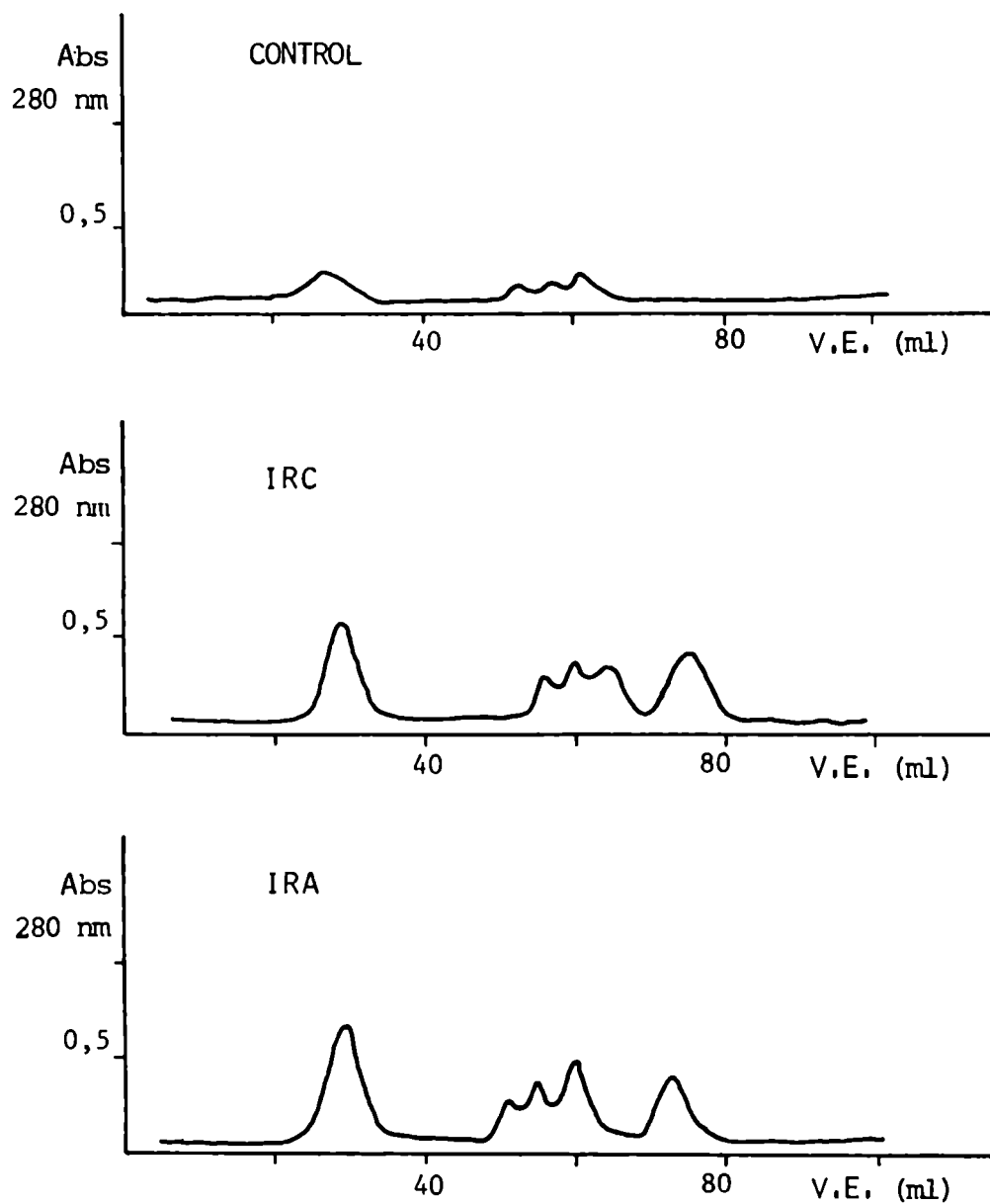


Figura 3.- Perfiles cromatográficos de los concentrados, con  $PM < 500$  g/mol, de las fracciones II + III (Fig.2) Fraccionamiento: columna de Sephadex G-25 (1 x 60 cm); eluyente NaCl 30 mmol/l; detección a 280 nm.

ción por membranas de límite de retención conocido y cromatografía de filtración por geles.

Después de probar distintos tipos de Sephadex se encontró la mejor resolución empleando dos columnas sucesivas, una con Sephadex G-25 de grado fino y la otra con Sephadex G-15 (ambas de 1 x 60 cm), sistema que se empleó en este trabajo para realizar la mayoría de los estudios (Figura 4).

En algunos casos, que se mencionan específicamente y para efectuar comparaciones con los datos obtenidos por otros autores, se empleó, para la cromatografía, una única columna con Sephadex G-15 y dimensiones de 0,9 x 100 cm.

#### ELECCION DEL TRATAMIENTO PREVIO DE LAS MUESTRAS POR ULTRAFILTRACION

Este procedimiento fue necesario para eliminar las proteínas de aquellas muestras que las contuvieran, evitando una sobrecarga de compuestos de alto PM en la columna, ya que la presencia de esas sustancias interfiere con las condiciones analíticas.

Para obtener los ultrafiltrados se emplearon celdas Amicon (Amicon Corporation Scientific Systems Division, Lexington, Mass., USA) de 12 y 50 ml de capacidad, según el volumen de muestra. El proceso se llevó a cabo con presión de

nitrógeno gaseoso a  $3,5 \text{ kg/cm}^2$  (343 kPa), a una temperatura menor de  $10^\circ\text{C}$  y con agitación constante, empleando un agitador magnético Amicon, modelo 500.

Se probaron membranas Diaflo (Amicon, USA) XM-50, PM-30 y PM-10, empleándose esta última para realizar los estudios posteriores. Se eligió la membrana que, por su límite de retención (pesos moleculares mayores de 10 000 g/mol), permitía eliminar la mayor cantidad de sustancias que, por su tamaño, no presentaban interés para ser estudiadas en este trabajo. Por eso y para uniformar el tratamiento de las muestras, todas se procesaron de la misma manera.

#### ELECCION DEL ELUYENTE

Los resultados de los perfiles cromatográficos fueron idénticos cuando se emplearon como eluyentes soluciones de Na Cl 30 mmol/l o de  $\text{NH}_4\text{CO}_3\text{H}$  20 mmol/l. Se eligió, para el trabajo, este último eluyente para evitar la presencia de una elevada concentración de  $\text{Na}^+$  en las muestras evaporadas a sequedad de los eluidos, ya que dicho ion constituiría un interferente importante en los ensayos biológicos posteriores.



#### ELECCION DE LA LONGITUD DE ONDA DE LA DETECCION

Se realizaron estudios de absorbancia de los eluidos a 230, 251, 260 y 280 nm. Se encontró un mayor número de fracciones que presentaban absorción de la luz a 251 nm y, también, mayor sensibilidad en la detección a esa longitud de onda, por lo cual se la eligió para la realización de todos los estudios.

#### 20.2. Descripción del procedimiento analítico

En base a los resultados de las experiencias previas se eligió el procedimiento analítico que se muestra en la Figura 4. Mediante el mismo, se pudieron obtener, en la IRC, las fracciones A, B, C y/o D y P que se observan en la Figura 5.

Las diferentes etapas realizadas se detallan a continuación:

#### ULTRAFILTRACION POR MEMBRANAS

Las muestras de plasma, orina, dializado peritoneal, ultrafiltrado de hemofiltración y concentrado de líquido de hemodiálisis fueron sometidas a un procedimiento de ultrafiltración a través de membranas Diaflo PM-10, con límite de retención para sustancias con PM de, aproximadamente ,

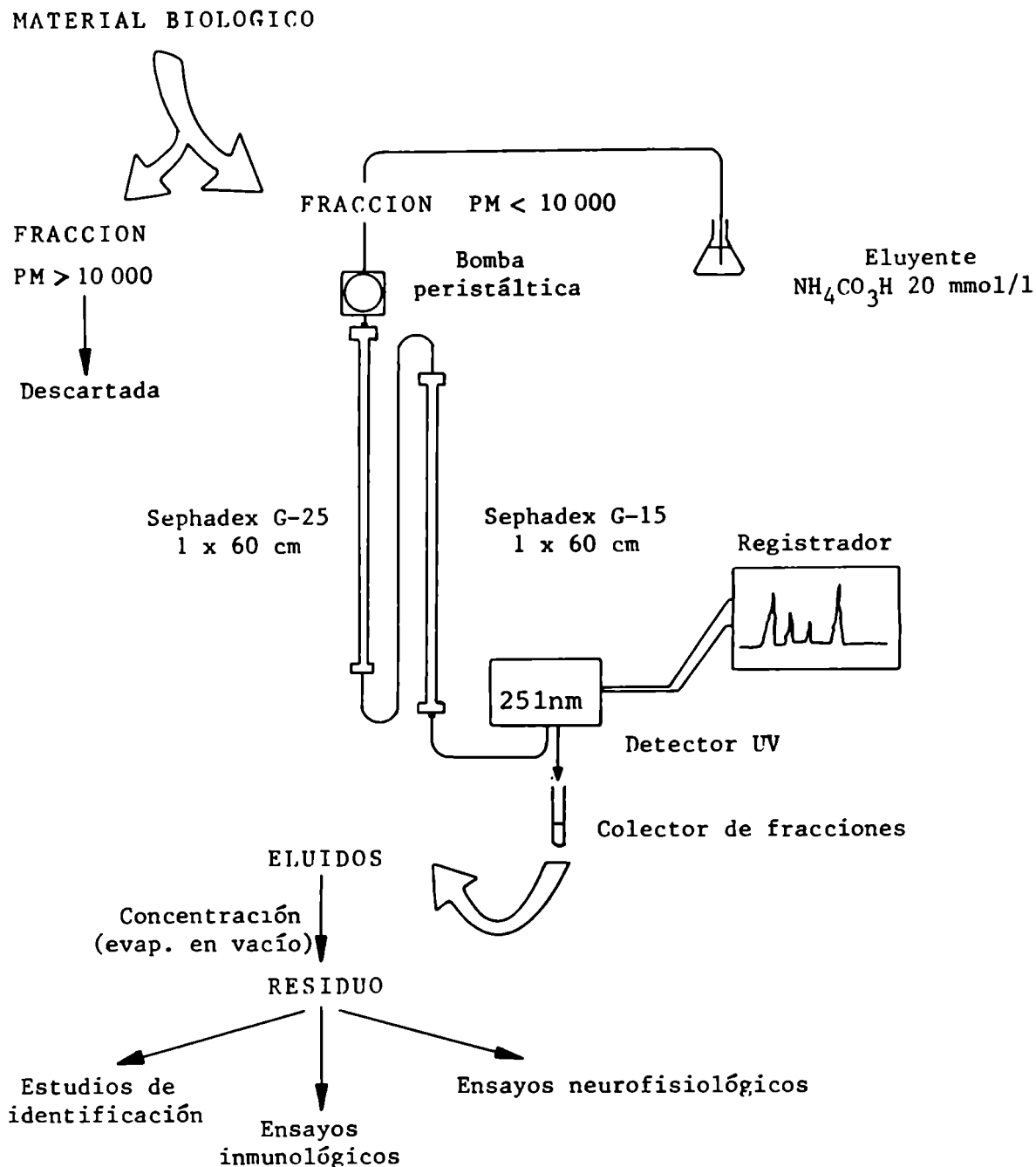


Figura 4.- Esquema del procedimiento analítico empleado para separar, detectar y estudiar sustancias con absorbancia a 251 nm y PM < 10 000 g/mol en muestras biológicas.

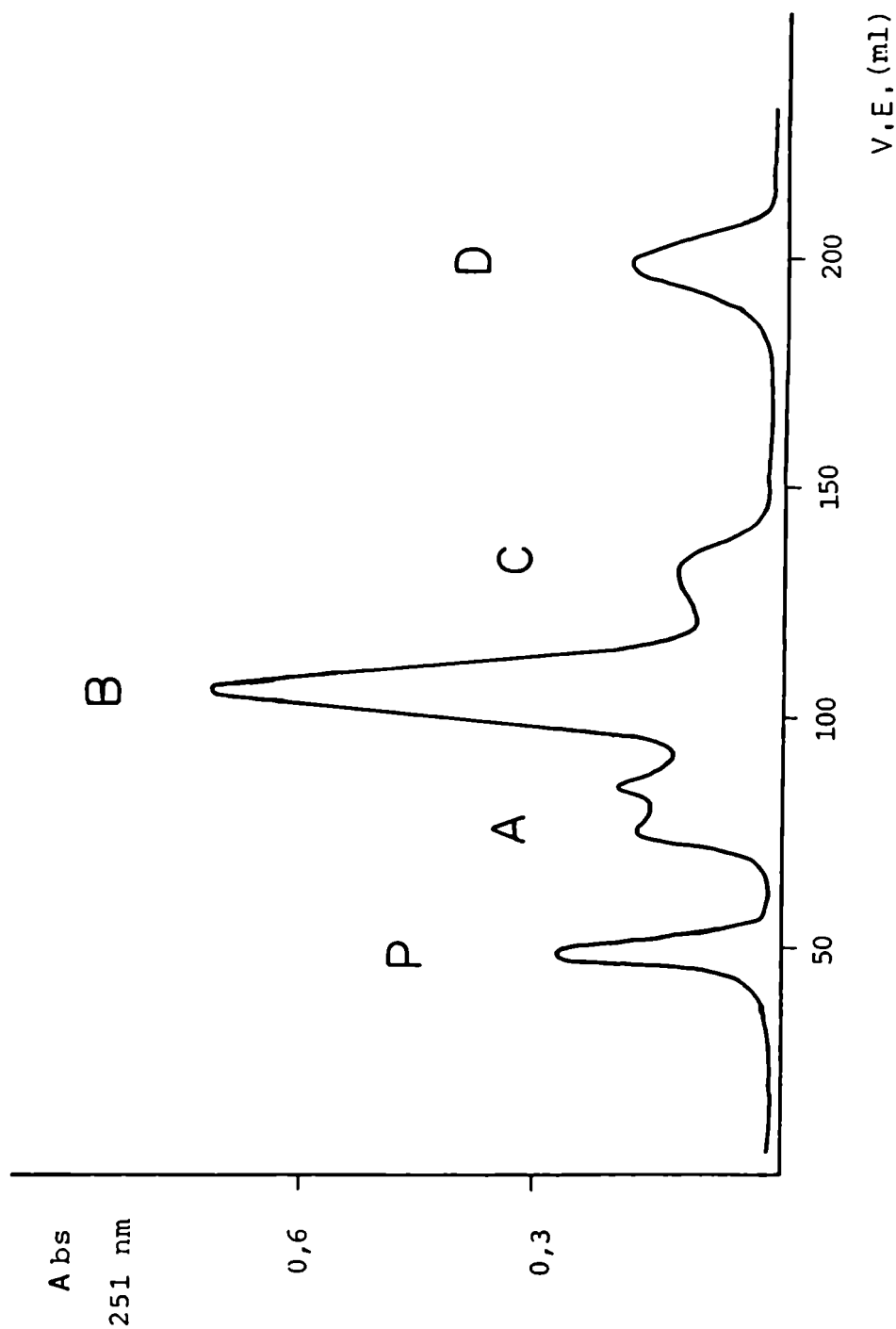


Figura 5.- Fracciones cromatográficas plasmáticas de sustancias de BMPM con absorbancia a 251 nm que pueden encontrarse en la insuficiencia renal. El fraccionamiento se realizó según el método descrito en la Fig.4.

10 000 g/mol (tamaño de poro aparente: 200 nm).

#### FILTRACION MOLECULAR

Se empleó un sistema de dos columnas de vidrio consecutivas (de 1 x 60 cm cada una) rellenas con Sephadex G-25 y G-15, respectivamente.

El menor volumen de siembra que permitió detectar sustancias con absorbancia a 251 nm resultó dependiente del tipo de muestra. Se sembró la mayor carga aceptable para el sistema cromatográfico empleado -3 a 4 ml- de aquellas muestras con baja absorción (plasmas controles) y cantidades menores -desde 1,5 ó 2 ml- de las muestras patológicas, mientras que de las muestras de orinas, tanto controles como patológicas, se sembraron volúmenes de 0,3 a 1 ml.

La elución se llevó a cabo con una solución de  $\text{NH}_4\text{CO}_3\text{H}$  20 mmol/l, de pH 9, empleando una bomba peristáltica (LKB 12 000, LKB, Suecia, o Pharmacia P-3, Pharmacia Fine Chemicals, Suecia), a una velocidad de flujo de 20 ml/h.

Los eluidos correspondientes a las sustancias separadas por la cromatografía fueron recolectados en fracciones de 2,5 ml/tubo mediante un colector de fracciones automático Ultrorack LKB 7 000 (LKB, Suecia).

Todo el proceso se realizó a una temperatura de 4-6°C

dentro de un gabinete refrigerado Combi Cold Rac LKB 5 201 (LKB, Suecia) y demandó, en total, entre 8 y 10 h.

#### DETECCION DE LAS SUSTANCIAS CON ABSORBANCIA EN UV

Las sustancias eluidas se detectaron mediante la lectura de sus absorbancias a 251 nm, empleando un Uvicord II LKB 8 300 (LKB, Suecia), con celda de cuarzo de 0,1 ml de capacidad y 3 mm de camino óptico (A-4711, LKB, Suecia). Los resultados fueron registrados simultáneamente, en forma continua, mediante un Chopper Bar Recorder LKB 6 520 (LKB, Suecia) a una velocidad de 10 cm/h, graficándose las curvas de absorbancia a 251 nm en función del tiempo o del volumen de elución.

#### SEMICUANTIFICACION

Se determinó la absorbancia a 251 nm en cada tubo del eluido empleando un espectrofotómetro Beckman DB, con celdas de cuarzo de 1 y 2,5 ml de capacidad y 10 mm de camino óptico (Beckman Instruments Inc., California, USA). Se graficaron los datos de absorbancia en función de los volúmenes de elución. Las áreas totales y las de cada una de las fracciones se determinaron por el método de pesada con una aproximación de 0,05 mg, empleando una balanza Mettler (Zu-

rich, Suiza).

Se utilizó siempre la misma escala. Los estudios de reproducibilidad se detallan más adelante.

Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias de área integrada (UAAI/l) por litro. Estas corresponden a unidades de concentración, ya que expresan medidas de peso, equivalentes a las de superficie, por unidad de volumen de muestra sembrada.

#### CARACTERIZACION DE LAS FRACCIONES

Las diferentes fracciones se caracterizaron por sus volúmenes de elución y por sus espectros de absorción en el UV (entre 230 y 320 nm) obtenidos en cada uno de los estudios.

#### PROCESAMIENTO DE LOS ELUIDOS

##### a) Concentración

Los eluidos cromatográficos correspondientes a las fracciones con absorbancia a 251 nm -en conjunto o cada una por separado, detalle que se especifica particularmente en cada estudio- fueron evaporados a sequedad en vacío a una temperatura de 37°C o menor, empleando un evaporador rotatorio F.B.R. (Fernández, Berlusconi y Rocca, Ar

gentina) y una bomba para vacío Científica Central (Argentina).

b) Reconstitución de las muestras

Se emplearon distintos disolventes según el ensayo para el que fuera a emplearse el residuo:

Estudios de Identificación de Sustancias

Se reconstituyeron en el mínimo volumen de agua destilada indispensable para lograr una disolución completa de los residuos secos.

Ensayos inmunológicos "in vitro"

Se reconstituyeron en medio de cultivo RPMI-1640 hasta el volumen original de muestra; luego, se ajustó el pH.

Ensayos neurofisiológicos "in vitro"

Se redisolviéron en solución de Ringer hasta el volumen original de la muestra. Se ajustaron pH, osmolaridad y las concentraciones de los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ .

Ensayos neurofisiológicos "in vivo"

Para inyectar en las ratas se redisolviéron, hasta su volumen original, en solución fisiológica o solución glucosada, isotónicas con el plasma. Luego, se ajustaron pH, osmolaridad y las concentraciones de los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ .

20.3. Estudios de calibración del procedimiento analítico empleado

CALIBRACION DE LA FILTRACION MOLECULAR

a) Mediante el empleo de sustancias de referencia

Todos los sistemas de filtración ensayados en los estudios preliminares fueron calibrados, para determinar el volumen de exclusión del sistema y los volúmenes de elución de sustancias de PM conocido, empleando azul dextrano ( $2 \times 10^6$  g/mol), vitamina B<sub>12</sub> (1 355 g/mol) y tirosina (183 g/mol).

El sistema de doble columna, empleado en la mayoría de los estudios del presente trabajo, fue calibrado con una serie de compuestos de PM conocido. La elución de dichas sustancias fue detectada por su absorbancia a diferentes longitudes de onda o por métodos químicos. Los resultados se muestran en la Tabla II. A partir de los datos se puede determinar el volumen de exclusión del sistema, correspondiente a 55-60 ml.

En la Figura 6 se muestra el gráfico del logaritmo de los PM de las sustancias estudiadas en función de los correspondientes volúmenes de elución en el sistema cromatográfico empleado. No se encontró correlación



Tabla II.- Volúmenes de elución de sustancias de referencia en el sistema de cromatografía en Sephadex G-25 y G-15

| SUSTANCIA                | PM<br>(g/mol)   | V.E.<br>(ml)  | DETECCION *    |
|--------------------------|-----------------|---------------|----------------|
| Azul dextrano            | $2 \times 10^6$ | $53 \pm 3,8$  | UV - Visible   |
| Inulina (polifructosan)  | $9 \times 10^3$ | $54 \pm 4,0$  | Mét. químico   |
| Vitamina B <sub>12</sub> | 1 355           | $90 \pm 6,8$  | UV - Visible   |
| Bradiquinina             | 1 061           | $91 \pm 2,2$  | UV - Mét. qco. |
| Glutation                | 614             | $69 \pm 2,1$  | UV 240 nm      |
| Leu-encefalina           | 556             | $108 \pm 5,2$ | UV - Mét. qco. |
| ATP                      | 507             | $75 \pm 3,1$  | UV 260 nm      |
| ADP                      | 427             | $98 \pm 3,6$  | UV 260 nm      |
| AMP                      | 347             | $140 \pm 2,5$ | UV 260 nm      |
| p-aminohipurato de sodio | 227             | $135 \pm 5,1$ | UV 270 nm      |
| Arginina                 | 211             | $95 \pm 3,7$  | UV 240 nm      |
| Tirosina                 | 183             | $160 \pm 2,5$ | UV 280 nm      |
| Acido úrico              | 168             | $198 \pm 3,1$ | UV 280 nm      |
| Creatinina               | 113             | $114 \pm 2,2$ | UV 250 nm      |
| Guanidina.ClH            | 96              | $268 \pm 3,6$ | UV 240 nm      |
| Urea                     | 60              | $118 \pm 4,5$ | Mét. químico   |

\* Métodos usados para la detección de cada compuesto en los eluídos cromatográficos.

Los V.E. se expresan como  $\bar{X} \pm s$ .

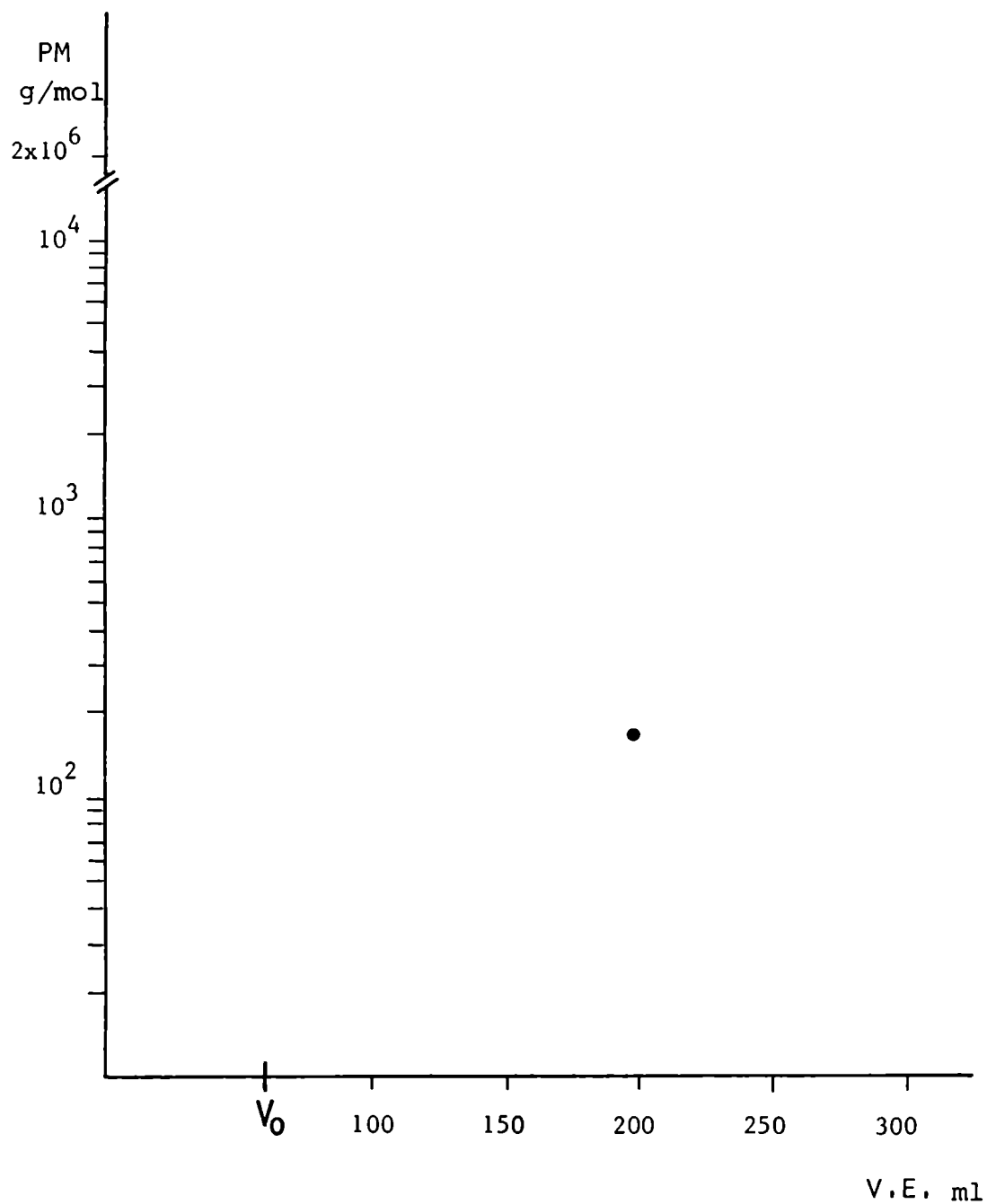


Figura 6.- Calibración del sistema de fraccionamiento.  
Logaritmo de los pesos moleculares de sustancias de referencia en función de los volúmenes de e -  
lución en el sistema cromatográfico descrito en la Fig.4.

lineal entre ambas variables. Se observa el comportamiento anómalo de algunos compuestos. Bradiquinina y, principalmente, vitamina B<sub>12</sub> son retenidas en la columna, mientras que creatinina y urea eluyen en un volumen mucho menor que el que les correspondería por su tamaño molecular.

b) Mediante el empleo de membranas selectivas

Se estudiaron 2 muestras de plasmas provenientes de sujetos controles, 5 de pacientes con insuficiencia renal (3 con IRC y 2 con IRA) y 3 de líquidos de dializado peritoneal.

Las muestras se fraccionaron mediante ultrafiltración a través de membranas Diaflo de distinto poder de retención, según el esquema presentado en la Figura 7. Las fracciones (1), (2), (3) y (4) se cromatografiaron, posteriormente, en el sistema de dos columnas de Sephadex (Figura 4) y se compararon los registros obtenidos en cada caso. En la Figura 8 (a) se presentan los cromatogramas correspondientes a las muestras de plasma de IRC (resultados coincidentes con los de los líquidos peritoneales) y en la Figura 8 (b), los de los plasmas de IRA.

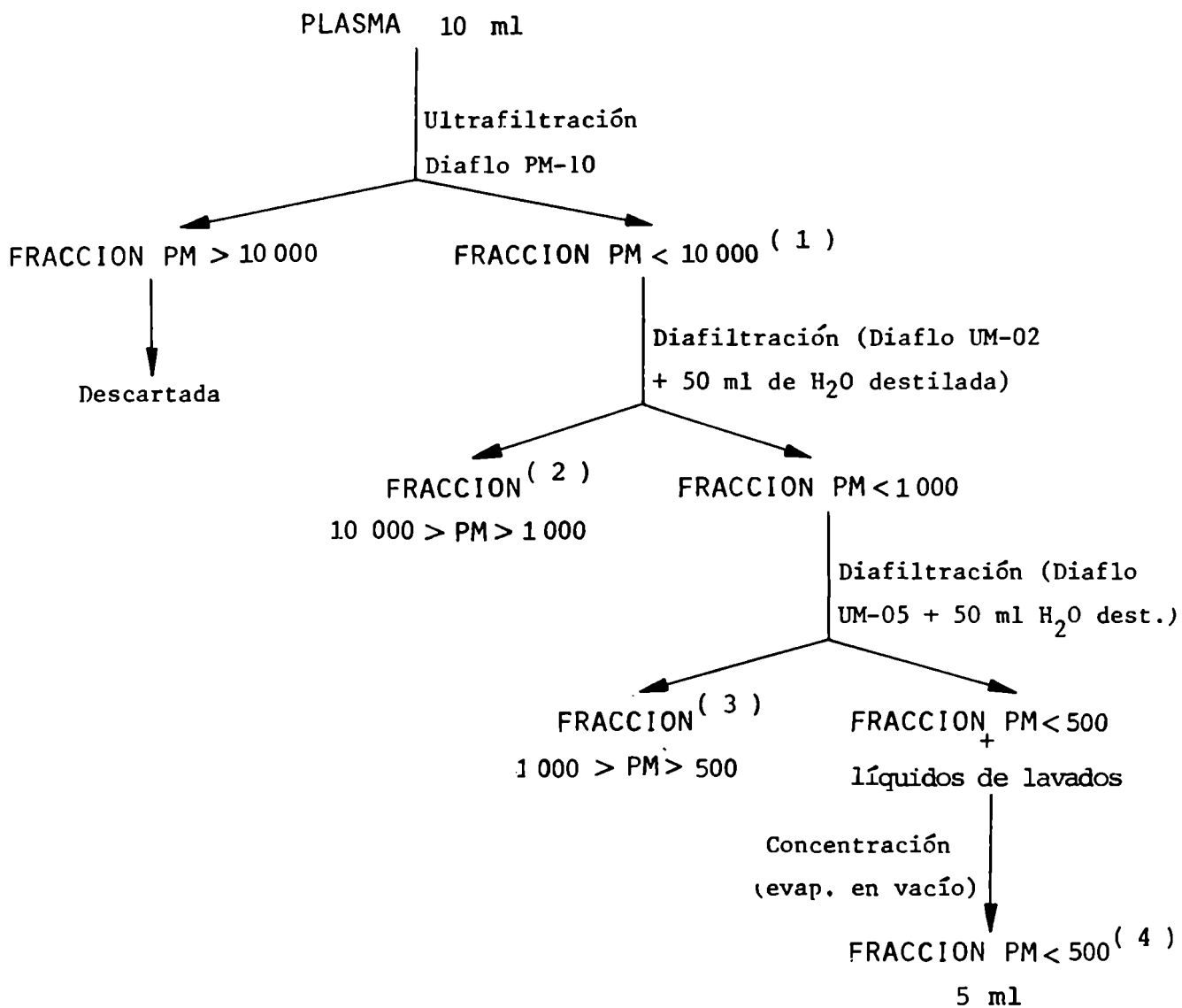


Figura 7.- Fraccionamiento de sustancias plasmáticas por ultrafiltración a través de membranas Diaflo de distinto poder de retención, mediante el cual se obtienen las fracciones (1), (2), (3) y (4), acotadas entre determinados PM.

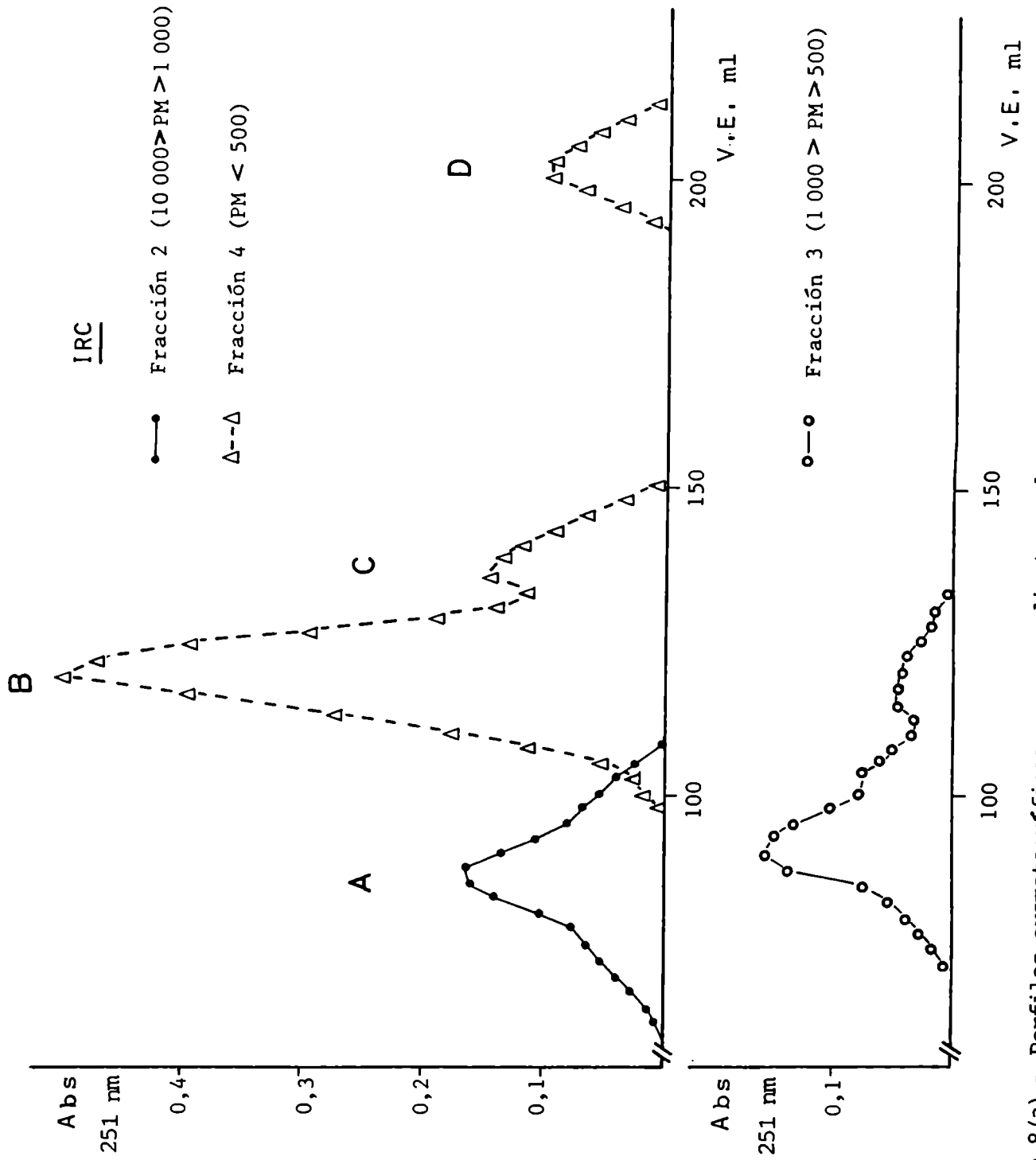


Figura 8 (a).- Perfiles cromatográficos correspondientes a las fracciones de IRC acotadas por PM.

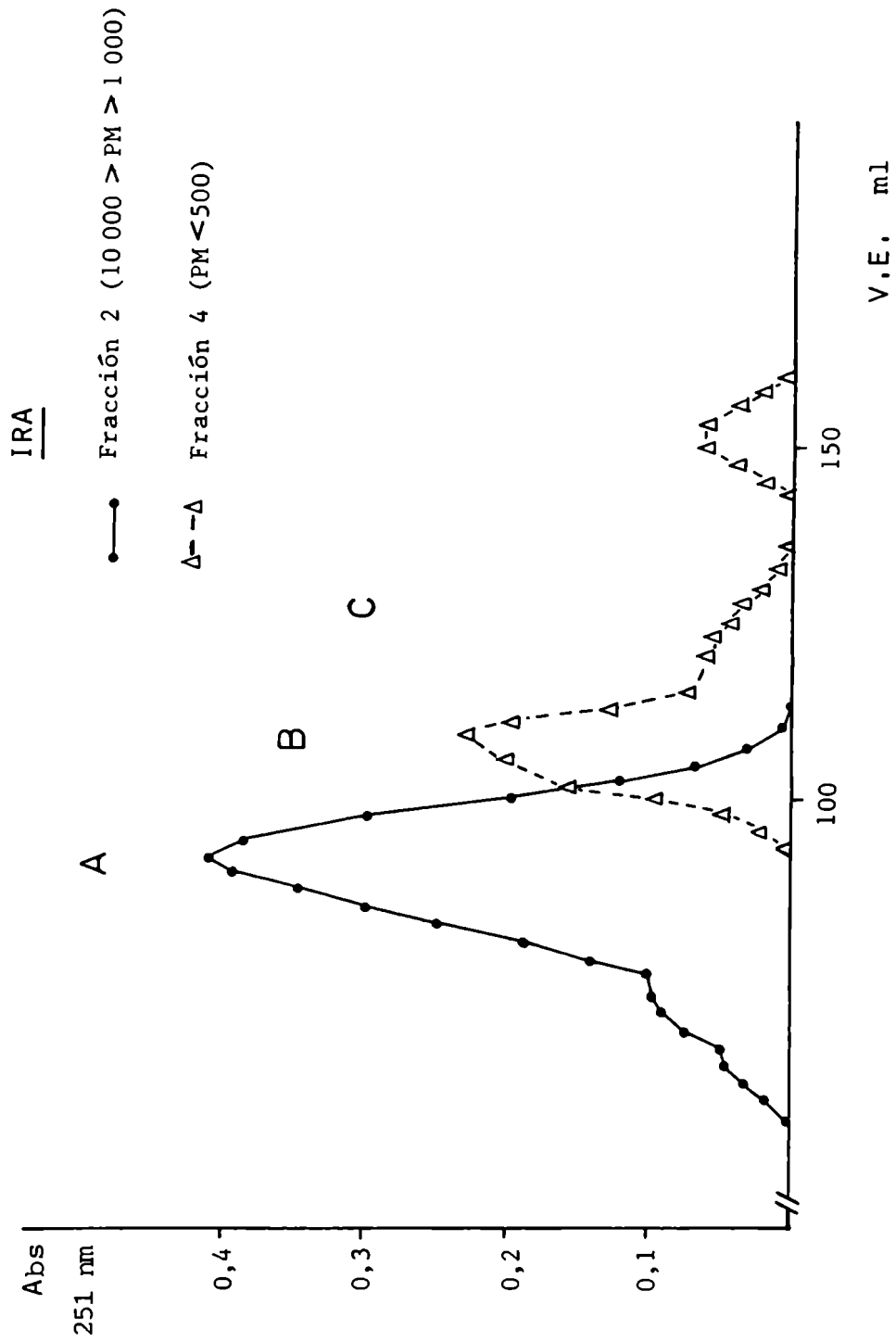


Figura 8 (b).- Perfiles cromatográficos correspondientes a las fracciones de IRA acotadas por PM.

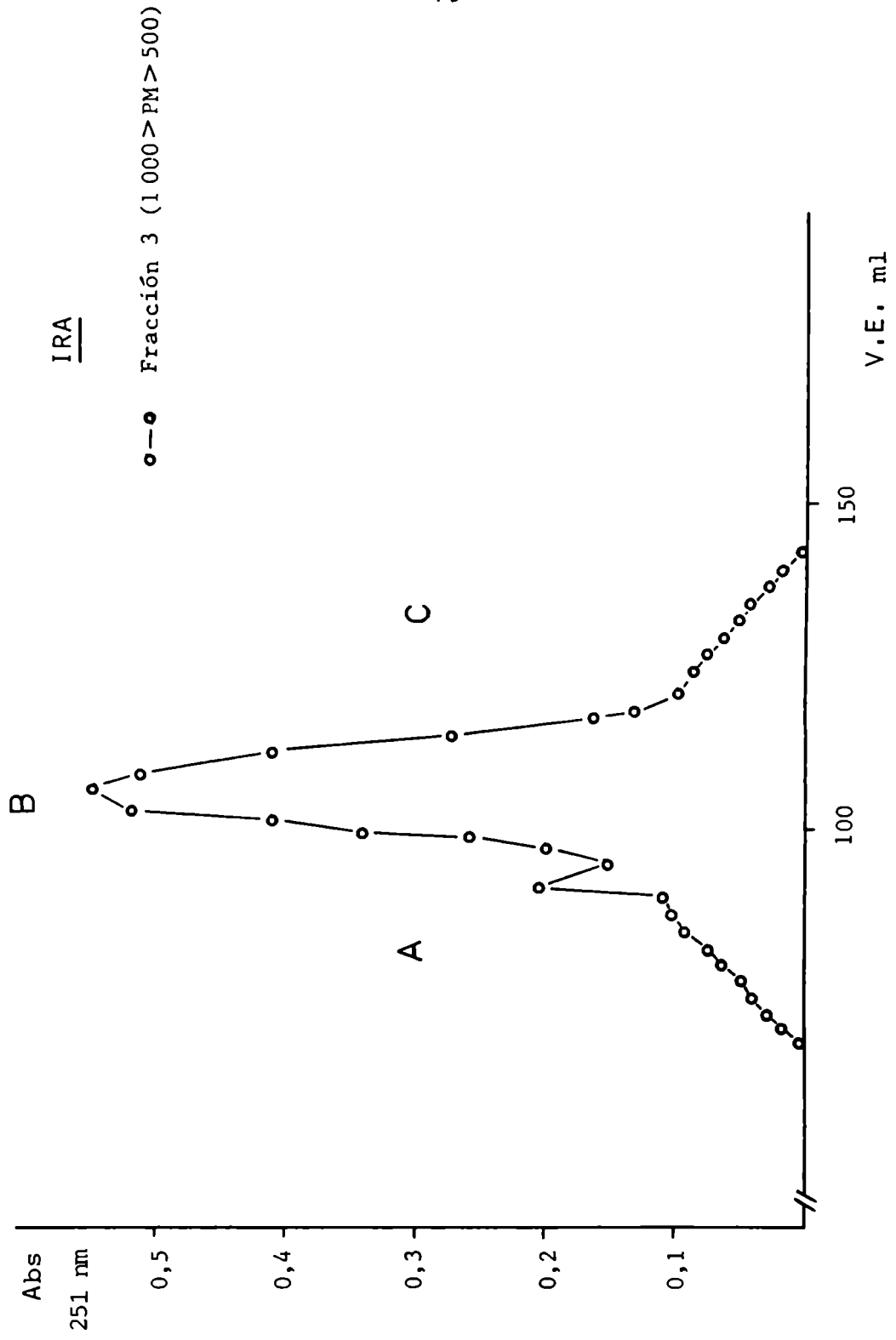


Figura 8 (b).- Continuación.

Los resultados de calibración de las fracciones cromatográficas mediante el empleo de membranas selectivas mostraron que a) las fracciones que se obtienen al separar sustancias con PM mayores de 1 000 g/mol no se superponen, en el diagrama cromatográfico, con las correspondientes a PM menores de 500 g/mol; b) las fracciones, cuyos PM se encuentran comprendidos entre 500 y 1 000 g/mol se superponen, en parte con las de mayor y, en parte, con las de menor PM.

La diafiltración de las fracciones se realizó con 50 ml de H<sub>2</sub>O destilada o de solución reguladora de NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub>H de pH 10, debido a que las membranas Diaflo UM-05 no son inertes; parecen tener diferente capacidad de retención a distintos pH. Los resultados con ambos procedimientos no mostraron diferencias, lo que implicaría que, con cualquiera de las dos condiciones de pH, la membrana UM-05 presenta su mínimo poder de retención para especies iónicas de BPM.

#### REPRODUCIBILIDAD DE LOS VOLUMENES DE ELUCION

Se realizaron 10 fraccionamientos cromatográficos de una misma muestra de mezcla de plasmas correspondientes a pacientes con insuficiencia renal. En todos los casos se



mantuvieron constantes los volúmenes de siembra y todas las condiciones de la separación. Se utilizó el mismo sistema de fraccionamiento (Fig.4) empleado en casi todos los estudios presentados en el trabajo.

Los resultados se presentan en la Tabla III. Las desviaciones de los volúmenes de elución con respecto a su valor medio, para cada fracción, fueron calculadas mediante la siguiente fórmula:

$$s_d = \sqrt{\frac{\sum (d - \bar{d})^2}{n - 1}}, \text{ siendo } d = (X_i - \bar{X})$$

El coeficiente de variación se determinó como porcentaje del valor medio:

$$\text{Coeficiente de variación \%} = \frac{s_d}{\bar{X}} \times 100$$

Los coeficientes de variación de los volúmenes de elución fueron menores del 4% para todas las fracciones.

#### DETERMINACION DE LA VALIDEZ DEL METODO DE SEMICUANTIFICACION

##### a) Estandarización de los gráficos para la integración por pesada

Se determinó la relación peso/área para cada partida

de papel milimetrado empleado para graficar e integrar los cromatogramas. Fueron descartados aquéllos que diferían en  $\pm 5\%$  respecto del peso promedio por unidad de área del papel empleado al comienzo del trabajo. Además, se utilizó siempre la misma escala.

b) Reproducibilidad de las áreas

Se realizaron 10 fraccionamientos cromatográficos de una misma muestra de mezcla de plasmas correspondientes a pacientes con insuficiencia renal. En todos los casos se mantuvieron constantes los volúmenes de siembra y todas las condiciones de la separación. Se utilizó el mismo sistema de fraccionamiento (Fig.4) empleado en casi todos los estudios presentados en el trabajo.

Se determinaron las áreas correspondientes a las sustancias de BMPM totales y a cada una de sus fracciones mediante el método de integración por pesada. Los resultados se presentan en la Tabla IV.

Para calcular los coeficientes de variación porcentual se empleó el mismo cálculo que para estudiar la reproducibilidad de los volúmenes de elución.

Los coeficientes de variación fueron, aproximadamente, iguales o menores de 10%.

Tabla III.- Reproducibilidad de los volúmenes de elución de los diferentes picos obtenidos por cromatografía de filtración en gel

|                                      | FRACCIONES |       |       |
|--------------------------------------|------------|-------|-------|
|                                      | A          | B     | C     |
| N° de observaciones                  | 10         | 10    | 10    |
| Volúmenes de elución: $\bar{X}$ (ml) | 92,8       | 115,5 | 137,0 |
| $S_d$                                | 1,84       | 1,81  | 5,03  |
| Coef. de variación %                 | 1,98       | 1,56  | 3,67  |

Tabla IV.- Reproducibilidad de las áreas integradas de las diferentes fracciones obtenidas por cromatografía de filtración en gel

|                                    | BMPM    | FRACCIONES |      |      |
|------------------------------------|---------|------------|------|------|
|                                    | totales | A          | B    | C    |
| N° de observaciones                | 10      | 10         | 10   | 10   |
| Area integrada: $\bar{X}$ (UAAI/l) | 191     | 44         | 134  | 13   |
| $S_d$                              | 16,2    | 9,6        | 11,7 | 2,5  |
| Coef. de variación %               | 3,6     | 10,4       | 4,5  | 10,4 |

c) Proporcionalidad entre las áreas y los volúmenes de muestra sembrada

Se realizaron fraccionamientos cromatográficos de una misma muestra de mezcla de plasmas de pacientes con IRC. Se estudiaron, por triplicado, diferentes volúmenes de siembra de la muestra, manteniéndose constantes todas las demás condiciones. Se utilizó siempre el sistema de fraccionamiento descrito en la Fig.4.

Se semicuantificaron las sustancias de BMPM totales y las distintas fracciones por integración de las áreas por pesada. La Figura 9 muestra los resultados obtenidos. Se observa que, para las cantidades de muestra sembradas, el área integrada es función de la concentración, tanto para las sustancias de BMPM totales como para cada una de las fracciones A, B y C. El mayor valor de áreas arbitrarias integradas de esta figura supera a todas las obtenidas con cualquiera de las muestras procesadas en el desarrollo de este trabajo.

CONSERVACION DE LAS MUESTRAS

Con una mezcla de plasmas controles y otra mezcla de plasmas de pacientes con IRC se realizaron fraccionamientos seriados a lo largo de varios meses para determinar

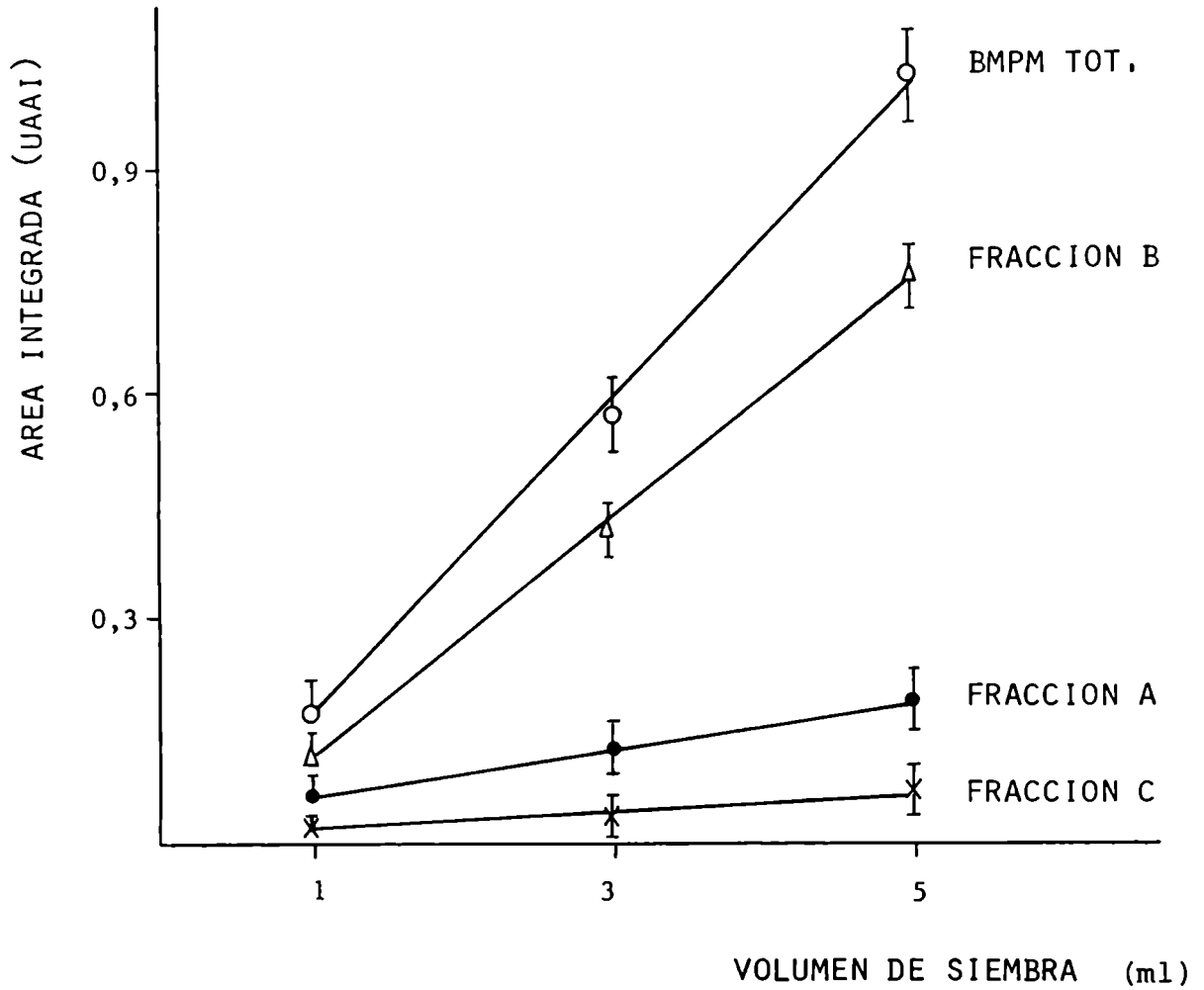


Figura 9.- Proporcionalidad entre las áreas integradas y los volúmenes de muestra sembrados. Se representan los valores promedios de ensayos triplicados y una desviación estándar.

posibles modificaciones en la composición y/o la concentración de las sustancias con absorbancia en UV, que podrían ser provocadas por el almacenamiento prolongado de las muestras congeladas.

Los resultados se presentan en la Tabla V. Para calcular los coeficientes de variación porcentual se empleó el mismo cálculo que para estudiar la reproducibilidad de los volúmenes de elución.

Si bien se observan diferencias en las determinaciones, los coeficientes de variación son aproximadamente iguales o menores de 10%.

No se observa una tendencia decreciente en las concentraciones de sustancias de BMPM ni de sus fracciones a lo largo del tiempo; por lo tanto, se podría deducir que no se produce pérdida o descomposición del material debido a la conservación de las muestras congeladas por un lapso de, al menos, un año.

En base a los resultados precedentes, las muestras de plasmas heparinizados, los líquidos de dializados o sus ultrafiltrados a través de membranas Diaflo PM-10 y las muestras de orinas, filtradas inmediatamente después de la recolección a través de membranas Millipore (0,22  $\mu$  de diámetro), se guardaron congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de ser procesadas.

Tabla V.- Efectos de la conservación de las muestras sobre los fraccionamientos cromatográficos

Mezcla de plasmas controles

| Fecha del fraccionamiento | Area Integrada (UAAI/l) |  |
|---------------------------|-------------------------|--|
|                           | BMPM totales            |  |
| 6- 6-79                   | 11                      |  |
| 7- 7-79                   | 8                       |  |
| 10-10-79                  | 8                       |  |
| 25- 3-80                  | 11                      |  |
| 10- 5-80                  | 12                      |  |
| Coef. de variación %      | 5,5                     |  |

Mezcla de plasmas de IRC

| Fecha del fraccionamiento | Area Integrada (UAAI/l) |            |      |      |
|---------------------------|-------------------------|------------|------|------|
|                           | BMPM<br>totales         | FRACCIONES |      |      |
|                           |                         | A          | B    | C    |
| 20-3-78                   | 155                     | 23         | 96   | 36   |
| 30-4-78                   | 151                     | 18         | 111  | 30   |
| 6-8-78                    | 162                     | 30         | 93   | 39   |
| 20-4-79                   | 150                     | 25         | 88   | 36   |
| Coef. de variación %      | 1,9                     | 11,0       | 10,2 | 10,7 |

20.4. Muestras empleadas para la determinación de perfiles cromatográficos

20.4.1. SUJETOS NO UREMICOS

a) Controles

Sujetos sin signos de enfermedad actual y sin antecedentes de haber padecido alteraciones renales.

Plasma: n = 20; 9 hombres, 11 mujeres

Edad: entre 20 y 50 años

Orina: n = 6

Ninguno había ingerido medicamentos en los 3 días previos a la toma de muestra.

b) Pacientes con enfermedades severas sin compromiso renal

Plasma: n = 11; 6 hombres, 5 mujeres

Algunos pacientes mantuvieron la medicación durante la prueba.

Fueron elegidos aquellos pacientes que presentaban enfermedades metabólicas y/o aquellos que mostraban algunos síntomas también presentes en la IRC:

Diabetes

2



|                              |   |
|------------------------------|---|
| Hipertensión arterial        | 3 |
| Cirrosis                     | 1 |
| Síndrome nefrótico           | 1 |
| Hiperparatiroidismo primario | 1 |
| Diabetes insípida            | 1 |
| Otros                        | 2 |

20.4.2. PACIENTES UREMICOS

a) Pacientes con IRC sin tratamiento dialítico

Edad:  $42 \pm 13,6$  (entre 18 y 72) años

Filtración glomerular:  $8,8 \pm 5,90$  (entre 2 y 30)  $\frac{\text{ml}}{\text{min}}$

Plasma: n = 43; 23 hombres, 20 mujeres

Orina: n = 11; 7 hombres, 4 mujeres

La mayoría de los pacientes ingería una dieta conteniendo 30 g de proteínas/día y medicamentos, especialmente, diversos antibióticos y diuréticos. Estas variables fueron tabuladas para cada uno de los pacientes.

b) Pacientes con IRC en tratamiento dialítico

I) Hemodiálisis

Plan de hemodiálisis: 4-5 h x 3 veces/semana

Membrana de Cuprophan,  $1 \text{ m}^2$  de superficie

Flujo sanguíneo: 350 ml/min

Flujo de dializado: 500 ml/min

Plasma pre-diálisis: n = 20; 14 hombres, 6 mujeres

Plasma post-diálisis: n = 20, íd.

Orina: n = 6

Líquido de hemodiálisis: n = 2 (Para comparar, se realizaron los estudios cromatográficos del baño de diálisis comercial empleado).

II) Hemodiálisis + Hemofiltración

Hemodiálisis convencional más ultrafiltración.

4-5 h x 3 veces/semana.

Membranas de diálisis: 2 filtros planos, de 1,36 y 1 m<sup>2</sup> de superficie y 11,5 µm de diámetro de poro.

Flujo sanguíneo: 400 ml/min

Flujo de dializado: 500-600 ml/min

Plasma pre-diálisis: n = 6

Plasma post-diálisis: n = 6, íd.

Ultrafiltrado: n = 6, íd.

III) Diálisis Peritoneal

Plasma pre-diálisis: n = 4

Plasma post-diálisis: n = 4

Líquido de dializado peritoneal: n = 2 (Como ensayo "blanco" se estudiaron, por cromatografía, los ba

ños comerciales para diálisis peritoneal, con diferentes concentraciones de dextrosa (1,5 y 4,25%).

c) Paciente trasplantado

Un paciente con IRC terminal, en tratamiento dialítico, fue trasplantado con riñón de dador vivo.

Se obtuvieron muestras de plasma y orina antes del trasplante y después, casi diariamente.

Plasma: n = 8

Orina : n = 7

d) Pacientes con IRA sin tratamiento dialítico

Plasma: n = 32; 7 hombres, 25 mujeres

Edad: 37  $\pm$  14,3 (entre 20 y 74) años

Las muestras se obtuvieron al ingresar el paciente al centro asistencial, antes de ser sometido a tratamiento dialítico.

Factores etiológicos:

|  |            |
|--|------------|
| Complicaciones obstétricas:              | Total : 18 |
| a) Abortos sépticos                      | 14         |
| b) Post parto                            | 2          |
| c) Post parto + transfusión incompatible | 1          |

|  |     |
|--|-----|
| d) Eclampsia                                       | 1   |
| Complicaciones quirúrgicas: Total                  | : 5 |
| Hombres  | 4   |
| Mujeres  | 1   |
| Síndrome de hiperviscosidad en<br>mieloma múltiple | 1   |
| Leptospirosis                                      | 1   |
| Causa no determinada                               | 4   |
| Pre-renal  | 2   |
| IRA en paciente con IRC                            | 1   |

Los últimos 3 pacientes, por poseer diferentes características, no fueron incorporados al estudio estadístico de los perfiles cromatográficos de la IRA.

e) Pacientes con IRA en tratamiento dialítico

(Hemodiálisis o diálisis peritoneal intermitente)

Plasma pre-diálisis: n = 5

Plasma post-diálisis: n = 5

Líquido de dializado peritoneal: n = 3

f) IRA en recuperación

Plasma: n = 3

Orina: n = 3

20.5. VARIABLES TABULADAS PARA EL ANÁLISIS FACTORIAL DE CORRESPONDENCIAS (A.F.C.)

Para cada paciente de los grupos con IRC y con IRA sin diálisis (n = 43 y n = 32, respectivamente) y para los sujetos controles (N = 20) se tabularon 32 variables correspondientes a las características de los pacientes, signos clínicos y estudios bioquímicos para analizar las posibles relaciones entre las mismas.

Las variables se expresan por el indicador alfabético y por el código correspondiente con el que van a ser representadas a la salida del programa.

Las variables tabuladas son las siguientes:

Edad (ED)

Sexo (SX)

Etiología de la IRA (ET)

Etiología probable de la IRC (EP)

Días de evolución de la IRA (TP)

Tiempo de evolución probable de la IRC (TM)

Tratamiento y dieta (MP)

Alteraciones neurológicas (NU)

Alteraciones óseas (OS)

Tensión arterial (HT)

Grado de anemia (AN)

Presencia de oliguria en la IRA (OL)

Datos de las determinaciones citológicas y químicas detalladas en la Tabla VIII:

Concentración plasmática de urea (UR)

Concentración plasmática de creatinina (CR)

Clearance de creatinina (CC)

Concentración plasmática de ácido úrico (AU)

Concentración plasmática de fosfato (PP)

Concentración plasmática de calcio (CA)

Concentración plasmática de sodio (NA)

Concentración plasmática de potasio (KP)

Número de leucocitos (GB)

Número de linfocitos (LF)

Concentraciones plasmáticas de las sustancias de BMPM totales (BM) y de las fracciones A (AZ), B (BZ), C (CZ), D (DR) y P (PR)

Distribución porcentual de las fracciones A (AO), B (BO) y C (CO)

Grupo al que pertenecen los individuos:

C (IR 01)

IRC (IR 02)

IRA (IR 03)

#### 20.6. Toma y procesamiento de las muestras

A continuación se detalla la forma de recolección de los distintos tipos de muestras empleadas en el presente trabajo y el procesamiento de las mismas hasta su conservación a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

a) Plasma: se obtuvo sangre heparinizada por punción venosa. Se separó el plasma por centrifugación.

b) Orina: se obtuvieron muestras de 24 h, sin conservador, mantenidas a  $2-4^{\circ}\text{C}$  durante la recolección. Después de medida la diuresis, una alícuota se filtró a través de membranas de Millipore ( $0,22\ \mu\text{m}$ ).

c) Líquido de hemodiálisis: después de 45 min de comenzada la diálisis se recolectó un volumen de dializado correspondiente a 15 min. Del total obtenido (se midió el volumen) se tomó una alícuota que se concentró por evaporación en vacío.

d) Ultrafiltrado de hemofiltración: dentro de la primera hora de hemodiálisis convencional se realiza una ultrafiltración en seco durante 10 min. Se recolectó el ultrafiltrado total, se midió el volumen y una alícuota se separó para ser procesada igual que el plasma.

e) Líquido de diálisis peritoneal: se tomó una alícuota del líquido extraído de la cavidad peritoneal después de la diálisis. Cuando fue necesario, se concentró por evaporación en vacío. Se procesó en la misma forma que el plasma.

20.7. Procedimiento cromatográfico para la separación de fracciones eritrocíticas

Para comparar con publicaciones anteriores, los perfiles cromatográficos de las sustancias de BMPM presentes en los eritrocitos se obtuvieron con una única columna de vidrio de 0,9x100 cm, rellena con Sephadex G-15, con un volumen total de 75 ml.

Se obtuvo sangre heparinizada por punción venosa. Se separaron los glóbulos rojos, después de centrifugar. Se lavaron con solución fisiológica (NaCl 0,9%, p/v) hasta la obtención de un sobrenadante límpido. Se hemolizaron por congelamiento a -20°C y descongelamientos repetidos. El hemolizado se centrifugó y se descartó el sedimento.

Las muestras hemolizadas se ultrafiltraron a través de membranas Diaflo PM-10 (PM de retención >10 000 g/mol).

La elución cromatográfica se llevó a cabo con solución



de  $\text{NH}_4\text{CO}_3\text{H}$  20 mmol/l, con una velocidad de elución de 8 - 10 ml/h. Se recolectaron fracciones de 1,2 ml/tubo y se registró la presencia de sustancias con absorbancia a 251 nm.

Se empleó el mismo instrumental LKB y Pharmacia utilizado para la cromatografía con dos columnas (Fig.4).

Se obtuvieron los perfiles cromatográficos de ultrafiltrados ( $\text{PM} < 10\,000$  g/mol) de plasma control ( $n = 2$ ), de plasma de IRC terminal ( $n = 2$ ), de lisados de eritrocitos controles ( $n = 8$ ) y de lisados de eritrocitos de IRC terminal con anemia severa, con valor promedio de volumen globular de  $20 \pm 8,1 \%$  ( $n = 8$ ).

## 21) TECNICAS PARA ESTUDIAR LA RESPUESTA LINFOPROLIFERATIVA

Cultivo mixto de linfocitos (MLC) y cultivo de linfocitos estimulado por fitohemoaglutinina (PHA)

Técnica de O'Leary et al. (1977)

### 21.1. Reactivos

#### a) Medio de cultivo

RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640) suplementado con l-glutamina (2 mmol/l), penicilina (50 UI/ml) y estreptomycinina (50  $\mu\text{g/ml}$ ).

b) Mezcla de Ficoll-Hypaque (Boyum, 1966)

Se mezcla la solución acuosa de Ficoll 9% (p/v) con la de Hypaque 33,9% (p/v, disuelto en H<sub>2</sub>O a 56°C) en una proporción 2,4 : 1 (v/v). Se ajusta la densidad a 1 075 - 1 076 g/ml. Se esteriliza por filtración.

c) Suero humano AB

Se obtiene suero humano de donadores sanos, no transfundidos, de grupo sanguíneo AB. Antes de usar se inactiva por calentamiento a 56°C durante 30 min. Se esteriliza por filtración.

Se emplea en una concentración final de 20% (v/v)(en el MLC).

d) Líquido de Turk

Se emplea para el recuento de linfocitos.

Se agregan 0,3 ml de azul de metileno 1% (p/v) a 100 ml de una solución acuosa de ácido acético 3% (v/v).

e) Azul tripan

Solución acuosa de azul tripan 0,14% (p/v).

f) Solución reguladora de fosfato (PBS)

NaPO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> 0,01 mol/l; NaCl 0,15 mol/l; pH = 7,2

g) Fitoheмоaglutinina (PHA)

PHA 0,1% (p/v) en solución reguladora de fosfato

h)  $^3\text{H}$ -timidina

Actividad específica: 2 Ci/mmol (74 GBq/mmol)

Para emplear, se diluye en medio de cultivo, hasta una concentración de 2  $\mu\text{Ci/ml}$  (74 kBq/ml).

i) Solución centelladora

4 g de PPO y 0,2 g de dimetil-POPOP se disuelven, por separado, en tolueno, se mezclan y se completa con tolueno a 700 ml. Finalmente, se agregan 300 ml de etanol.

Para mantener la esterilidad del procedimiento los reactivos empleados en el cultivo celular y las muestras en estudio fueron esterilizados por filtración a través de filtros Millipore de 0,22  $\mu\text{m}$ .

## 21.2. Técnica

### PREPARACION DE LAS SOLUCIONES TESTIGOS Y DE LAS FRACCIONES CONTROLES Y UREMICAS

Se ensayaron las siguientes muestras:

a) Ultrafiltrados conteniendo sustancias con  $\text{PM} < 10\,000$  g/mol obtenidos a partir de plasma de pacientes urémicos (IRC e IRA) mediante ultrafiltración a través de membranas Diaflo PM-10.

b) Residuos evaporados a sequedad de los eluidos de las columnas de Sephadex, correspondientes a las sustancias de BMPM totales o a sus fracciones, resuspendidos en medio de cultivo hasta volúmenes iguales a los originales plasmáticos y ajustados los pH de las soluciones finales a  $7,2 \pm 0,1$ .

c) Soluciones, en medio de cultivo, de: creatinina (1,8 mmol/l), urea (0,15 mol/l), ácido úrico (0,9 mmol/l), guanidina (0,1 mmol/l), metilguanidina (0,1 mmol/l), espermina (0,03 mmol/l), espermidina (0,04 mmol/l), putrescina (0,06 mmol/l), cadaverina (0,4 mmol/l), ATP (0,02 mmol/l), glutatión (1,2 mmol/l).

En los cultivos en los que se empleó PHA para la estimulación, la misma se agregó a las muestras en estudio en una concentración final de 25  $\mu\text{g/ml}$ .

#### PREPARACION DE LOS LINFOCITOS

Todo el procedimiento se llevó a cabo en condiciones de absoluta esterilidad.

Se extrajo sangre de dos dadores sanos no relacionados (para el MLC) o de un dador (para los cultivos estimulados por PHA) en una jeringa estéril conteniendo 10 UI de heparina/ml de muestra.

Se diluyó la muestra de sangre 1:2 con medio de cultivo. En sendos tubos se colocaron 2 ml de la mezcla de Ficoll-Hypaque y se agregaron cuidadosamente, 5 ml de la muestra de sangre diluida, tratando de mantener intacta la interfase.

Se centrifugaron los tubos a 400 x g durante 40 min a temperatura ambiente (20-25°C).

Se removió la capa enriquecida en linfocitos y se la agregó a un tubo que contenía medio de cultivo. Se mezcló, se centrifugó durante 10 min a 150 x g (Centrífuga Internacional), se descartó el sobrenadante y se resuspendió el residuo en medio de cultivo. Este procedimiento se repitió otras dos veces.

Se realizó el recuento de linfocitos de la suspensión en cámara de Neubauer. La contaminación con monocitos y polimorfonucleares fue menor del 5%.

Se resuspendieron las células en un volumen apropiado para obtener una concentración final de  $2 \times 10^6$  células/ml de medio de cultivo conteniendo solución reguladora de HEPES y suero AB en una concentración final de 40%. La suspensión empleada para MLC contenía las dos poblaciones celulares.

MICROCULTIVO

Se emplearon microplacas plásticas estériles con tapa, de 96 cavidades Microtest II Plate (Falcon, Oxnard, Ca., USA). Se utilizaron micropipetas automáticas con puntas descartables Eppendorf (Hamburgo, Alemania).

En cada cavidad de la placa se colocaron:

100 µl de la suspensión de células y

100 µl de la solución en estudio

Cada uno de los ensayos se realizó por triplicado.

La concentración final fue de  $1 \times 10^5$  de cada población celular y 20% de suero AB.

La placa se incubó a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire, en una estufa gaseada.

El período de incubación se prolongó por 3 días para los cultivos estimulados con PHA y 6 días para los MLC.

18 h antes de finalizar el período de incubación se agregó, a cada celda, 0,1 µCi (3,7 kBq) de <sup>3</sup>H-timidina.

Al finalizar las restantes 18 h de incubación se procedió a la recolección del material celular tritiado mediante un cosechador automático (Harvester Titertek), quedando las células depositadas sobre filtros. Estos fueron secados en corriente de aire y colocados en la mezcla centelladora.

Se realizó la detección de la timidina incorporada utilizándose un espectrómetro para centelleo líquido Packard modelo 3 320 con contador automático (Packard Instruments Co.,USA).

Los resultados se expresaron como promedios (de los ensayos triplicados) en c.p.m. Se determinaron los porcentajes de crecimiento (o estimulación) con respecto al cultivo control (que no contenía sustancias en estudio) considerado como 100% de estimulación.

### 21.3. Otros ensayos "in vitro"

#### ESTUDIOS MORFOLOGICOS

Finalizada la incubación se realizaron estudios de observación morfológica para comparar con los datos de incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina. Se realizaron extendidos celulares que se tiñeron con colorante de May Grünwald-Giemsa. Se observó la morfología celular en un microscopio óptico (Leitz, Alemania).

#### ENASAYOS DE VIABILIDAD CELULAR

Finalizada la incubación una suspensión de células se colocó sobre un portaobjetos y se le agregó colorante su-

pravital azul tripán. El preparado se observó al microscopio óptico para determinar la presencia de células vivas.

21.4. Muestras empleadas para los estudios de toxicidad sobre sistemas inmunológicos "in vitro"

ULTRAFILTRADOS PLASMATICOS

Muestras de plasma heparinizado ultrafiltradas a través de membranas Diaflo PM-10, conteniendo sustancias con PM menores de 10 000 g/mol.

IRC n = 2

IRA n = 2

ELUIDOS DE SUSTANCIAS DE BMPM TOTALES

Eluidos cromatográficos, evaporados a sequedad y redissueltos, correspondientes a las fracciones plasmáticas de BMPM en conjunto.

Control n = 8

IRC n = 10

IRA n = 2



ELUIDOS DE LAS FRACCIONES A, B, C Y D DE BMPM

Eluidos cromatográficos, evaporados a sequedad y redissueltos, correspondientes a cada una de las Fracciones plasmáticas A, B, C y D (Fig.5) por separado.

IRC n = 10

IRA n = 2

SUBFRACCIONES DE BMPM

Eluidos cromatográficos, evaporados a sequedad y redissueltos, correspondientes a cada una de 11 subfracciones plasmáticas de sustancias de BMPM con y sin absorbancia en UV (Fig. 36).

Control n = 5

IRC n = 5

FRACCIONES ACOTADAS POR PESOS MOLECULARES

Eluidos , evaporados a sequedad y redissueltos, correspondientes a las subfracciones cromatográficas obtenidas a partir de los ultrafiltrados plasmáticos (2), (3) y (4) , acotados por pesos moleculares mediante membranas selectivas (Figs. 7 y 8).

IRC n = 6 subfracciones de 1 paciente

IRA n = 4 subfracciones de 1 paciente

22) METODOS PARA ESTUDIAR LAS PROPIEDADES NEUROTOXICAS DE LAS  
SUSTANCIAS DE BPPM

22.1. Reactivos

a) Solución Fisiológica

NaCl 0,9 % (p/v) = 0,15 mol/l. Osmolaridad: 300 mOsm/l

b) Solución glucosada isotónica

Glucosa 5 % (p/v) = 0,28 mol/l. Osmolaridad: 300 mOsm/l

c) Solución de Krebs-Ringer

NaCl 137 mmol/l

KCl 5 mmol/l

CaCl<sub>2</sub> 2 mmol/l

MgCl<sub>2</sub> 1 mmol/l

NaPO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> 1 mmol/l

NaCO<sub>3</sub>H 1 mmol/l

pH = 7,4

22.2. Estudios de toxicidad sobre la actividad neuromuscular

Se emplearon 27 ratas Wistar con peso corporal promedio de 175 (entre 143 y 235) g.

Se procedió según el siguiente protocolo:

1. Anestesia con éter
2. Nefrectomía bilateral Tiempo 0
3. Inyección i.v. (vena de la cola)  
de 2 ml de soluciones controles  
o muestras en estudio. Tiempo de  
inyección: 5-10 min. Tiempo 60 min
4. Estimación de la eficiencia muscular Tiempo 180 min
5. Estudios de las propiedades mecánicas del músculo y de velocidad de conducción nerviosa. Tiempo 360 min
6. Sangrado de los animales por punción cardíaca.
7. Determinaciones plasmáticas de osmolaridad, concentraciones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  y fraccionamiento de sustancias de BMPM.

Los animales fueron divididos en 4 grupos, de acuerdo al tipo de inyección recibida:

- 1) RATAS CONTROL 1 (n = 7). Solución glucosada 5 %.
- 2) RATAS CONTROL 2 (n = 7). Solución de fracciones cromatográficas plasmáticas de sustancias de BMPM provenientes

de sujetos controles. La cantidad inyectada fue de  $0,02 \pm 0,008$  UAAI/100 g de peso, equivalente, aproximadamente, a 2,2 ml de ultrafiltrado de plasma control/100 g.

- 3) RATAS IRC (n = 8). Solución de fracciones cromatográficas plasmáticas de sustancias de BMPM provenientes de pacientes con IRC terminal, con neuropatía periférica. Esta se determinó por examen clínico y por medida de la velocidad de conducción nerviosa de los nervios mediano y sural. Se emplearon, en el presente estudio, las muestras de aquellos pacientes que presentaron algún grado de debilidad y/o déficit sensitivo y cuyos estudios de VCN mostraron velocidades disminuídas y aumento del número de fases del potencial de acción evocado.

La cantidad inyectada fue de  $0,15 \pm 0,028$  UAAI/100 g de peso, equivalente, aproximadamente, a 1,5 ml de ultrafiltrado plasmático de IRC/100 g.

- 4) RATAS IRA (n = 5). Solución de fracciones cromatográficas plasmáticas de sustancias de BMPM provenientes de pacientes con IRA (No se realizó estudio neurológico): La cantidad inyectada fue de  $0,25 \pm 0,200$  UAAI/100 g de peso, equivalente, aproximadamente, a 2 ml de ultrafiltrado plasmático de IRA/100 g.

Las fracciones cromatográficas de sustancias de BMPM fueron obtenidas a partir de plasma de sujetos controles y de pacientes urémicos (IRC e IRA) según el método descrito en la Fig.4. Los eluidos fueron evaporados a sequedad en vacío y los residuos redissueltos en un volumen, igual al plasmático original, de solución fisiológica o solución glucosada isotónicas. Fueron ajustados los valores de pH a  $7,4 \pm 0,1$  y los de osmolaridad entre 320 y 360 mOsm/l.

#### ESTIMACION DE LA EFICIENCIA MUSCULAR

Después de 2 horas de la inyección i.v. de soluciones controles y de sustancias en estudio, las ratas fueron evaluadas por su capacidad para mantenerse colgadas de una barra metálica suspendida a una altura de 50 cm. El tiempo de permanencia fue tomado como un índice indirecto de la eficiencia muscular. Se realizaron 10 ensayos con cada animal, con intervalos de 2-3 min entre cada uno y se calcularon los valores promedios.

#### ENSAYOS PARA ESTUDIAR LAS PROPIEDADES MECANICAS DEL MUSCULO

Después de 3 horas de la inyección i.v. de las soluciones controles y de sustancias en estudio, los animales fueron

ron anestesiados con pentabarbitalato de sodio (50 mg/kg de peso) mediante inyección intra peritoneal. El músculo extensor digitorum longus (EDL) fue desecado y colocado en una cámara con solución de Krebs-Ringer, aireada constantemente con 95% de  $O_2$  y 5% de  $CO_2$ , a una temperatura de 23 - 24,5°C. El tendón distal del músculo EDL fue clampeado con un broche de acero inoxidable. El tendón proximal fue insertado en el extremo de un resorte unido a la extensión rígida de un transductor de fuerza (Grass Force Displacement Transducer, FT 03C) conectado a un polígrafo (Grass, modelo 7). Todo el equipo de registro fue montado en un manipulador que permitía movimientos controlados en la dirección del eje longitudinal del músculo.

Los músculos aislados fueron estimulados (Grass SD 5) con un pulso de onda cuadrada de corriente alterna por medio de electrodos de platino ubicados paralelamente al eje longitudinal del músculo.

Una vez colocado el músculo en el baño se dejó estabilizar el sistema durante unos minutos y, luego, se ajustó la longitud del músculo. Se tomó como longitud óptima ( $L_0$ ) a aquella a la cual el potencial de tensión era máximo.

Se realizaron las siguientes determinaciones:

a) Tensión de la contracción simple ( $T_s$ ).

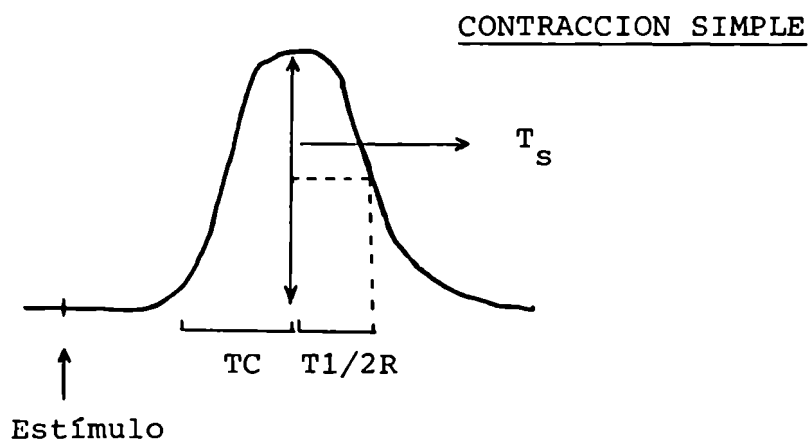
b) Tiempo de contracción (TC): es el transcurrido desde el principio de la contracción hasta el pico de la respuesta de la contracción isométrica al estímulo supra-máximo aplicado al músculo.

c) Tiempo medio de relajación ( $T_{1/2R}$ ): es el tiempo necesario para que la tensión decaiga a la mitad de su valor del pico máximo de tensión de la contracción isométrica.

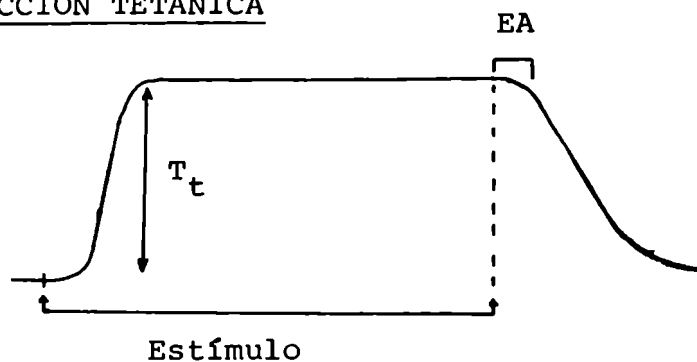
d) Tensión de la contracción tetánica ( $T_t$ ). El estímulo tetánico, cada uno, de 3 ms de duración con un voltaje 20% superior al umbral, se mantuvo durante 2 segundos.

e) Duración del estado activo (EA): es el intervalo de tiempo desde el cese de la estimulación hasta el comienzo de la declinación de la tensión tetánica.

f) Para comparar la función mecánica de músculos EDL de diferentes tamaños la tensión se corrige por el área de sección transversal y se expresa en  $g/cm^2$  ( $T_s/A$  y  $T_t/A$ ).



CONTRACCION TETANICA



ESTUDIOS DE VELOCIDAD DE CONDUCCION NERVIOSA

En 6 animales, 2 de cada uno de los grupos 1), 2) y 3). tratados en forma similar a los anteriores, se realizaron estudios de VCN "in situ".

Para asegurar una longitud fija entre los electrodos de estimulación y de registro (17 mm) se empleó una tubuladura plástica, conteniendo un par de electrodos de estimulación, un par de registro y, entre ellos, un electrodo de descarga a tierra.

El nervio ciático de las ratas fue expuesto y montado "in situ" sobre los electrodos. Se impidió la desecación mediante el recubrimiento de la superficie del nervio con una delgada capa de aceite mineral.

Los pulsos de estimulación fueron realizados con un estimulador Textronix a una frecuencia de 1/s, con una intensidad igual al doble de la necesaria para obtener el umbral.



La señal fue amplificada y observada en un osciloscopio (Textronix , modelo 564 B). Se midió el retardo de los distintos componentes (1° y 2° ) del potencial nervioso evocado y su amplitud.

### 22.3. Ensayos controles

Debido a la falta de respuesta en los estudios precedentes se realizaron ensayos para controlar la sensibilidad del método empleado y para determinar la cantidad de sustancias de BMPM en circulación.

#### CONTROL DE SENSIBILIDAD DEL METODO

En 5 experimentos se aplicó sobre el nervio ciático expuesto un papel de filtro de 2 mm<sup>2</sup> embebido con soluciones de xilocaína de diferentes concentraciones (entre 0,2 y 2%) y con eluidos plasmáticos de pacientes con IRC.

Se obtuvo un rápido bloqueo del potencial de acción evocado con cualquier concentración de xilocaína. La aplicación local de eluidos de las fracciones de BMPM plasmáticas de IRC no produjo cambios en el potencial de acción.

DETERMINACION DE LOS NIVELES DE SUSTANCIAS DE BMPM EN  
CIRCULACION

Se emplearon 23 ratas Wistar con peso corporal promedio de 207 (entre 195 y 225) g.

Se determinaron las fracciones cromatográficas del plasma de las ratas distribuidas en tres grupos:

- 1) GRUPO 1 (n = 4). Ratas controles: Los animales fueron desangrados sin tratamiento previo.
- 2) GRUPO 2 (n = 8). Ratas agudamente urémicas: Los animales fueron anestesiados, sometidos a nefrectomía bilateral y desangrados por punción cardíaca a distintos intervalos -20, 45, 180 y 360 min- después de la operación. Los animales presentaron grados progresivos de la enfermedad con el tiempo, apreciación clínica corroborada con los datos de las concentraciones de urea plasmática.
- 3) GRUPO 3 (n = 11). Ratas binefrectomizadas e inyectadas con sustancias urémicas de BMPM para realizar estudios de recuperación. Los animales fueron anestesiados, sometidos a nefrectomía bilateral, canalizados, inyectados con sustancias urémicas de BMPM y desangrados por punción cardíaca a los 20, 45 y 360 min después de la operación.

Las sustancias urémicas para inyectar fueron obtenidas por fraccionamiento del plasma de pacientes con IRC terminal, según la metodología descrita en la Fig.4. Los eluidos cromatográficos recolectados fueron evaporados a sequedad en vacío y redisolu<sup>u</sup>tos en agua destilada hasta la mitad de su volumen plasmático original. Se controlaron y ajustaron los valores de osmolaridad (entre 320 y 360 mOsm/kg) y las concentraciones de sodio y potasio (135 y 4,5 mEq/l, respectivamente). La cantidad de sustancias de BMPM inyectada fue de  $1,05 \pm 0,352$  UAAI por animal, equivalente a 5-10 ml de ultrafiltrado de plasma urémico por cada animal.

Para cada inyección se utilizaron muestras provenientes de más de un paciente. Debido a la gran cantidad de sustancias disueltas, el volumen total de inyección fue de 4,5 a 7 ml; por lo tanto, la misma se efectuó a través de la vena yugular canalizada, empleando para el procedimiento, una bomba de infusión continua (Harvard Apparatus, modelo 901, Ma., USA), con una velocidad de infusión de 0,3 ml/min.

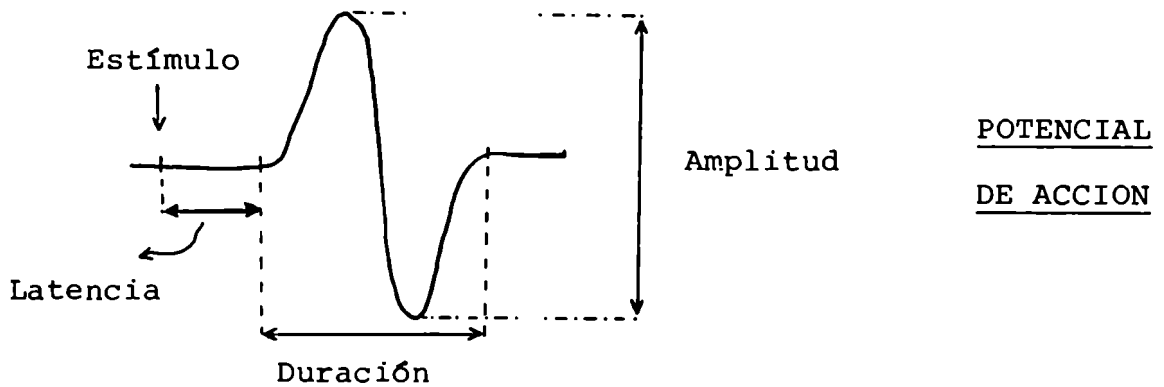
#### 22.4. Ensayos de velocidad de conducción nerviosa en ranas

Se emplearon ranas de 80-120 g de peso. Se aisló, en ca-

da experimento, el nervio sural. Se lo montó en una cámara de dos compartimientos provistos de electrodos de platino para la estimulación y el registro.

Las soluciones en estudio -en volumen de 11 ml- se colocaron dentro de la cámara bañando el nervio.

Se registró el potencial de acción (PA) del nervio estimándose la amplitud, la latencia y la duración del mismo. La señal biológica fue amplificada y medida en la pantalla de un osciloscopio. La estimulación fue efectuada con pulsos supramáximos a 1 Hz y 0,5 ms de duración.



Las muestras de plasma y orina fueron ultrafiltradas a través de membranas Diaflo PM-10 y se emplearon, para los ensayos, los ultrafiltrados (UF) conteniendo sustancias con PM < 10 000 g/mol.

Los grupos experimentales fueron los siguientes:

1) Grupo 1: UF de plasma de sujetos controles (n = 3)

- 2) Grupo 2: UF de plasma de pacientes con IRC sin polineuropatía (n = 3). Los pacientes presentaron valores de velocidad de conducción nerviosa motora dentro de los límites normales: (valores expresados como  $\bar{X} \pm s_{\bar{X}}$ )
- Nervio mediano (M):  $54 \pm 6$  m/s.
- Nervio ciático poplíteo externo (CPE):  $47 \pm 3$  m/s.
- 3) Grupo 3: UF de plasma de pacientes con IRC con polineuropatía (n = 3). Los valores de VCN motora fueron:
- Paciente D :M = 43 m/s; CPE = 38 m/s.
- Paciente Di:M = 43 m/s; CPE = 27 m/s.
- Paciente B :M = 47 m/s; CPE = 43 m/s.
- 4) Grupo 4: UF de orina de sujetos controles:
- a) sin corregir (n = 3)
- b) corregida (n = 3). Se ajustaron los valores de pH a  $7,4 \pm 0,1$ ; la concentración de  $\text{Na}^+$  a  $140 \pm 5$  mEq/l; la concentración de  $\text{K}^+$  a  $4,2 \pm 0,2$  mEq/l y la osmolaridad a  $310 \pm 20$  mOsm/l.
- Para disminuir la concentración de  $\text{K}^+$  urinario sin diluir las muestras se emplearon resinas de intercambio catiónico Dowex 50 x 8.
- Se obtuvieron los perfiles cromatográficos de los UF de las muestras de orina corregidas, empleando el sistema de una columna de Sephadex, de 0,9 x 100 cm.

23) METODOS ESTADISTICOS EMPLEADOS

- Verificación gráfica de normalidad (método de Probits).
- Prueba de t para diferencias de medias en casos dependientes e independientes con igualdad de varianzas.
- Prueba para diferencias de medias de dos muestras con varianzas distintas.
- Análisis de varianza de un factor con posteriores contrastes de Scheffé.
- Análisis de varianza de tres factores con posteriores contrastes de Scheffé.
- Análisis factorial de correspondencias (A.F.C.).  
Programa MULTM (Lebart et al., 1977).
- Determinación de coeficientes de correlación lineal.

24) DROGAS EMPLEADAS

Las sales y ácidos orgánicos e inorgánicos ,como así también los solventes empleados fueron de grado analítico. Otras drogas se detallan a continuación:

Abbot Laboratories (Argentina)

Heparina (5 000 U F.E.U.)

B.D.H.

Inulina

TEMED (N,N,N',N'-tetrametilendiamina)

Boehringer (Argentina)

ATP

Urica-quant, para determinación cuantitativa de ácido úrico

Calbiochem

Solución reguladora de HEPES (N-2- hydroxyethylpiperazine-N'-2- ethanesulfonic acid)

Difco

Fitoheмоaglutinina (PHA)

Fluka

Acido 1,amino- 2,naftol- 4,sulfónico

Bisacrilamida (N,N', metilen-bis-acrilamida)

F.B.R. (Fernández, Berlusconi y Rocca, Argentina)

Carbón activado

Grand Island Biological Co.

Medio de cultivo RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute,  
1640)

Lowens

Solución colorante según Giemsa

Solución colorante según May-Grünwald

Mann Research Laboratories

Fenilalanina

Glutamina

May & Baker

Urea

Merck Darmstadt

Acido úrico

Acrilamida

Alanina

Azul de bromofenol

Colidina

Creatinina

Histidina

Lisina

Metanol para cromatografía líquida de alta presión

Ninhidrina

PPO (2,5-difeniloxasol)



POPOP (2,2'-p-fenilen bis (5-feniloxasol) )

Reactivo de Folin-Cicolteau

Serina

Taurina

Tirosina

Microbiological Associates, Inc.

Estreptomicina

Penicilina

New England Nuclear Corp. (Boston, Mass. USA)

<sup>3</sup>H-timidina ( [ <sup>3</sup>H ] Td R : 2 Ci/mmol)

Nutritional Biochemical Co. (Cleveland, Ohio, USA)

l-glutamina

Pharmacia Fine Chemicals (Suecia)

Dextrano Azul (PM = 2 x 10<sup>6</sup>)

Sephadex G-100, G-75, G-25 Fino y G-15

Roche Diagnostics (Nueva Jersey, USA)

Fluorescamina (Floram)

Sharp & Dome (Filadelfia, USA)

p-aminohipurato de sodio

Sigma Chemical Co.

Acido glutámico

Albúmina bovina

Azul brillante de Coomasie

Azul tripán

Cadaverina

Clorhidrato de guanidina

Diclorhidrato de putrescina

Espermina

Ficoll (PM  $4 \times 10^5$ )

Glicina

Leucina encefalina (L-tirosil-glicil-glicil-L-fenil-alanil-L-leucina)

Metilguanidina

Negro Amido 10 B

Triacetato de bradiquinina ( L-arginil-L-prolil-L-prolil-glicil-L-fenilalanil-L-seril-L-prolil-L-fenilalanil-L-arginina ).

Triclorhidrato de espermidina

TRIS ( (hidroximetil) amino metano )

Violeta de genciana

Vitamina B<sub>12</sub>

Waldhorf

Glutation

## RESULTADOS

### 1. Fraccionamiento y caracterización de sustancias de BMPM en la uremia.

#### 1.1. PERFILES CROMATOGRÁFICOS PLASMÁTICOS

En la Figura 10 se pueden ver los perfiles cromatográficos de las fracciones de BMPM, con absorbancia de 251 nm, característicos de los pacientes urémicos no dializados (IRC e IRA) y los correspondientes a sujetos controles. El gráfico muestra los resultados obtenidos en un paciente de cada grupo representativo del conjunto.

Los perfiles cromatográficos correspondientes a todos los pacientes estudiados (n=11) que presentaban diferentes patologías sin insuficiencia renal fueron similares a los de los sujetos controles.

A diferencia de los sujetos controles, los pacientes urémicos mostraron la presencia de 3 picos (A, B y C) con volúmenes de elución de  $92,8 \pm 3,30$ ,  $115,5 \pm 1,91$  y  $147,0 \pm 5,03$  ml, respectivamente (Figura 10).

La Tabla VI presenta las concentraciones, expresadas en UAAI/l (unidades arbitrarias de area integrada por litro), de las sustancias de BMPM y de sus fracciones para los dife

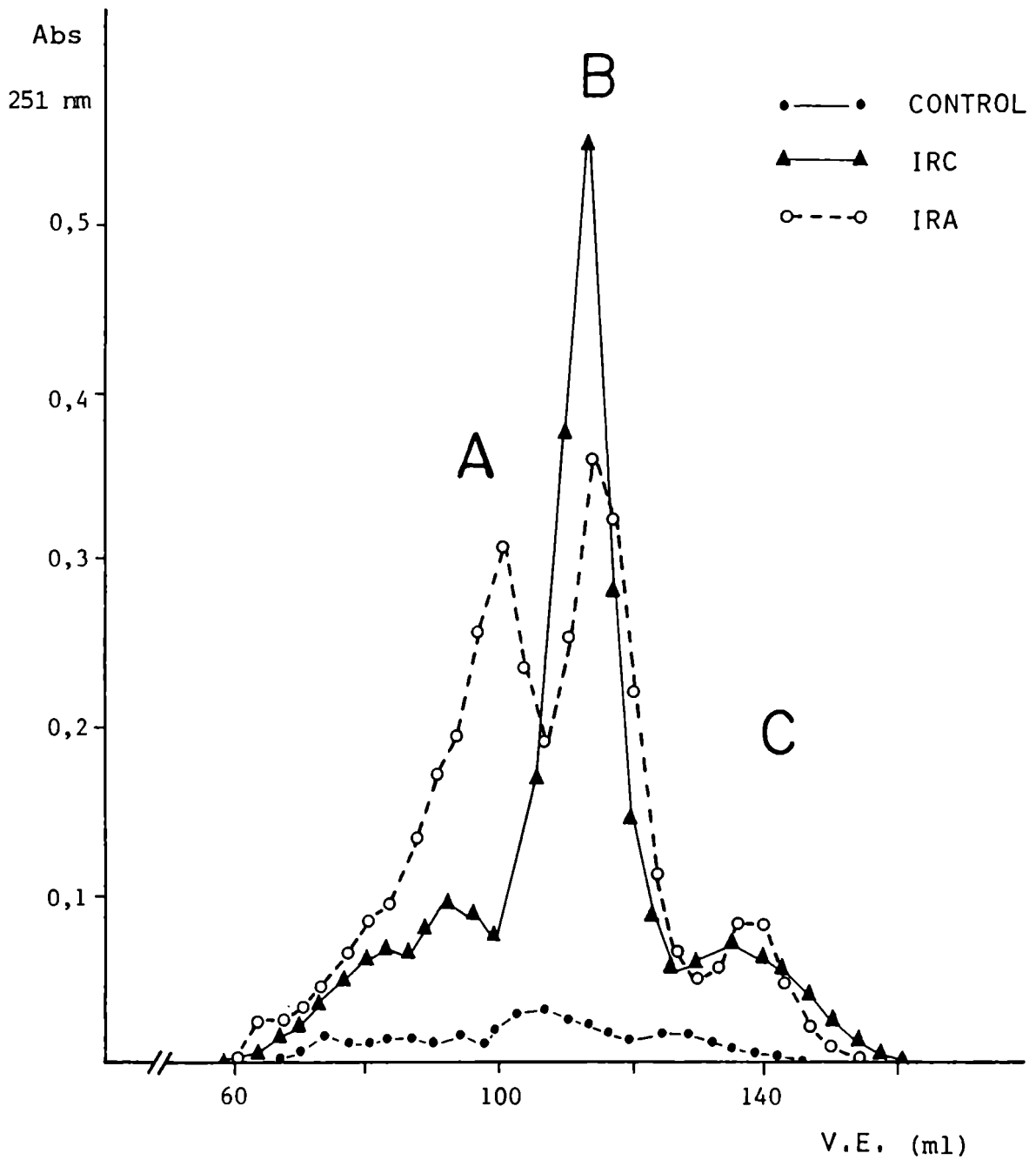


Figura 10.- Perfiles cromatográficos (sustancias de BMPM) de ultrafiltrados plasmáticos (PM < 10 000 g/mol) de sujetos controles y de pacientes urémicos. El fraccionamiento se realizó según el método descrito en la Fig.4.

Tabla VI.- Concentración plasmática de las sustancias de BMPM y de sus fracciones en los sujetos controles y en los pacientes con

IRC e IRA

| GRUPO (N° Indiv.)                      | BMPM<br>totales<br>(UAAI/l) | FRACCIONES (UAAI/l) |         |         |
|--|-----------------------------|---------------------|---------|---------|
|  |                             | A                   | B       | C       |
| CONTROL (20)                           | 9+5,9                       | -                   | -       | -       |
| IRC (43)                               | 89+48,7                     | 24+16,7             | 56+27,8 | 9+ 8,2  |
| IRC (C <sub>cr</sub> < 10 ml/min) (21) | 97+45,1                     | 26+17,2             | 61+22,4 | 9+12,2  |
| IRA (29)                               | 121+71,2                    | 43+30,2             | 64+41,2 | 11+10,5 |

\* Los datos se expresan como  $\bar{X} \pm s$ .

Diferencias estadísticamente significativas de las BMPM totales

C e IRC p < 0,001      IRC e IRA p < 0,05

C e IRA p < 0,001      IRC (C<sub>cr</sub> < 10ml/min) e IRA N.S.

rentes grupos de individuos.

La estimación semicuantitativa permitió determinar que las concentraciones plasmáticas de las sustancias de BMPM de los pacientes con IRC e IRA son significativamente mayores que las de los sujetos controles ( $p < 0,001$ , en ambos casos).

Las concentraciones de sustancias de BMPM totales fueron mayores en los pacientes con IRA que en los pacientes con IRC, cuando se procesaron los datos obtenidos con todos los individuos con IRC estudiados ( $p < 0,05$ ). En cambio, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon los valores promedios de las concentraciones de sustancias de BMPM de los pacientes con IRA con los de los pacientes con IRC en el estadio terminal (con  $C_{cr}$  menor de 10 ml/min).

Las conclusiones precedentes se obtuvieron después de someter los datos a una prueba para dos muestras con varianzas diferentes (Sokal et al., 1969). Dicha prueba se impuso al observar la no homocedasticidad, tanto para los datos originales como para los transformados logarítmicamente (test de Bartlett).

La Tabla VII muestra la distribución porcentual de las fracciones A, B y C en los pacientes urémicos. Aquí sí se en

Tabla VII.- Distribución porcentual y comparación estadística  
de las fracciones plasmáticas A, B y C en los  
pacientes urémicos

| GRUPO (N° Indiv.) | A %              | B %              | C %            |
|-------------------|------------------|------------------|----------------|
| IRC (n = 43)      | 27,0 $\pm$ 8,84  | 64,0 $\pm$ 10,81 | 9,0 $\pm$ 8,17 |
| IRA (n = 29)      | 40,0 $\pm$ 12,72 | 50,9 $\pm$ 11,19 | 9,1 $\pm$ 7,34 |

\* Los valores se expresan como  $\bar{X} \pm s$

Diferencias significativas dentro y entre los grupos:

A % IRC y B % IRC p < 0,01

A % IRA y B % IRA p < 0,01

A % IRC y A % IRA p < 0,01

B % IRC y B % IRA p < 0,01

C % IRC y C % IRA N.S.

contró una diferente distribución de las fracciones entre los pacientes con IRA y con IRC, cualquiera fuere el grado de evolución de la enfermedad. Se observa que el pico A constituye una proporción significativamente mayor de las sustancias de BMPM en los pacientes con IRA que en los pacientes con IRC ( $p < 0,01$ ).

Tres pacientes con IRC (7% del total) no mostraron el perfil cromatográfico característico de ese grupo, sino que se asemejaron a los de los pacientes con IRA, mientras que, a la inversa, siete pacientes con IRA (24% del total) presentaron perfiles cromatográficos muy semejantes a los de la IRC.

Los estudios estadísticos de los datos presentados en la Tabla VII, después de someterlos a un ANOVA de 3 factores y posteriores contrastes de Scheffé, mostraron que:

- a) los resultados son independientes de los individuos.
- b) hay diferencias significativas entre las sustancias y
- c) existe relación entre las sustancias y los grupos de pacientes.

En algunos pacientes se detectó la presencia de sustancias con absorbancia en UV con volúmenes de elución menores que el del pico A (Fracción P) y mayores que el del pico C (Fracción D), como se observa en la Figura 5.



La Tabla VIII muestra los valores promedios de varias de terminaciones sanguíneas de interés, citológicas y químicas, encontradas en los pacientes urémicos estudiados. Los resultados se expresan en las unidades convencionales y en el nuevo sistema de unidades internacionales (SI) (Bertello, 1980).

Conclusiones: (A)

- Se detectaron sustancias de BMPM, con absorbancia en UV , en el plasma de los pacientes urémicos a diferencia de los sujetos controles y de los pacientes no renales.
- Se observaron diferencias entre los perfiles cromatográficos plasmáticos de los pacientes con IRC y con IRA.

1.2. MECANISMO DE EXCRECION DE SUSTANCIAS DE BMPM

En la Figura 11 pueden verse los perfiles cromatográficos de las sustancias de BMPM, con absorbancia en UV, característicos de orinas de sujetos normales y de pacientes con IRC. El diagrama de ambos perfiles es semejante y comparable con los perfiles plasmáticos obtenidos en la IRC.

La cantidad de sustancias de BMPM totales, eliminadas en la orina de 24 horas por los pacientes renales, disminuyó bruscamente cuando el filtrado glomerular se encontró por debajo de los 5 ml/min (Figura 12 y Tabla IX). La excreción me

Tabla VIII.- Determinaciones sanguíneas citológicas y químicas  
en los pacientes con insuficiencia renal

| <u>DETERMINACION</u>         |          | <u>IRC</u>                             | <u>IRA</u>                               |
|------------------------------|----------|--|--|
| Urea <sub>p</sub>            | g/l      | 2,2 <sub>±</sub> 0,87                  | 2,3 <sub>±</sub> 1,30                    |
|                              | mmol/l   | 37,3 <sub>±</sub> 14,49                | 38,2 <sub>±</sub> 21,63                  |
| Creatinina <sub>p</sub>      | mg/dl    | 7,6 <sub>±</sub> 3,39                  | 7,2 <sub>±</sub> 3,55                    |
|                              | umol/l   | 669 <sub>±</sub> 299,7                 | 634 <sub>±</sub> 313,8                   |
| C <sub>cr</sub>              | ml/min   | 8,8 <sub>±</sub> 5,9                   |  |
|                              | ml/s     | 0,14 <sub>±</sub> 0,095                |  |
| Acido Urico <sub>p</sub>     | mg/dl    | 8,0 <sub>±</sub> 2,56                  | 11,2 <sub>±</sub> 3,76                   |
|                              | umol/l   | 478 <sub>±</sub> 152,5                 | 669 <sub>±</sub> 224,0                   |
| Ca Total <sub>p</sub>        | mg/dl    | 9,3 <sub>±</sub> 1,04                  |  |
|                              | mmol/l   | 2,3 <sub>±</sub> 0,26                  |  |
| P <sub>p</sub>               | mg/dl    | 6,3 <sub>±</sub> 1,63                  |  |
|                              | mmol/l   | 2,1 <sub>±</sub> 0,52                  |  |
| Na <sup>+</sup> <sub>p</sub> | mEq/l    |  |  |
|                              | = mmol/l | 137 <sub>±</sub> 5,8                   | 132 <sub>±</sub> 10,4                    |
| K <sup>+</sup> <sub>p</sub>  | mEq/l    |  |  |
|                              | = mmol/l | 4,7 <sub>±</sub> 0,84                  | 4,5 <sub>±</sub> 1,23                    |
| Leucocitos                   | n°/ul    | 8800 <sub>±</sub> 4 800                | 15 800 <sub>±</sub> 10 000               |
|                              | n°/l     | (8,8 <sub>±</sub> 4,8)x10 <sup>9</sup> | (15,8 <sub>±</sub> 10,0)x10 <sup>9</sup> |
| Linfocitos                   | n°/ul    | 1 400 <sub>±</sub> 600                 | 1 600 <sub>±</sub> 1 300                 |
|                              | n°/l     | (1,4 <sub>±</sub> 0,6)x10 <sup>9</sup> | (1,6 <sub>±</sub> 1,3)x10 <sup>9</sup>   |
| Volumen Globular             | ‡ (v/v)  | 28 <sub>±</sub> 8,5                    | 26 <sub>±</sub> 5,9                      |

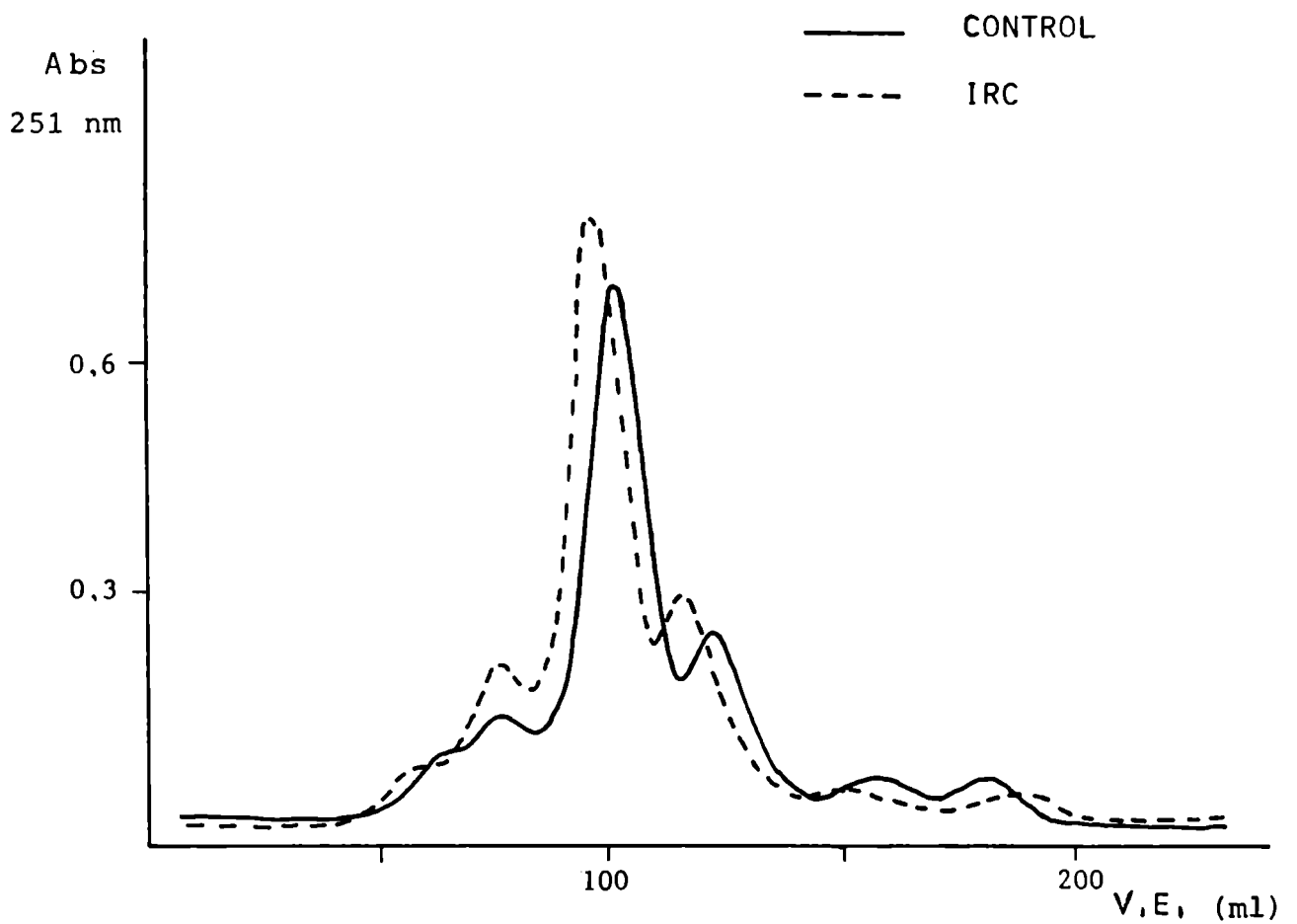


Figura 11.- Perfiles cromatográficos urinarios de las sustancias de BPM correspondientes a un sujeto control y a un paciente con IRC. El fraccionamiento se realizó según el método descrito en la Fig.4. Siembra: 0,3 ml de UF-PM 10 de las muestras de orina de 24 h.

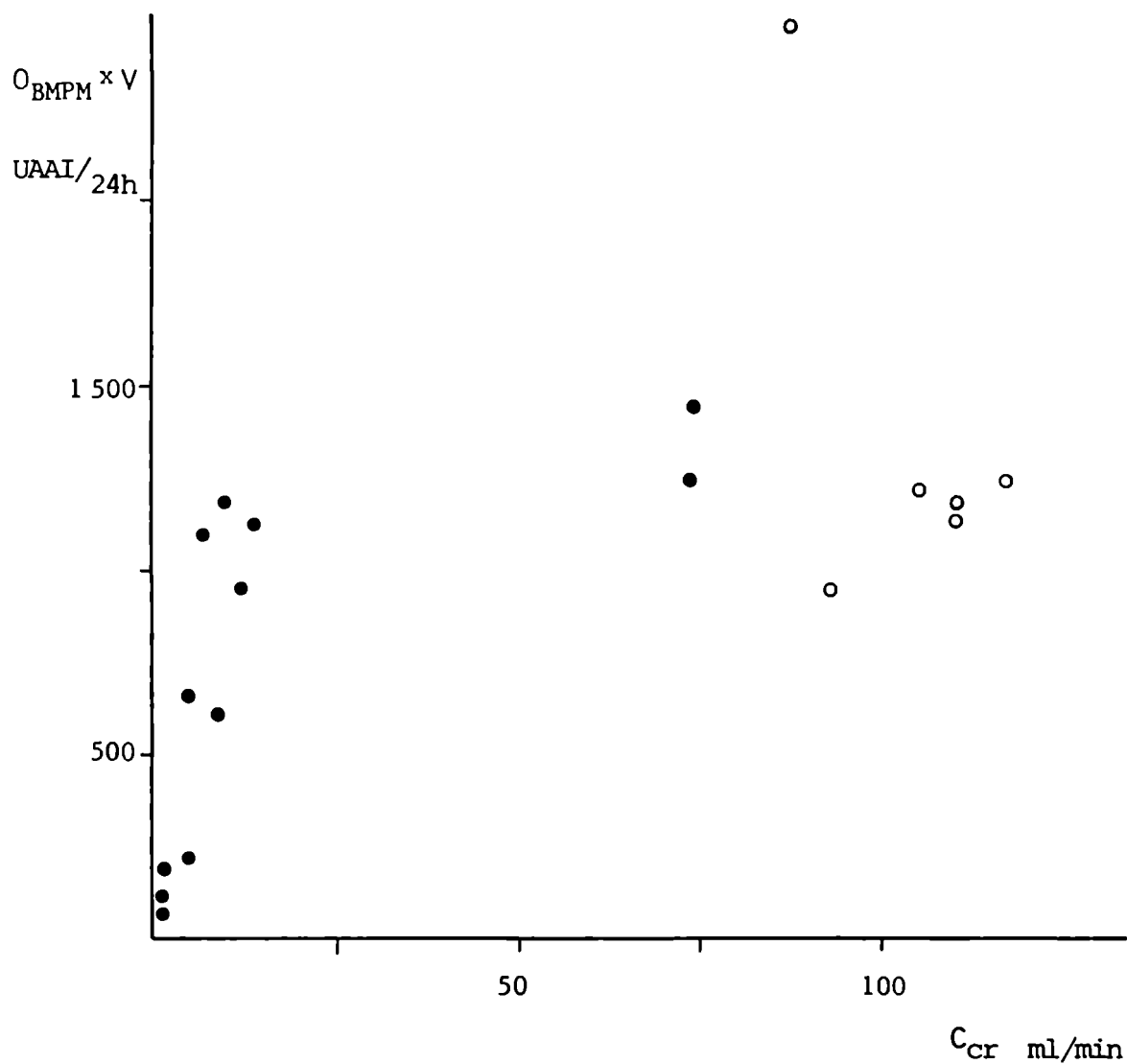


Figura 12.- Relación entre la excreción diaria de las sustancias de BMPM y el  $C_{cr}$  en los sujetos controles ( o ) y en los pacientes urémicos ( ● ).

Tabla IX.- Excreción urinaria de sustancias de BMPM y clearances de sustancias de BMPM y de creatinina en sujetos controles y pacientes urémicos

|  | $O_{\text{BMPM}}$<br>UAAI/1 | $O_{\text{BMPM}^{\text{xV}}}$<br>UAAI/24h | $C_{\text{BMPM}}$<br>ml/min | $C_{\text{cr}}$<br>ml/min |
|--|-----------------------------|---|-----------------------------|---------------------------|
| <u>CONTROLES</u>                                 |                             |   |                             |                           |
| 1  | 1 016                       | 1 170                                     | 119,0                       | 110,0                     |
| 2  | 1 239                       | 1 239                                     | 97,8                        | 117,5                     |
| 3  | 1 727                       | 1 123                                     | 119,5                       | 110,0                     |
| 4  | 1 168                       | 934                                       | 99,5                        | 92,9                      |
| 5  | 1 200                       | 1 209                                     | 98,7                        | 105,0                     |
| 6  | 604                         | 2 480                                     | 108,0                       | 87,0                      |
| $\bar{X} \pm s$                                  | 1 159 $\pm$ 363,1           | 1 359 $\pm$ 559,6 <sup>(*)</sup><br>(**)  | 107,1 $\pm$ 10,11           | 103,7 $\pm$ 11,61         |
| <u>UREMICOS</u> $C_{\text{cr}} > 5\text{ml/min}$ |                             |   |                             |                           |
| 1  | 2 213                       | 1 438                                     | 53,1                        | 74,0                      |
| 2  | 961                         | 1 249                                     | 54,1                        | 73,5                      |
| 3  | 983                         | 2 005                                     | 38,6                        | 54,6                      |
| 4  | 438                         | 840                                       | 34,3                        | 38,0                      |
| 5  | 471                         | 1 124                                     | 13,1                        | 13,4                      |
| 6  | 496                         | 942                                       | 19,2                        | 11,6                      |
| 7  | 487                         | 1 168                                     | 6,1                         | 9,5                       |
| 8  | 230                         | 607                                       | 10,5                        | 8,7                       |
| 9  | 722                         | 1 097                                     | 5,2                         | 6,3                       |
| $\bar{X} \pm s$                                  |                             | 1 163 $\pm$ 396,8 <sup>(*)</sup><br>(***) |                             |                           |
| <u>UREMICOS</u> $C_{\text{cr}} < 5\text{ml/min}$ |                             |   |                             |                           |
| 10   | 157                         | 223                                       | 0,8                         | 4,6                       |
| 11   | 2 006                       | 662                                       | 8,7                         | 4,5                       |
| 12   | 694                         | 191                                       | 0,9                         | 1,1                       |
| 13   | 766                         | 100                                       | 0,5                         | 0,4                       |
| 14   | 2 152                       | 86  | 0,3                         | 0,4                       |
| $\bar{X} \pm s$                                  |                             | 252 $\pm$ 236,3 <sup>(**)</sup><br>(***)  |                             |                           |

(\*) N.S.

(\*\*) y (\*\*\*) :  $p < 0,001$

dia diaria en los pacientes urémicos con  $C_{cr}$  mayores de 5 ml/min no difirió significativamente de la de los sujetos controles, siendo los valores iguales a  $1\ 163 \pm 396,8$  y  $1359 \pm 559,6$  UAAI/24 horas, respectivamente. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre cada uno de los valores anteriores y la excreción diaria de sustancias de BMPM en los pacientes urémicos con  $C_{cr}$  menores de 5 ml/min ( $p < 0,001$ , en ambos casos).

No se encontraron diferencias significativas entre el clearance de las sustancias de BMPM y el de creatinina. La correlación lineal entre ambos datos ( $r = 0,98$ ;  $p < 0,001$ ) se muestra en la Figura 13. También se encontró correlación lineal de los clearances de las Fracciones urémicas A y B con el  $C_{cr}$  (Tabla X). No se encontró correlación lineal entre el clearance de la Fracción C y el  $C_{cr}$ .

Conclusiones: (B)

- Se observó que las sustancias de BMPM son excretadas, normalmente, por orina.
- No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los  $C_{BMPM}$  y  $C_{cr}$  correspondientes a sujetos controles y a pacientes urémicos en diferentes estadios de la enfermedad.

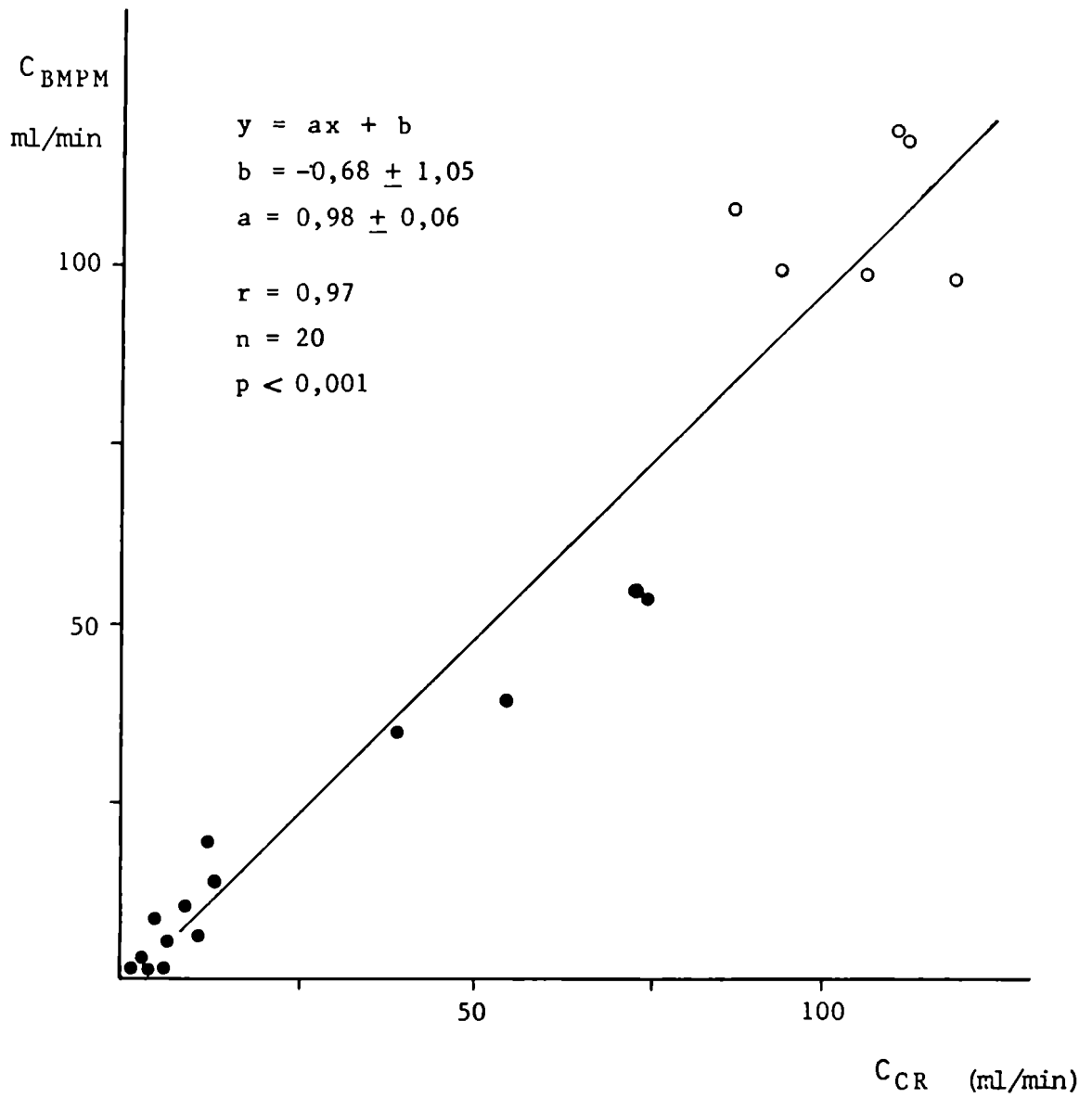


Figura 13.- Correlación entre el  $C_{BMPM}$  y el  $C_{CR}$  en sujetos controles ( o ) y en pacientes urémicos ( • ).

Tabla X.- Clearances de creatinina y de las fracciones urémicas

A y B

| PACIENTES<br>UREMICOS | C <sub>A</sub><br>ml/min | C <sub>B</sub><br>ml/min | C <sub>cr</sub><br>ml/min |
|-----------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 1                     | 11,0                     | 80,3                     | 74,0                      |
| 2                     | 28,3                     | 75,0                     | 73,5                      |
| 3                     | 12,4                     | 114,7                    | 54,6                      |
| 4                     | 7,6                      | 67,7                     | 38,0                      |
| 5                     | 11,6                     | 12,4                     | 13,4                      |
| 6                     | 7,9                      | 21,7                     | 11,6                      |
| 7                     | 5,2                      | 6,3                      | 9,5                       |
| 8                     | 10,5                     | 10,7                     | 8,7                       |
| 9                     | 3,9                      | 4,7                      | 6,3                       |
| 10                    | 1,0                      | 0,7                      | 4,6                       |
| 11                    | 4,0                      | 11,0                     | 4,5                       |
| 12                    | 0,7                      | 0,9                      | 1,1                       |
| 13                    | 0,5                      | 0,03                     | 0,4                       |
| 14                    | 0,2                      | 0,3                      | 0,4                       |

Correlación lineal:

C<sub>A</sub> y C<sub>cr</sub> : r = 0,81; p < 0,001; n = 14

C<sub>B</sub> y C<sub>cr</sub> : r = 0,94; p < 0,001; n = 14



- Los  $C_{\text{BMPM}}$ ,  $C_A$  y  $C_B$  se correlacionaron linealmente con el  $C_{\text{cr}}$ .

### 1.3. DIFUSIBILIDAD DE LAS SUSTANCIAS DE BMPM

El perfil cromatográfico plasmático correspondiente a las muestras obtenidas inmediatamente antes de comenzar la diálisis en pacientes con IRC sometidos a tratamiento hemodialítico crónico presenta las mismas fracciones que el de los pacientes urémicos no dializados.

La concentración de sustancias de BMPM totales pre-diálisis fue de  $122 \pm 39,9$  UAAI/l ( $n=20$ ). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones plasmáticas de las sustancias de BMPM pre-diálisis y las de los pacientes con IRA e IRC terminal sin diálisis.

En muestras de plasma extraídas inmediatamente después de la diálisis se observó la disminución de todas las fracciones, aunque no en la misma proporción, como se puede ver en la Figura 14.

La difusibilidad de las fracciones urémicas estudiadas se demostró por el hallazgo de las mismas en los líquidos de hemodiálisis, en los ultrafiltrados obtenidos por hemodiafiltración y en los baños de dializado peritoneal estudiados por cromatografía. Los perfiles cromatográficos de dichos lí

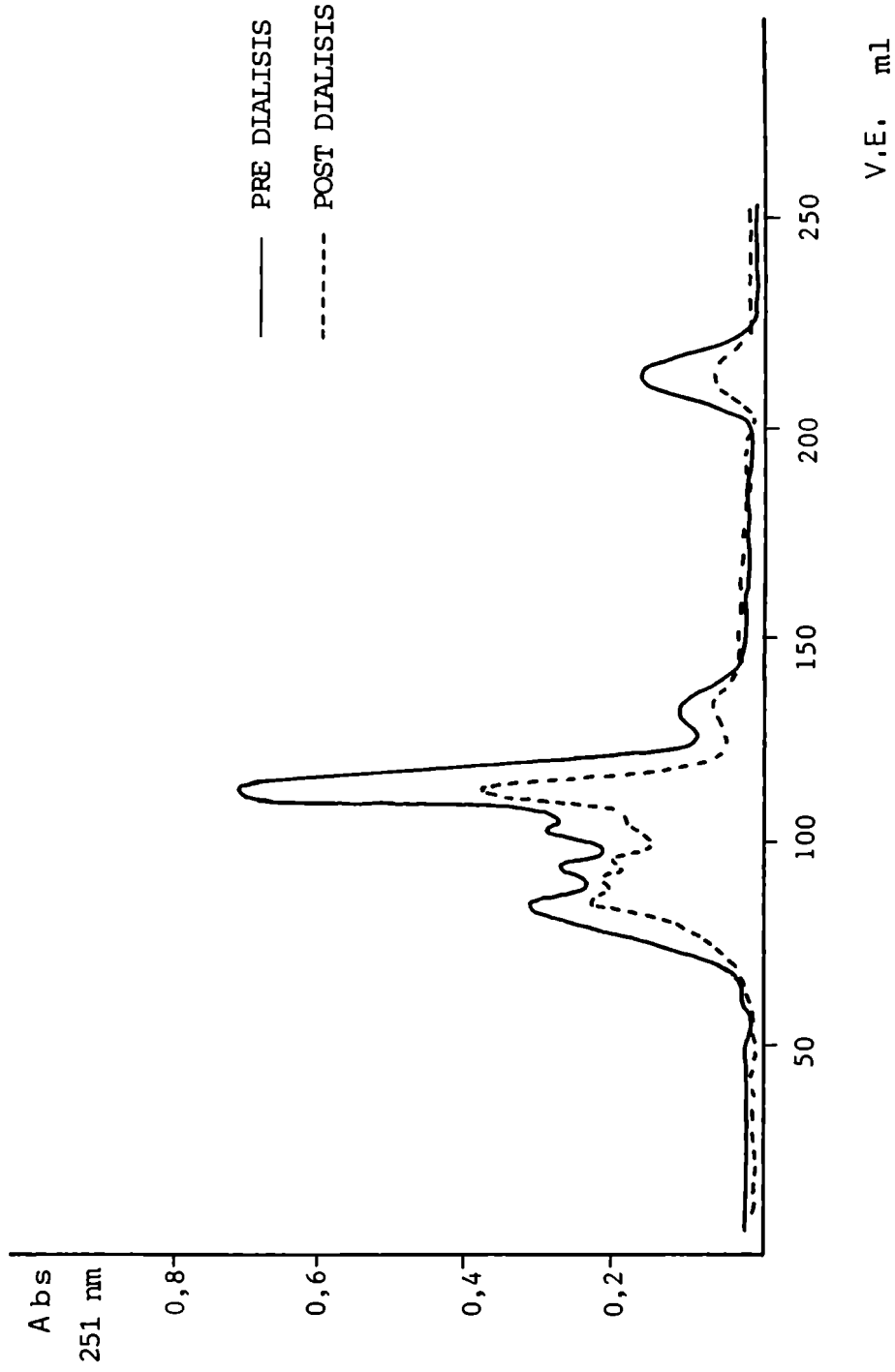


Figura 14.- Perfiles cromatográficos plasmáticos de sustancias de BMPM antes y después de la diálisis. El fraccionamiento se realizó según el método descrito en la Fig. 4.

quidos fueron semejantes a los que presentaron los plasmas pre-diálisis para cada paciente.

En la Tabla XI se muestran las concentraciones plasmáticas de sustancias de BMPM, de sus fracciones y de urea pre y post-diálisis en 20 pacientes con IRC en tratamiento hemodialítico extracorpóreo. En la misma tabla se presentan, también, las disminuciones porcentuales de dichas concentraciones (provocadas por la diálisis) relativas a las concentraciones pre-diálisis de cada una. Se observó mayor dialisanza de la Fracción B (45,4%), con un valor concordante con el de la disminución de la urea por el mismo proceso (43,2%). Sin embargo no se encontró correlación entre ambas variables (Figura 15c ).

La Figura 15 (a,b,c y d) muestra los valores de la disminución relativa de las sustancias de BMPM totales y de cada una de sus fracciones (A, B y C) graficados en función de la disminución relativa de urea en cada paciente. En ningún caso se encontró correlación lineal entre las mencionadas variables, siendo los picos A y C los que mostraron mayor dispersión. Tampoco se encontró correlación entre la dialisanza de las sustancias de BMPM totales o de sus fracciones y la de creatinina.

La Figura 16 muestra la correlación lineal hallada entre

Tabla XI.- Concentraciones plasmáticas pre y post-diálisis y porcentajes relativos de la disminución de los niveles plasmáticos de las fracciones de BMPM y de la urea en pacientes sometidos a tratamiento hemodialítico crónico

|  | BMPM <sub>tot</sub><br>UAAI/l      | A<br>UAAI/l            | B<br>UAAI/l             | C<br>UAAI/l             | UREA<br>g/l             |
|--|------------------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Conc. pl.<br>pre-diál.<br>n = 20                         | 122 <sub>±</sub> 39,9              | 49 <sub>±</sub> 21,2   | 64 <sub>±</sub> 27,9    | 9 <sub>±</sub> 6,0      | 1,9 <sub>±</sub> 0,57   |
| Conc. pl.<br>post-diál.<br>n = 20                        | 77 <sub>±</sub> 30,7               | 38 <sub>±</sub> 19,7   | 33 <sub>±</sub> 13,8    | 6 <sub>±</sub> 3,9      | 1,1 <sub>±</sub> 0,50   |
|  | Porcentaje de disminución relativa |                        |                         |                         |                         |
|  | BMPM <sub>tot</sub>                | A                      | B                       | C                       | UREA                    |
| $\frac{\text{PRE} - \text{POST}}{\text{PRE}} \times 100$ | 37,7 <sub>±</sub> 22,58            | 21,9 <sub>±</sub> 44,0 | 45,4 <sub>±</sub> 17,10 | 24,0 <sub>±</sub> 54,65 | 43,2 <sub>±</sub> 20,57 |

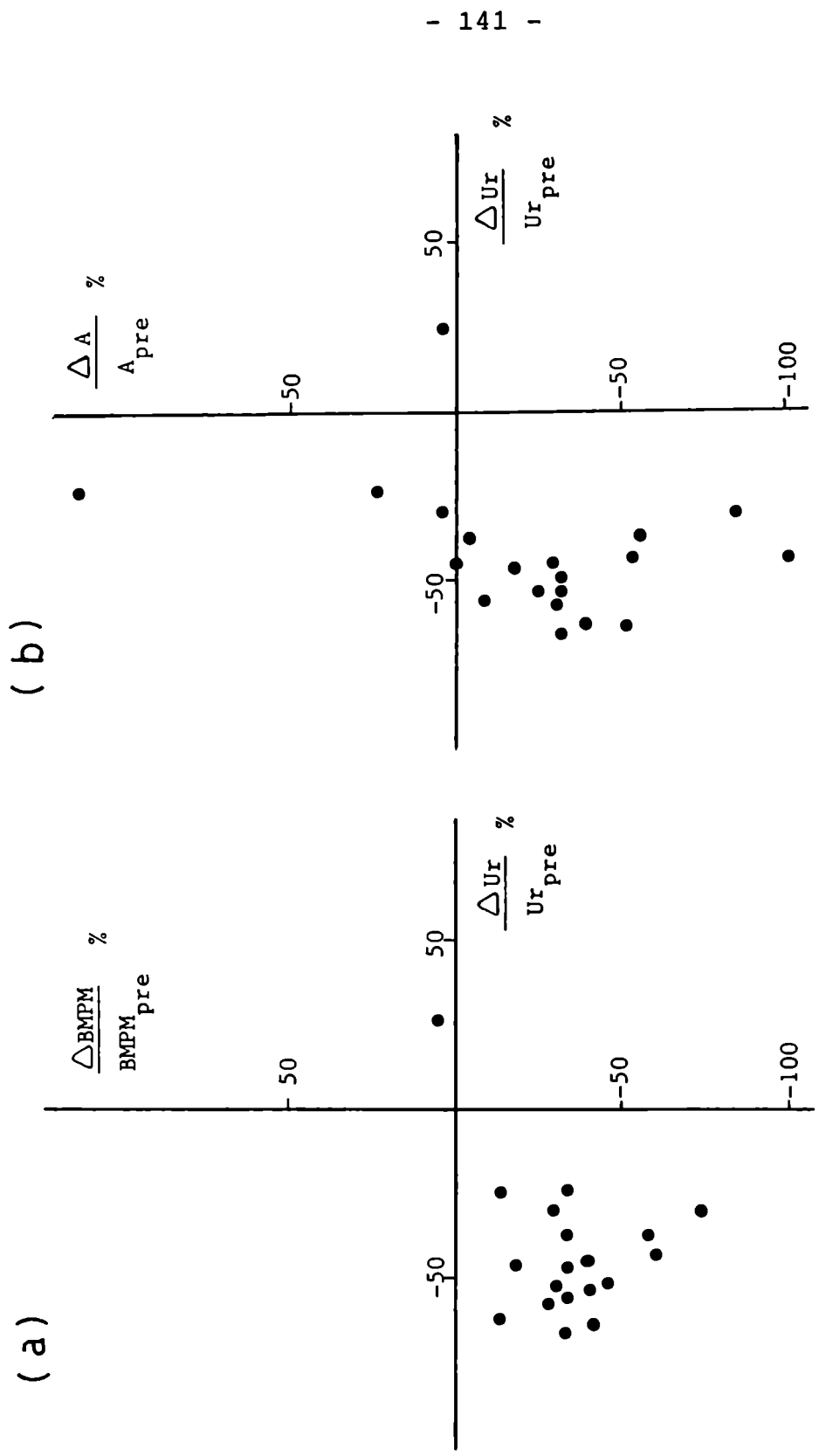


Figura 15.- Eliminación de sustancias por la diálisis. Disminuciones relativas de las concentraciones plasmáticas de las sustancias de BMPM totales (a) y de cada una de sus fracciones A (b), B (c) y C (d) en función de la disminución relativa de urea.

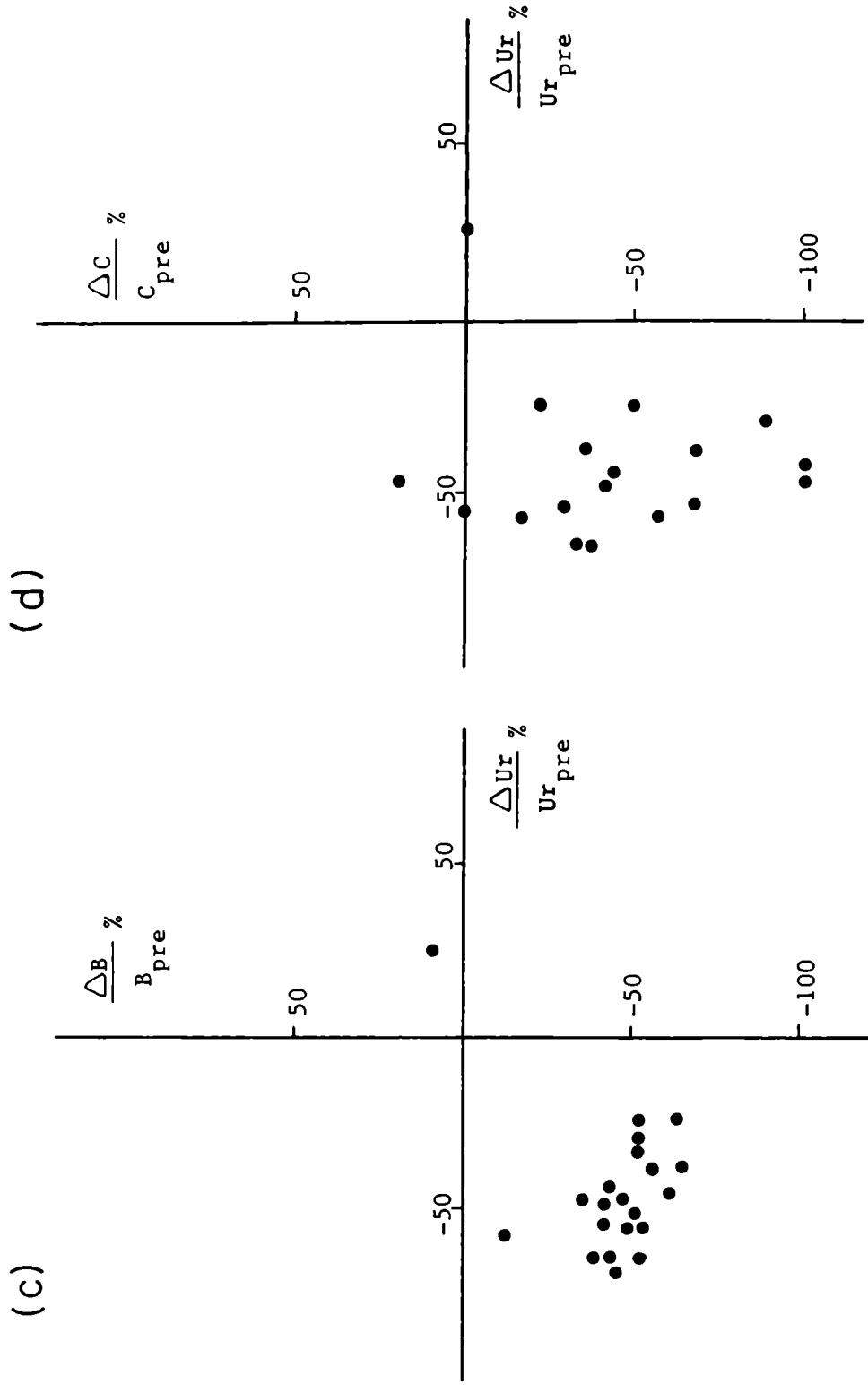


Figura 15.- Continuación.

la disminución de las sustancias de BMPM como resultado de una diálisis y la concentración plasmática de las mismas, determinada antes de comenzar la diálisis ( $r = 0,66$  ;  $0,001 < p < 0,01$ ). La recta descripta es la que resulta más útil desde el punto de vista práctico. Podrían haberse invertido las variables ya que ambas son aleatorias, por lo tanto, no se puede inferir una relación causa-efecto.

Conclusiones: (C)

- Se demostró que las sustancias plasmáticas de BMPM, con absorbancia en UV, son dializables a través de las membranas convencionales de hemodiálisis y de la membrana peritoneal.
- No se encontró correlación lineal entre la disminución relativa porcentual de sustancias de BMPM y las disminuciones de urea y creatinina, producidas por la diálisis.
- Se observó que la cantidad de sustancias de BMPM totales depuradas en una sesión de hemodiálisis está directamente relacionada con la concentración plasmática pre-diálisis de dichas sustancias.

1.4. VELOCIDAD DE ACUMULACION DE LAS SUSTANCIAS DE BMPM

En la Tabla XII se presentan datos correspondientes al

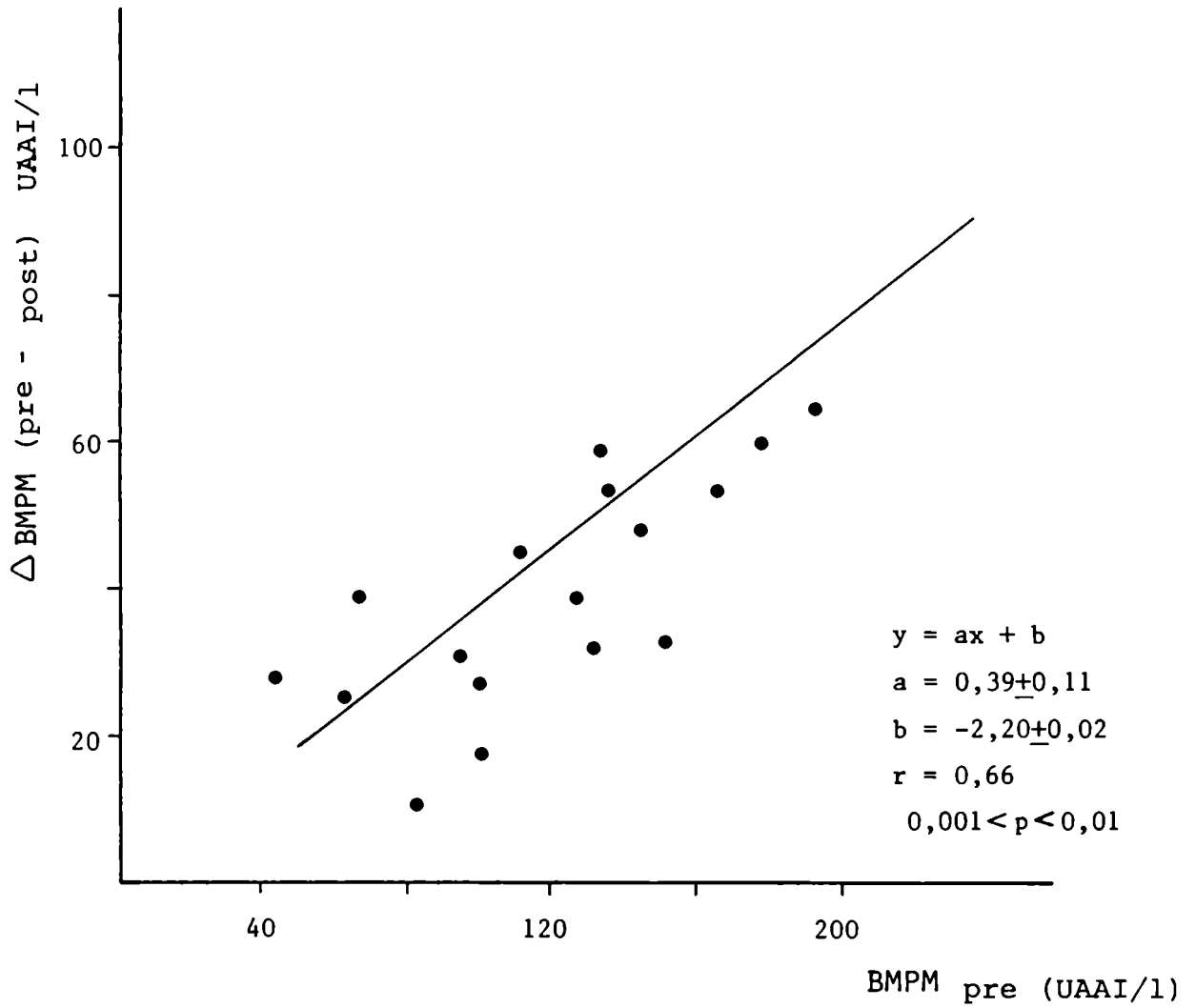


Figura 16.- Correlación entre la cantidad de sustancias de BMPM depuradas por una diálisis y la concentración plasmática pre-diálisis de dichas sustancias.



volumen minuto urinario (V) y a las concentraciones y depuraciones plasmáticas de las sustancias de BMPM totales, de las Fracciones A, B y C, de urea y de creatinina. Las determinaciones se realizaron previo al trasplante renal recibido por un paciente con IRC y en los días sucesivos al mismo hasta que se produjo el rechazo irreversible del órgano.

La Figura 17 (a) muestra las variaciones diarias de las determinaciones mencionadas. Después del trasplante se observó una disminución de sustancias de BMPM plasmáticas del 85-90% con respecto a los niveles previos al trasplante, (Figura 17 (a) III), alcanzándose valores normales ya al día siguiente de la operación, mientras que las concentraciones de urea y creatinina alcanzaron valores normales entre el 2do. y 3er. día. La concentración de las sustancias BMPM se incrementó progresivamente a medida que disminuía la función renal.

Las modificaciones porcentuales entre dos datos sucesivos de las diferentes determinaciones realizadas se grafican en la Figura 17 (b). Se observa un incremento precoz de las sustancias de BMPM totales (Figura 17 (b), III) del 143% y, en particular, de la Fracción A (Figura 17 (b), IV) del 300% entre el 3° y 5° día posterior a la operación. Durante ese período las restantes determinaciones no muestran, todavía, modificaciones bruscas.

Tabla XII.- Datos correspondientes al volumen urinario (V) y a las concentraciones y depuraciones plasmáticas de las sustancias de BMPM<sub>tot</sub>' de las fracciones A,B y C, de urea y de creatinina, previos y posteriores al trasplante renal

|                 | V<br>ml/min | CONCENTRACIONES PLASMATICAS |        |        |        |        |      |     |     |     |     | C <sub>BMPM</sub><br>ml/min | C <sub>A</sub><br>ml/min | C <sub>B</sub><br>ml/min | C <sub>CR</sub><br>ml/min | C <sub>ur</sub><br>ml/min |
|-----------------|-------------|-----------------------------|--------|--------|--------|--------|------|-----|-----|-----|-----|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                 |             | BMPM <sub>t</sub>           | A      | B      | C      | Creat. | Urea |     |     |     |     |                             |                          |                          |                           |                           |
|                 |             | UAAI/l                      | UAAI/l | UAAI/l | UAAI/l | mg/dl  | g/l  |     |     |     |     |                             |                          |                          |                           |                           |
| <u>PRE TR.</u>  | -           | 146                         | 53     | 84     | 9      | 9,1    | 1,1  | -   | -   | -   | -   | -                           | -                        | -                        | -                         | -                         |
| <u>POST TR.</u> |             |                             |        |        |        |        |      |     |     |     |     |                             |                          |                          |                           |                           |
| Día 1           | 2,9         | 16                          | 7      | 9      | 0      | 2,6    | 0,7  | 108 | 51  | 129 | 87  | 59                          |                          |                          |                           |                           |
| 2               | 3,4         | 17                          | 14     | 3      | 0      | 1,3    | 0,3  | -   | -   | -   | 110 | 62                          |                          |                          |                           |                           |
| 3               | 2,8         | 7                           | 3      | 4      | 0      | 0,9    | 0,2  | 254 | 176 | 297 | 110 | 183                         |                          |                          |                           |                           |
| 4               | -           | -                           | -      | -      | -      | 1,3    | 0,3  | -   | -   | -   | -   | -                           |                          |                          |                           |                           |
| 5               | 2,4         | 17                          | 12     | 5      | 0      | 1,2    | 0,4  | -   | -   | -   | 84  | 71                          |                          |                          |                           |                           |
| 6               | -           | -                           | -      | -      | -      | 1,2    | 0,4  | -   | -   | -   | -   | -                           |                          |                          |                           |                           |
| 7               | 0,9         | 16                          | 8      | 8      | 0      | 1,3    | 0,6  | 54  | 28  | 75  | 74  | 37                          |                          |                          |                           |                           |
| 8               | 1,4         | 36                          | 28     | 8      | 0      | 2,2    | 0,8  | 39  | 12  | 115 | 55  | 25                          |                          |                          |                           |                           |
| 9               | 0,2         | 53                          | 26     | 27     | 0      | 4,9    | 1,8  | 9   | 4   | 11  | 5   | 1                           |                          |                          |                           |                           |

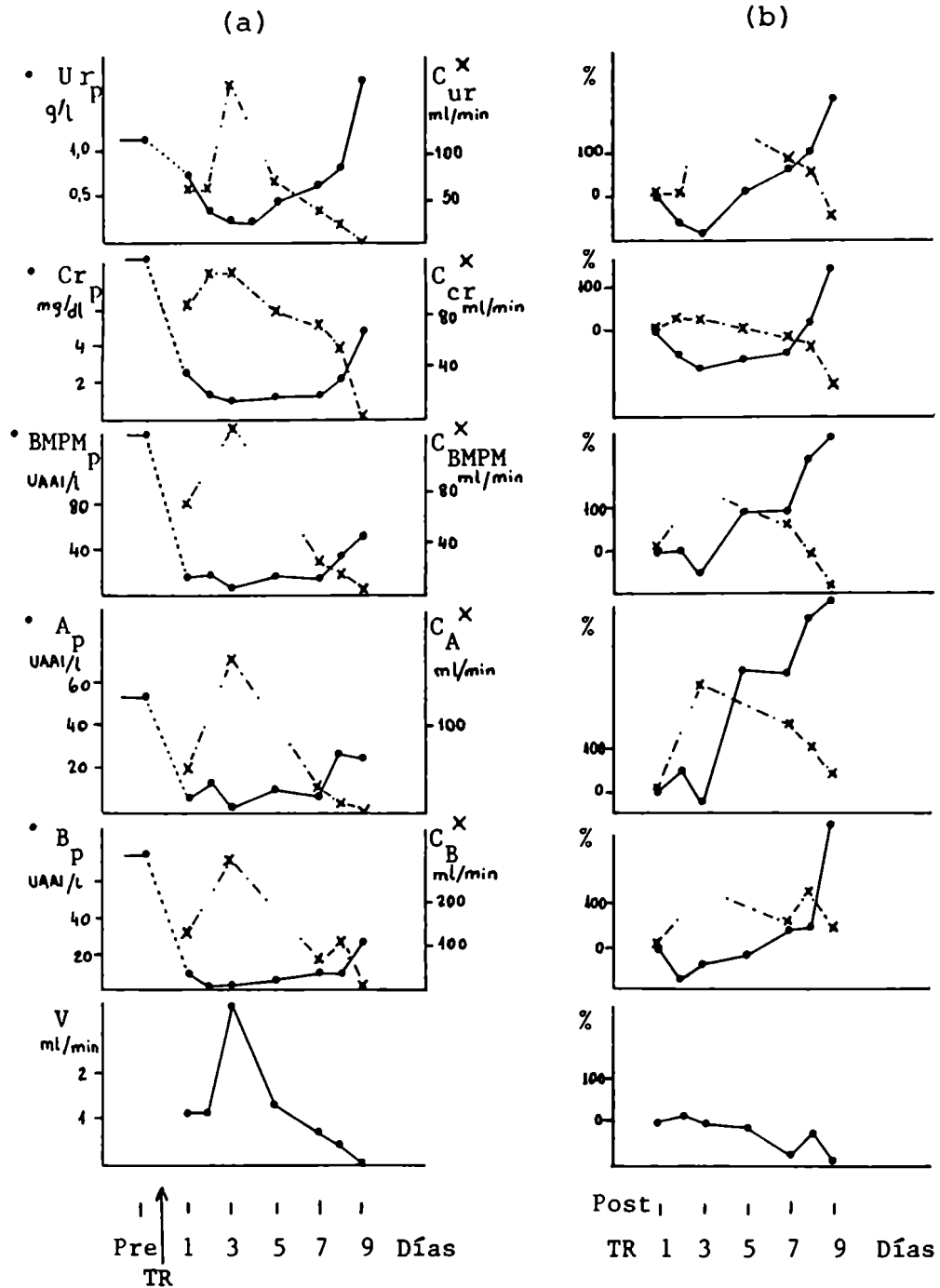


Figura 17.- (a) Variaciones de determinaciones realizadas en un paciente con IRC antes y en días sucesivos al trasplante renal. (b) Modificaciones porcentuales entre 2 datos sucesivos de las diferentes variables.

También se observó que, ya en 7 días, se alcanzan niveles plasmáticos de las sustancias de BMPM totales y de la Fracción A que constituyen 36% y 50%, respectivamente, de los valores promedio encontrados para las mismas durante el curso de la enfermedad, previo al trasplante renal.

La Figura 18 muestra que existe correlación lineal entre el  $C_{\text{BMPM}}$  y el  $C_{\text{ur}}$  ( $r = 0,99$ ;  $p < 0,01$ ), no encontrándose correlación entre el  $C_{\text{BMPM}}$  y el  $C_{\text{cr}}$  ni entre el  $C_{\text{BMPM}}$  y las concentraciones plasmáticas de urea o de creatinina.

La concentración plasmática de las sustancias de BMPM se correlacionó directamente con las concentraciones plasmáticas de creatinina ( $r = 0,92$ ;  $p < 0,01$ ) y de urea ( $r = 0,95$ ;  $p < 0,01$ ) e inversamente con el  $C_{\text{cr}}$  ( $r = -0,94$ );  $p < 0,01$ ).

La concentración plasmática de la Fracción A no se correlacionó con las variables  $\text{Urea}_p$ ,  $\text{Cr}_p$ ,  $C_{\text{ur}}$  y  $C_{\text{cr}}$ .

La concentración plasmática de la Fracción B se correlacionó directamente con las concentraciones plasmáticas de creatinina ( $r = 0,97$ ;  $p < 0,001$ ) y de urea ( $r = 0,98$ ;  $p < 0,001$ ) e inversamente con el  $C_{\text{cr}}$  ( $r = -0,91$ ;  $p < 0,01$ ).

Se realizó una curva de calibración de áreas integradas de los picos cromatográficos correspondientes a diferentes soluciones testigos de creatinina- en función de las concentraciones de creatinina. Considerando que la creatinina elu

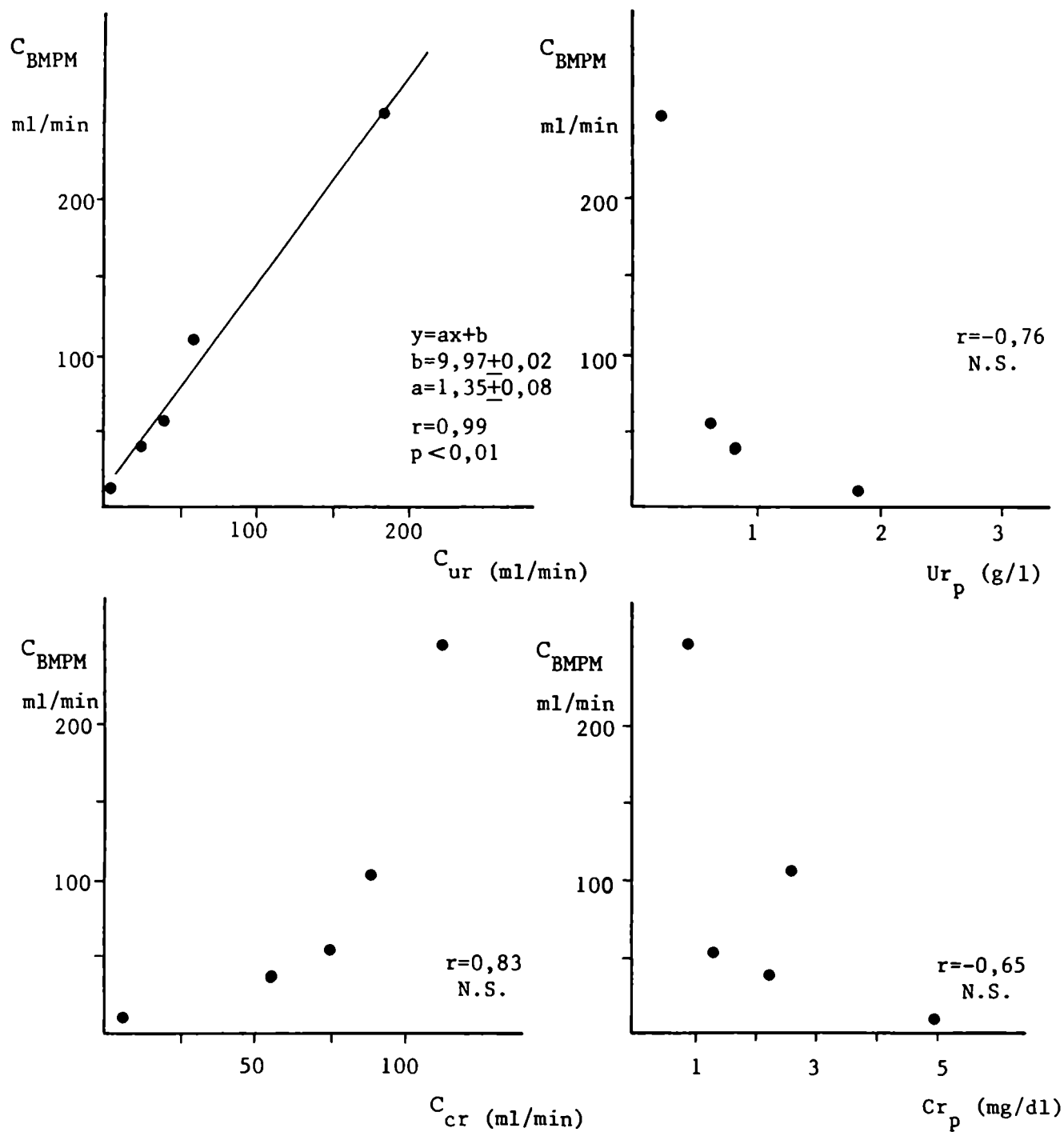


Figura 18.- Relaciones entre el  $C_{BMPM}$  y los  $C_{cr}$ ,  $C_{ur}$  y las concentraciones plasmáticas de creatinina y de urea después de un trasplante renal frente al rechazo del órgano.

ye dentro de la Fracción B de las sustancias de BMPM, se calcularon los valores de creatinina a partir de las áreas de los picos B, utilizando la curva de referencia mencionada. Se observa, en la Tabla XIII que los valores de creatinina calculados de esa manera, coinciden con los datos de creatinina plasmática determinada por el método químico, diferenciando, ambos valores, en el momento en que el daño es más importante (antes del trasplante o después del mismo cuando el rechazo fue irreversible).

Tres pacientes con IRA se estudiaron en forma secuencial hasta la recuperación.

La Figura 19 muestra los perfiles cromatográficos plasmáticos de un paciente, correspondiente al comienzo de la enfermedad y al período de recuperación, cuando se ha restablecido la diuresis. Se observa que en esta última etapa, la concentración de sustancias de BMPM descendió hasta valores normales. En ese momento los datos de concentración de creatinina plasmática y de  $C_{cr}$  eran 1,8 mg/100 ml y 38 ml/min, respectivamente.

Los otros dos pacientes presentaron resultados similares al anterior.

Conclusiones: (D)

- Se observó que la concentración plasmática de sustancias

Tabla XIII.- Datos de creatinina calculada a partir de las áreas de los picos B. Comparación con los valores de creatinina plasmática determinada por método químico, antes y después del trasplante renal

| MUESTRAS            | Creatinina <sub>pl</sub><br>determinada<br>(mét. químico)<br>mg/dl | Creatinina <sub>pl</sub><br>calculada<br>(mét. cromat.)<br>mg/dl |
|---------------------|--|--|
| <u>PRE TRASPL.</u>  | 9,1  | 21,6   |
| <u>POST TRASPL.</u> |  |  |
| Día 1               | 2,6  | 2,8  |
| 2                   | 1,3  | 0,7  |
| 3                   | 0,9  | 1,0  |
| 5                   | 1,2  | 1,3  |
| 7                   | 1,3  | 2,1  |
| 8                   | 2,2  | 2,1  |
| 9                   | 4,9  | 6,9  |

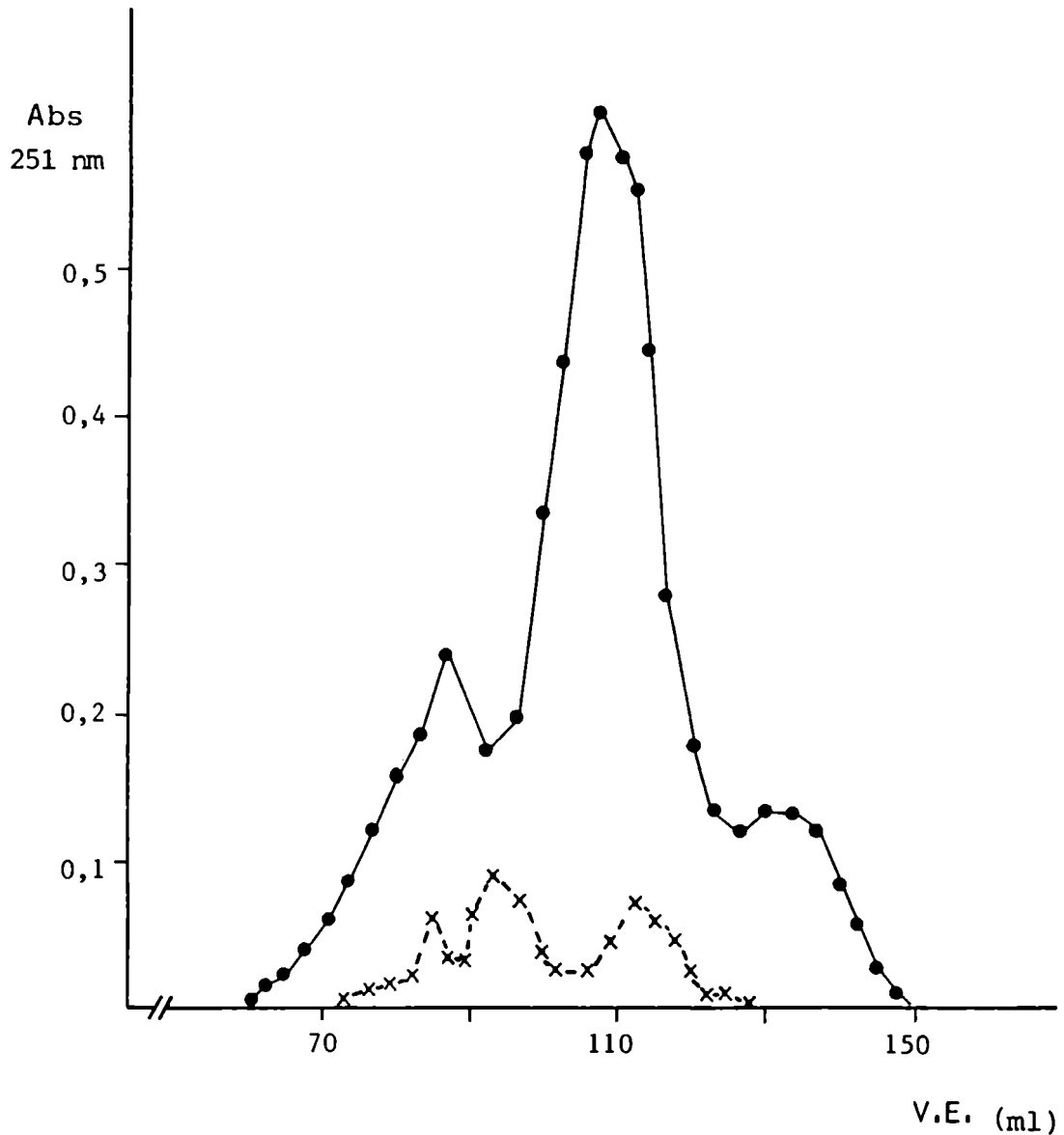


Figura 19.- Perfiles cromatográficos plasmáticos de un paciente con IRA, correspondientes al comienzo de la enfermedad (●—●) y al período de recuperación (x---x). El fraccionamiento se realizó según el método descrito en la Fig. 4.



de BMPM se normaliza cuando se restablece la función renal, después del trasplante.

- En el caso estudiado, se encontró que la Fracción A aumentó precozmente frente a un rechazo del órgano trasplantado.
- Al comenzar la evolución desfavorable del trasplante la creatinina pareció ser el único componente de la Fracción B, agregándose otras sustancias en dicha fracción, a medida que progresa el daño renal.
- La concentración plasmática de sustancias de BMPM aumentó rápidamente con la disminución progresiva de la función renal y disminuyó hasta valores normales con el restablecimiento de la misma.

## 2. Estudios de identificación de las sustancias de BMPM

### 2.1. SEPARACION DE LOS COMPONENTES DE BMPM MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA POR ALTA PRESION

Las Figuras 20 y 21 muestran los fraccionamientos de ultrafiltrados plasmáticos ( $PM < 10000$  g/mol) de sujetos controles (a) y de pacientes urémicos (b) cuando se empleó cromatografía líquida por alta presión (HPLC) en fase reversa. Se observa el diferente contenido de sustancias con absorban -

Figura 20.- Fraccionamiento de ultrafiltrados plasmáticos (PM < 10 000 g/mol) de un sujeto control y de un paciente con IRC, mediante cromatografía líquida de alta presión.

Condiciones de la cromatografía:

Columna:  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> (módulo de compresión radial).

Eluyente: acetato de sodio 25 mmol/l, pH=4,5.

Detector: UV (254 nm); escala 0,1.

Flujo: 1,0 ml/min.

Temperatura ambiente.

Figura 20.-

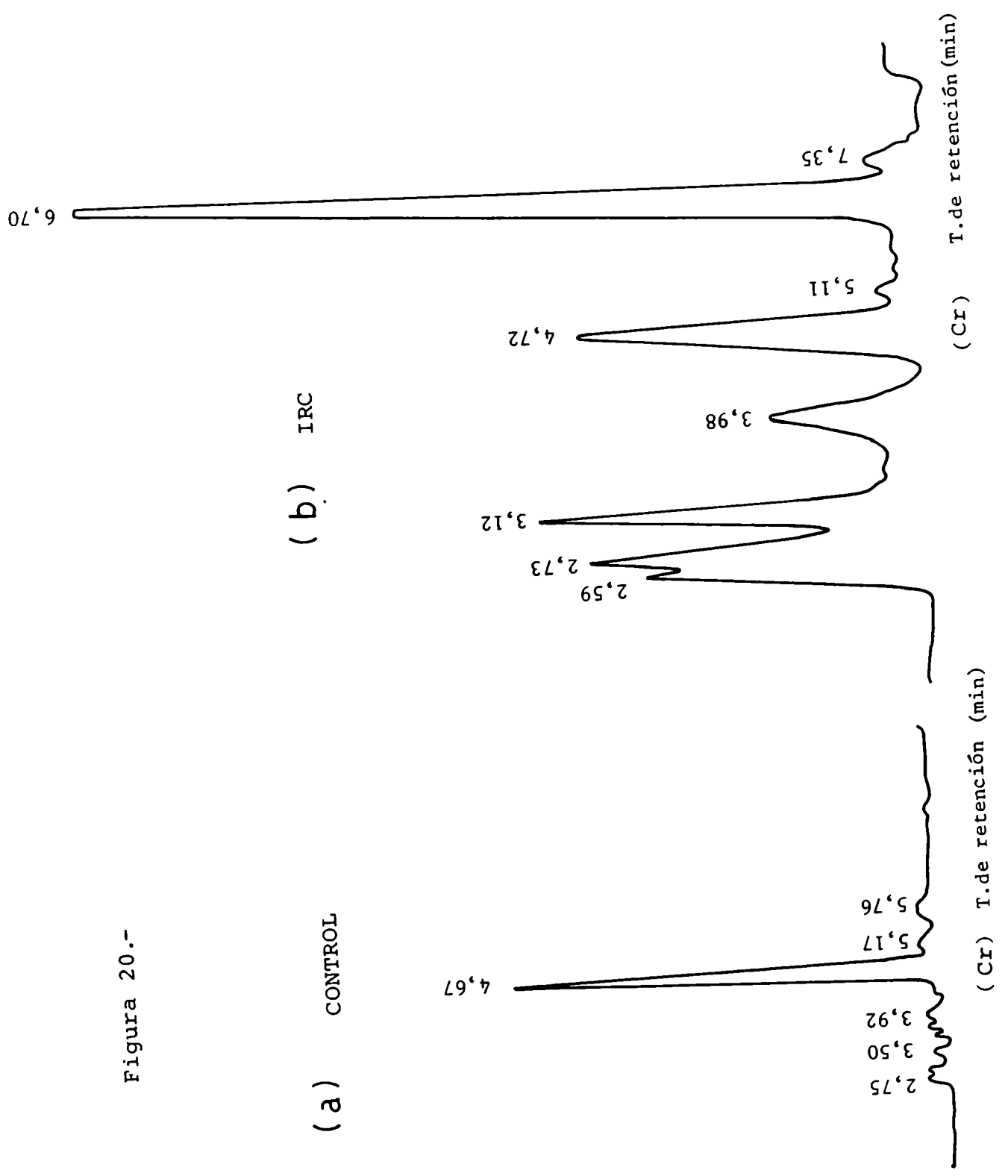


Figura 21.- Fraccionamiento del ultrafiltrado plasmático (PM < 10 000 g/mol) correspondiente a un paciente con IRC, mediante cromatografía líquida de alta presión.

Condiciones de la cromatografía:

Columna:  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> (módulo de compresión radial).

Volumen de inyección: 25  $\mu$ l.

Eluyente: a) inicial: acetato de sodio 25 mmol/l de pH= 4,5; b) final: ácido acético 0,1 mo/l en metanol. Gradiente cóncavo en 90 min.

Flujo: 1,0 ml/min.

Detector: UV (254 nm).

Temperatura ambiente.

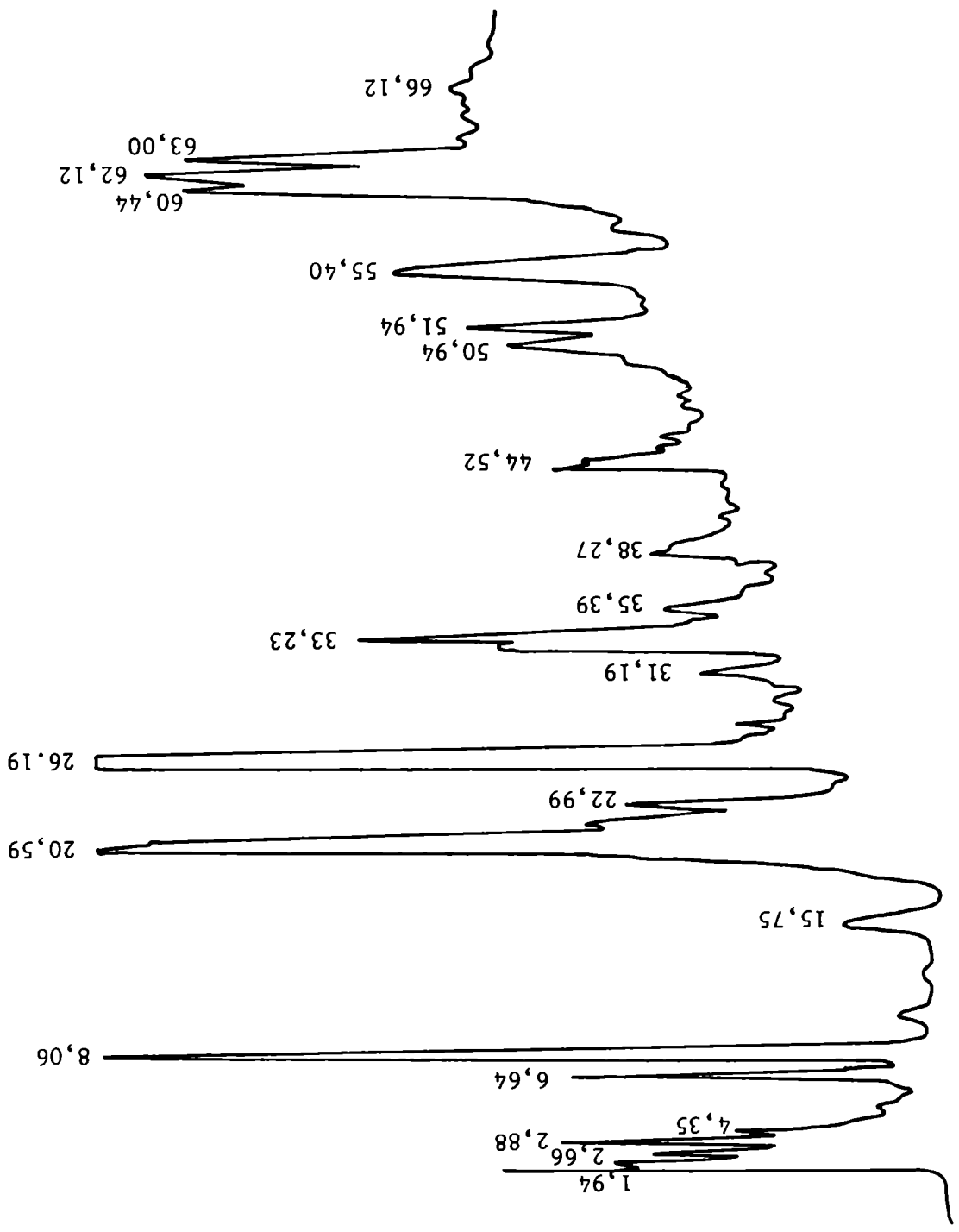


Figura 21.-

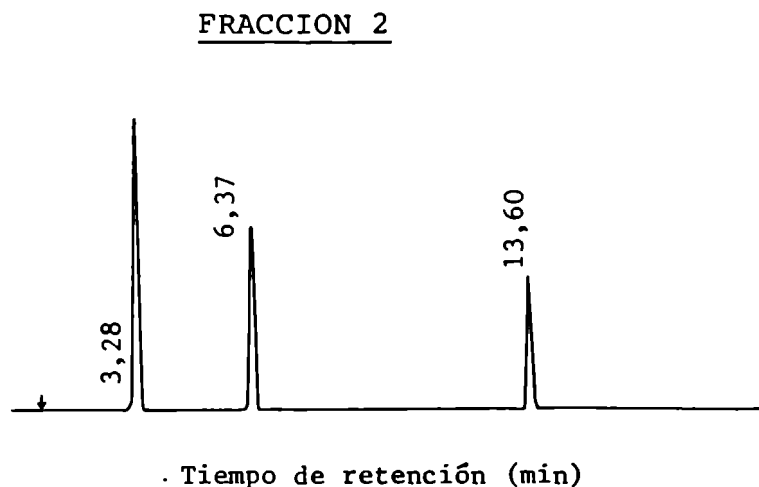


Figura 22.- Separación, por cromatografía líquida de alta presión, de sustancias con absorbancia en UV de las fracciones plasmáticas de IRC acotadas por PM según el procedimiento descrito en la Fig.7.

Condiciones de la cromatografía:

Columna:  $\mu$ -Bondapak  $C_{18}$  (módulo de compresión radial).

Volumen de inyección 25  $\mu$ l

Eluyente: a) inicial:  $KPO_4H_2$  20 mmol/l (pH=5,7);  
b) final: metanol:H<sub>2</sub>O (3:2, v/v).Gradiente lineal , de 0 a 40% del eluyente final en 35 min. Flujo: 1,5 ml/min.

Detector: UV (254 nm).

Temperatura ambiente.

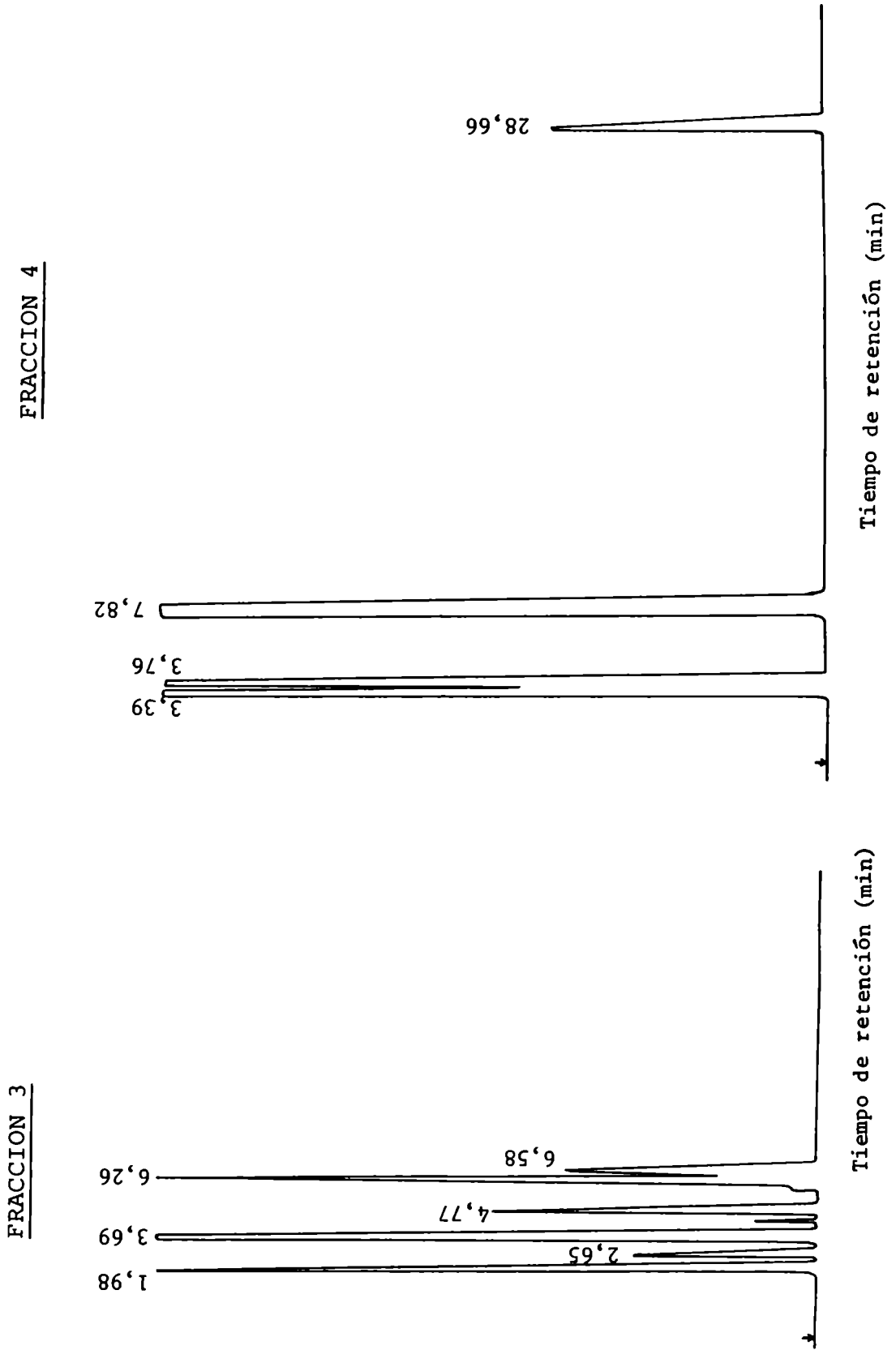


Figura 22.- Continuación.

cia en UV entre ambos grupos (C e IRC) y la gran cantidad de componentes de BMPM en las muestras urémicas. El pico CR, presente en los sujetos controles y, en mayor concentración, en los pacientes urémicos corresponde a la creatinina ( por comparación con testigos).

En la Figura 22 se observa la composición de sustancias con absorbancia en UV de las fracciones plasmáticas de IRC acotadas por pesos moleculares mediante membranas de ultrafiltración selectiva (PM-10 UM-02 y UM-05) como se mostró en la Fig. 7. El fraccionamiento se realizó por cromatografía líquida por alta presión. Se observa la presencia de varias sustancias componentes de cada fracción.

## 2.2. ESPECTROS DE ABSORCION EN EL UV DE LAS FRACCIONES CROMATO- GRAFICAS

La Fracción B presentó, en todos los estudios efectuados en orinas normales y en diversas muestras de pacientes urémicos (plasma de IRA e IRC, sin y con tratamiento dialítico, orinas, líquidos de hemodiálisis y de dializado peritoneal) un espectro de absorción característico con un único máximo de absorción a 240-250 nm (Figura 23 (a)). Si bien la creatinina, que eluye dentro de esta fracción, presenta un espectro parecido con un único máximo de absorción a 260 nm,



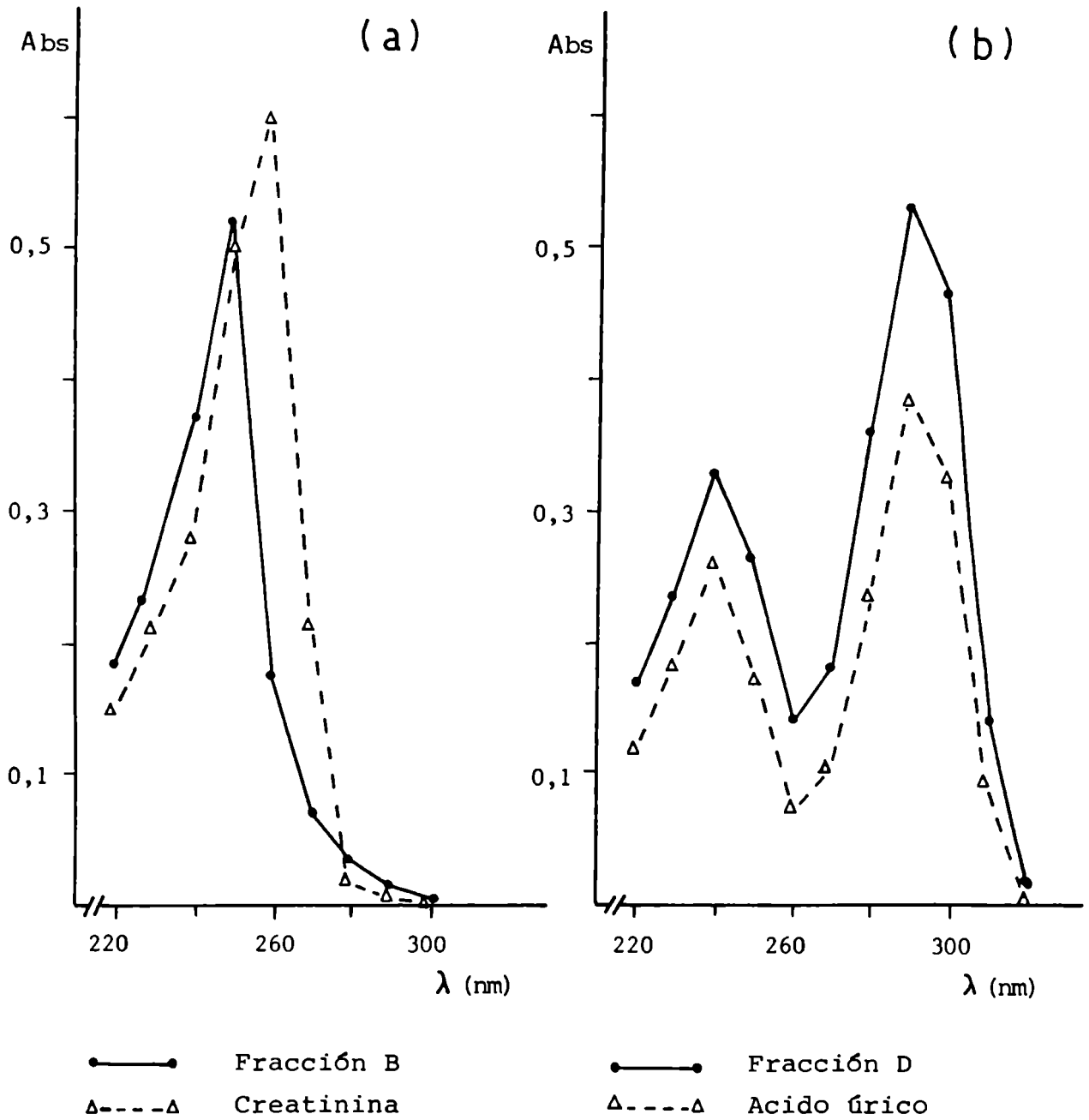


Figura 23.- Espectros de absorción en el UV de las Fracciones B (a) y D (b); comparación con los de soluciones testigos de creatinina y ácido úrico, respectivamente.

el mismo no es afectado por grandes variaciones de pH como lo es el de la Fracción B.

La Fracción D mostró un espectro de absorción característico con dos máximos de absorción en el rango de longitudes de onda estudiado, uno a 240 y otro a 290 nm (Figura 23 (b)). El ácido úrico con volumen de elución dentro de la Fracción D tiene el mismo espectro de absorción que dicha fracción y ambos espectros se modifican en el mismo sentido frente a alteraciones drásticas de pH.

Las Fracciones A y C no presentaron valores máximos característicos en su espectro de absorción en el UV, entre 230 y 320 nm, o, bien, en algunos casos, pequeños picos que no se reprodujeron siempre a la misma longitud de onda.

### 2.3. DETECCION DE SUSTANCIAS PEPTIDICAS

a) Con el método de determinación cuantitativa de aminoácidos empleado, por reacción con ninhidrina, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de N  $\alpha$ -amínico libre de los ultrafiltrados plasmáticos (PM < 10 000 g/mol) de los sujetos controles y de los pacientes urémicos crónicos. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

UF sujetos controles:

$3,0 \pm 1,32$  mg N  $\alpha$ - a.á./100 ml (n = 5)

UF pacientes IRC :

$3,3 \pm 1,68$  mg N  $\alpha$ - a.á./100 ml (n = 8)

No se detectaron sustancias ninhidrina positivas en los eluidos cromatográficos obtenidos de plasma de pacientes urémicos (IRC e IRA) ni de plasmas controles.

b) Se pudieron detectar péptidos, en los eluidos urémicos, mediante el reactivo de Folin-Cicolteau.

La Figura 24 muestra una curva de elución característica de sustancias de BMPM presentes en el plasma de un paciente con IRA antes de comenzar con el tratamiento dialítico. Se graficaron las absorbancias a 251 y 280 nm y la concentración peptídica de cada fracción recolectada.

El máximo de absorción a 280 nm se encontró en la Fracción A, mostrando el análisis químico de los péptidos el mismo perfil. Este paralelismo entre la curva de absorción a 280 nm y la concentración peptídica se encontró en todos los pacientes con IRA (sin diálisis) estudiados (n = 5),

La concentración de las sustancias peptídicas fue menor en los eluidos cromatográficos de las muestras plasmáticas obtenidas inmediatamente después de una diálisis en los mismos pacientes con IRA.

Los plasmas de pacientes con IRC que nunca recibieron diálisis (n = 5) presentaron perfiles cromatográficos en los que la curva de absorción a 280 nm y la de concentración peptídica son coincidentes con la Fracción A a 251 nm (Figura 25). Las concentraciones peptídicas fueron en todos los casos, menores que las de los pacientes con IRA. Esquemas semejantes presentaron las muestras pre-diálisis de 10 de 16 pacientes con IRC sometidos a tratamiento de hemodiálisis crónica. En los 6 restantes no se pudieron detectar sustancias peptídicas.

El estudio de las muestras del plasma de estos pacientes después de la diálisis mostró, en 2 de los 10 pacientes que presentaban sustancias peptídicas, cantidades no detectables de las mismas y, en los 8 restantes, concentraciones peptídicas menores con respecto a las de pre-diálisis.

La Figura 26 muestra el hallazgo de compuestos peptídicos en un líquido de dializado peritoneal y en un ultrafiltrado de hemofiltración.

c) Los resultados de las determinaciones cuantitativas de péptidos realizadas en los eluidos cromatográficos son consistentes con los que mostraron las fracciones (2+3) de PM intermedio, entre 500 y 10 000 g/mol, obtenidas por fraccionamiento a través de membranas selectivas (Fig.7).

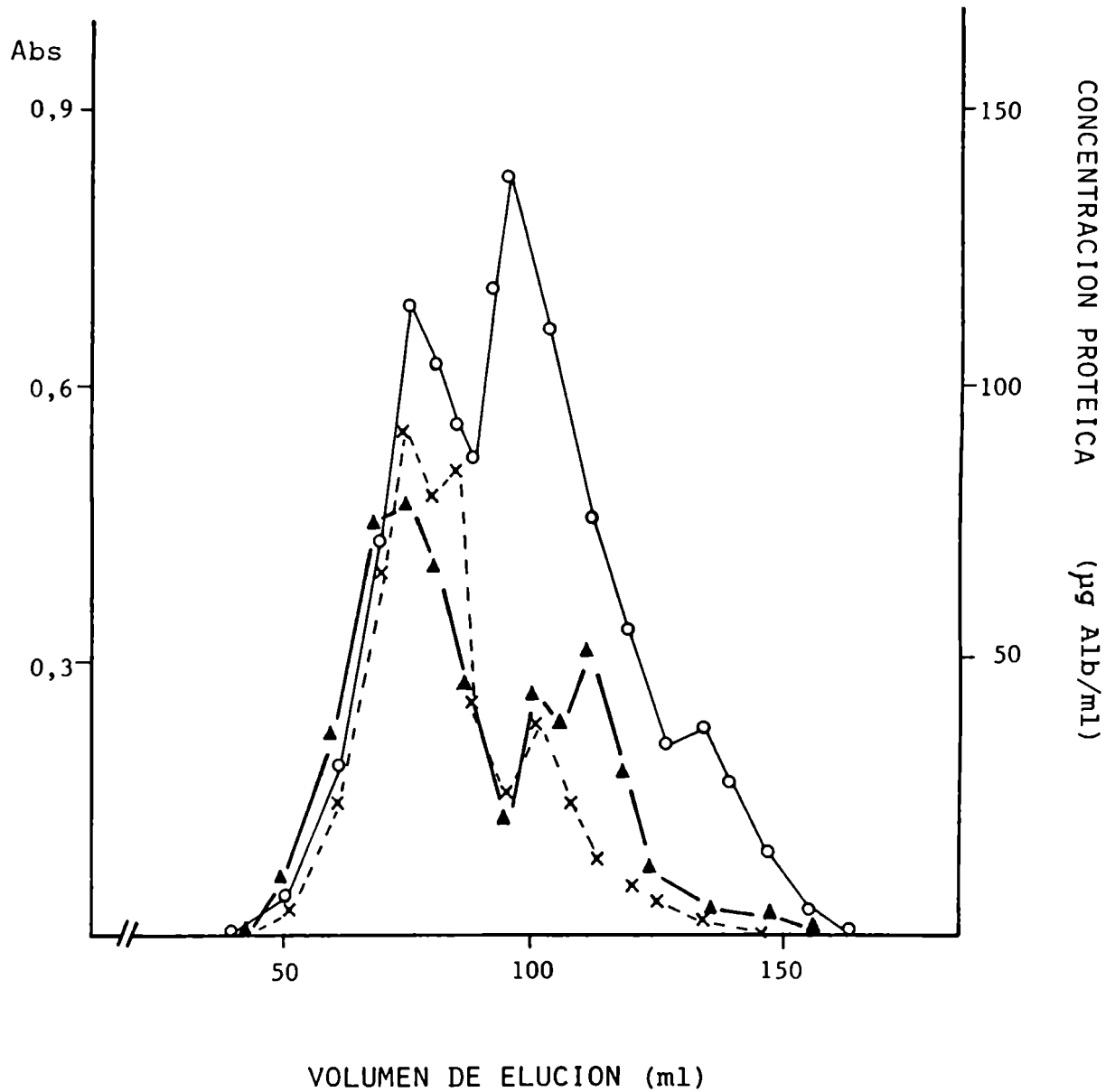


Figura 24.- Curva de elución de sustancias de BMPM del plasma de 1 paciente con IRA, sin diálisis. Fraccionamiento según el método descrito en la Fig.4.  
 Detección: o—o absorbancia a 251 nm; x--x absorbancia a 280 nm; ▲—▲ determinación de péptidos.

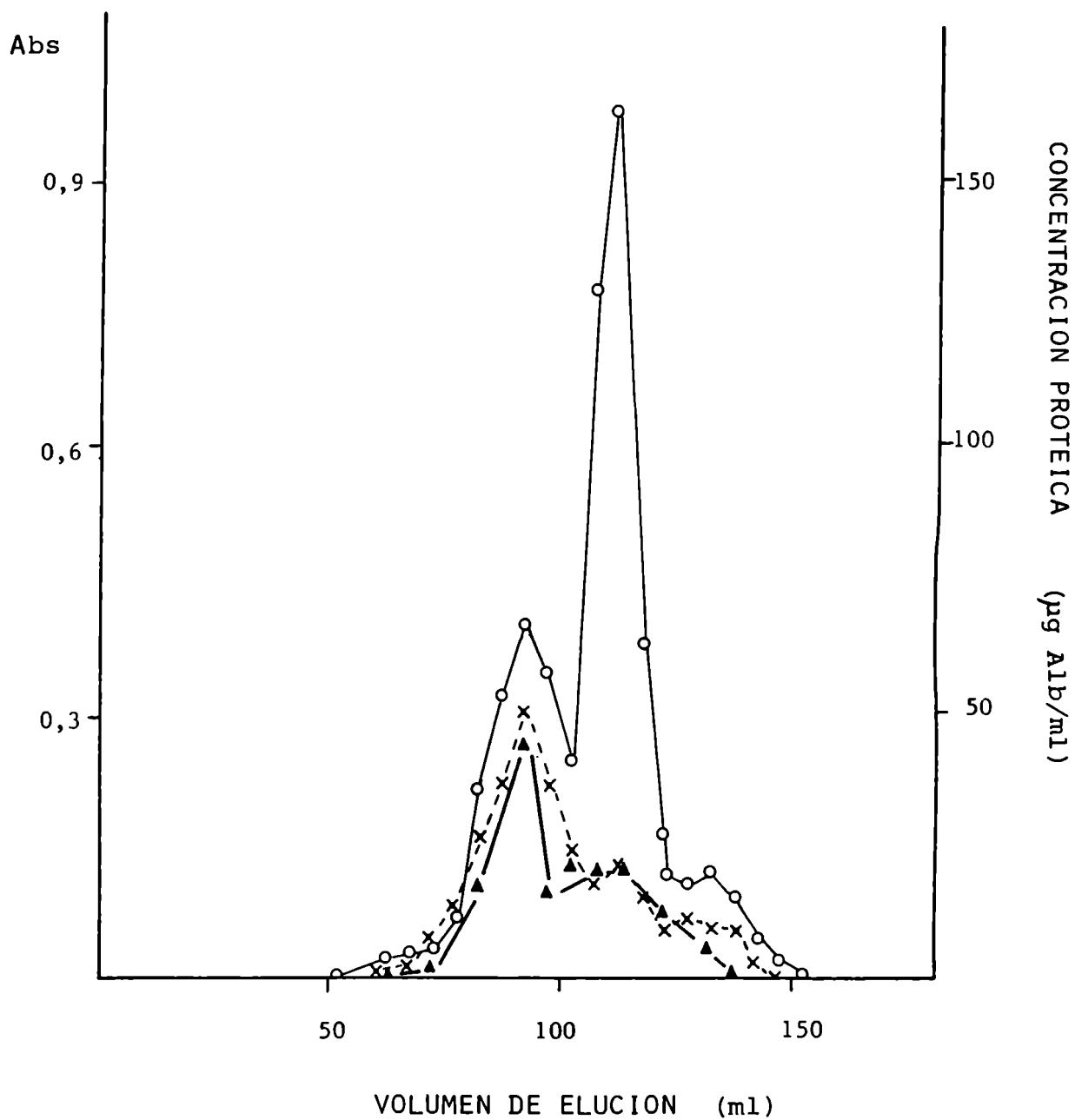


Figura 25.- Curva de elución de sustancias de BMPM del plasma de 1 paciente con IRC, sin diálisis. Fraccionamiento según el método descrito en la Fig.4. Detección: o—o absorbanca a 251 nm; x---x absorbanca a 280 nm; ▲—▲ determinación de péptidos.

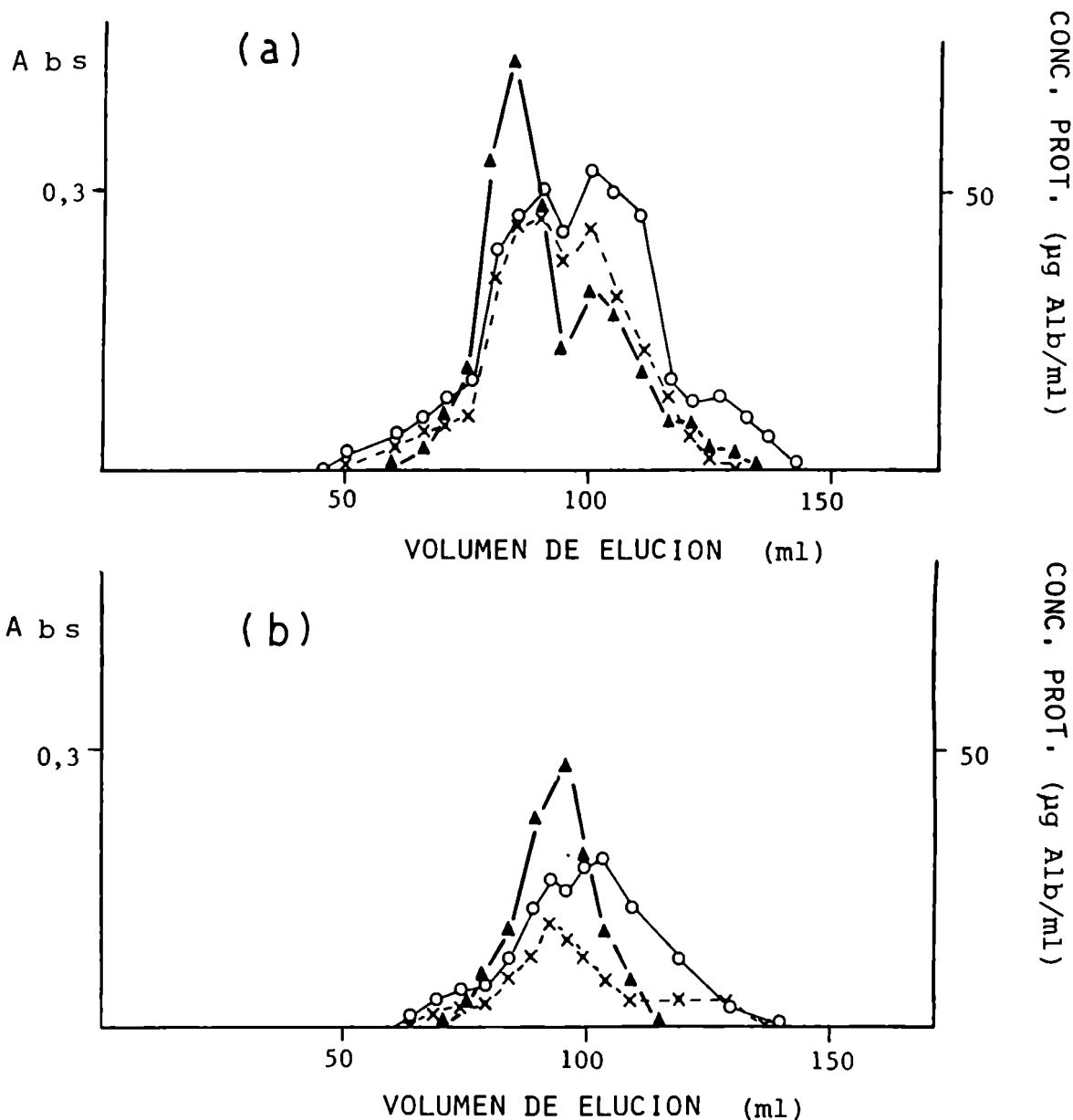


Figura 26.- Curva de elución de sustancias de BMPM de líquidos de dializado: (a) de hemofiltración (conc.x 2); (b) peritoneal (conc.x 3) de pacientes con IRC en tratamiento dialítico. Fraccionamiento según el método descrito en la Fig.4.

Detección: o—o absorbancia a 251 nm; x--x absorbancia a 280 nm; ▲—▲ determinación de péptidos.

Los valores en estas fracciones fueron los siguientes:

IRA sin diálisis:  $81,0 \pm 3,2$   $\mu\text{g/ml}$  (n = 5)

IRC sin diálisis:  $42,5 \pm 2,9$   $\mu\text{g/ml}$  (n = 5)

IRC pre-diálisis:  $20,5 \pm 3,8$   $\mu\text{g/ml}$  (n = 5)

Los valores se refieren a la albúmina empleada como testigo.

En la Figura 27 se muestran los diagramas electroforéticos correspondientes a las fracciones plasmáticas (2 + 3) , con PM > de 500 g/mol y (4) con PM < 500 g/mol. Estas fueron obtenidas, según el diagrama de la Fig. 7, del plasma de pacientes con IRA (n = 5) y con IRC (n = 5).

El fraccionamiento electroforético se realizó empleando EAV. En la fracción (2 + 3) se encontró una banda "X" ninhidrina positiva, con movilidad electroforética semejante a la de la glutamina. En la fracción (4) se encontraron los aminoácidos libres característicos del plasma.

En la Figura 28 se pueden comparar los diagramas electroforéticos de las fracciones (2 + 3) correspondientes a plasma y orina controles con el diagrama de la fracción(2 + 3) del plasma de un paciente con insuficiencia renal. Se observa que la banda "X" en estudio está ausente del plasma del sujeto control mientras que se encuentra en la orina de dicho individuo.

La banda "X" no se encontró en el dializado peritoneal.



IRC

IRA

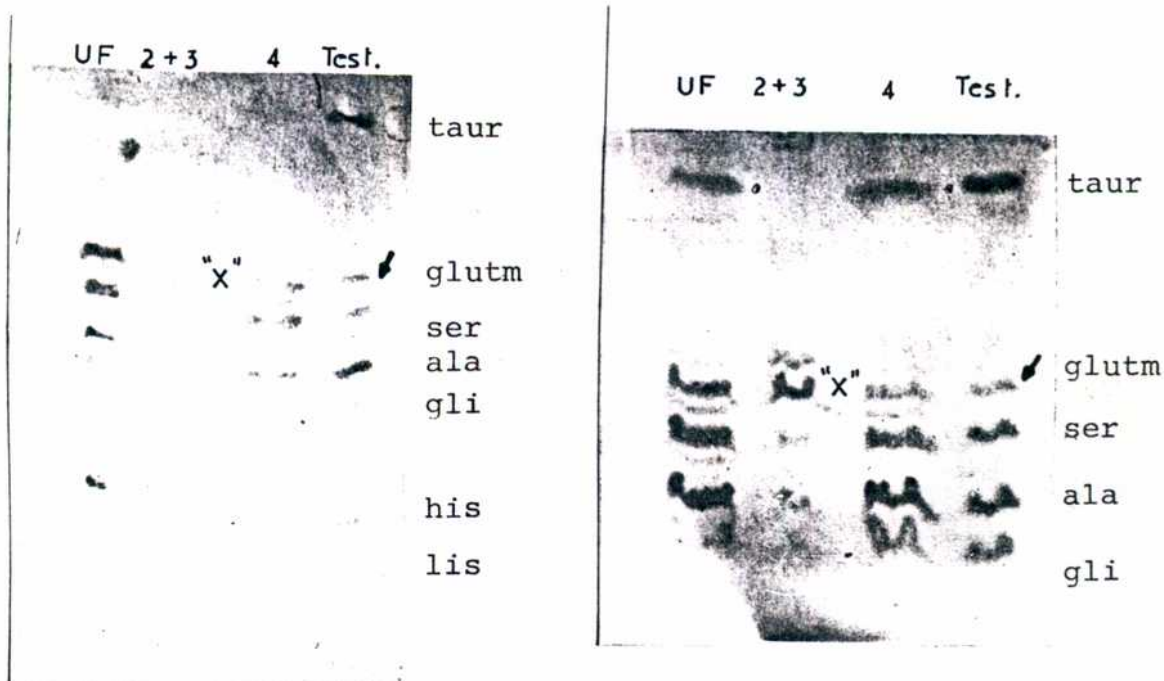
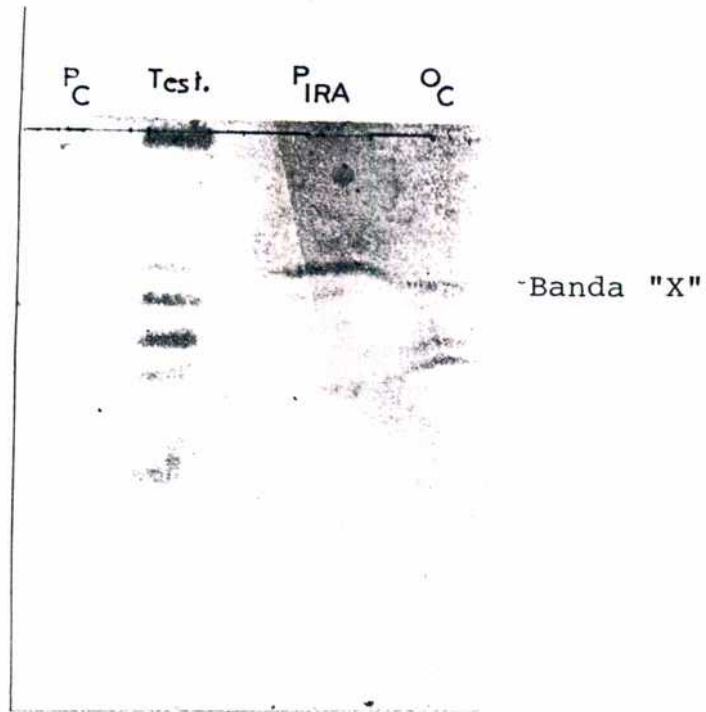


Figura 27.- Diagramas electroforéticos (EAV) correspondientes a UF totales plasmáticos ( $PM < 10\ 000$  g/mol) y a las fracciones (2+3), de  $PM > 500$  g/mol y (4), de  $PM < 500$  g/mol, de pacientes con IRC y con IRA, obtenidas como se describe en la Fig.7.



- Figura 28.- Diagramas electroforéticos (EAV) correspondientes a las Fracciones (2+3) de plasma ( $P_C$ ) y orina ( $O_C$ ) controles y de plasma de un paciente con IRA ( $P_{IRA}$ ).

El hidrolizado de la fracción (2 + 3), proveniente del plasma de pacientes con IRA, produjo la liberación de distintos aminoácidos, cuyas velocidades electroforéticas y propiedades de tinción coincidieron con las de testigos de glutamina, serina, alanina, glicina e histidina (Figura 29). Estudios cualitativos con reactivos de revelación específicos confirmaron la presencia de histidina y permitieron detectar aminoácidos sulfurados, como cistina o cisteína (indistinguibles porque ambos tienen la misma movilidad electroforética en el medio empleado).

El hidrolizado de la fracción (2 + 3) proveniente del plasma de pacientes con IRC mostró la presencia de varios aminoácidos, los que no se pudieron individualizar por reactivos de tinción específicos.

Cuando la electroforesis por alto voltaje se realizó empleando solución reguladora de piridina, de pH 4,7, la fracción (2 + 3) se desplazó hacia el cátodo junto con los testigos básicos ornitina, lisina y arginina.

d) La electroforesis en gel de poliacrilamida de los ultrafiltrados totales ( $PM < 10\ 000$  g/mol) y de la fracción (2 + 3) ( $PM$  entre 500 y 10 000 g/mol), provenientes de las mismas muestras del plasma de los pacientes con IRA utilizadas para la separación por EAV, permitieron detectar la presencia de

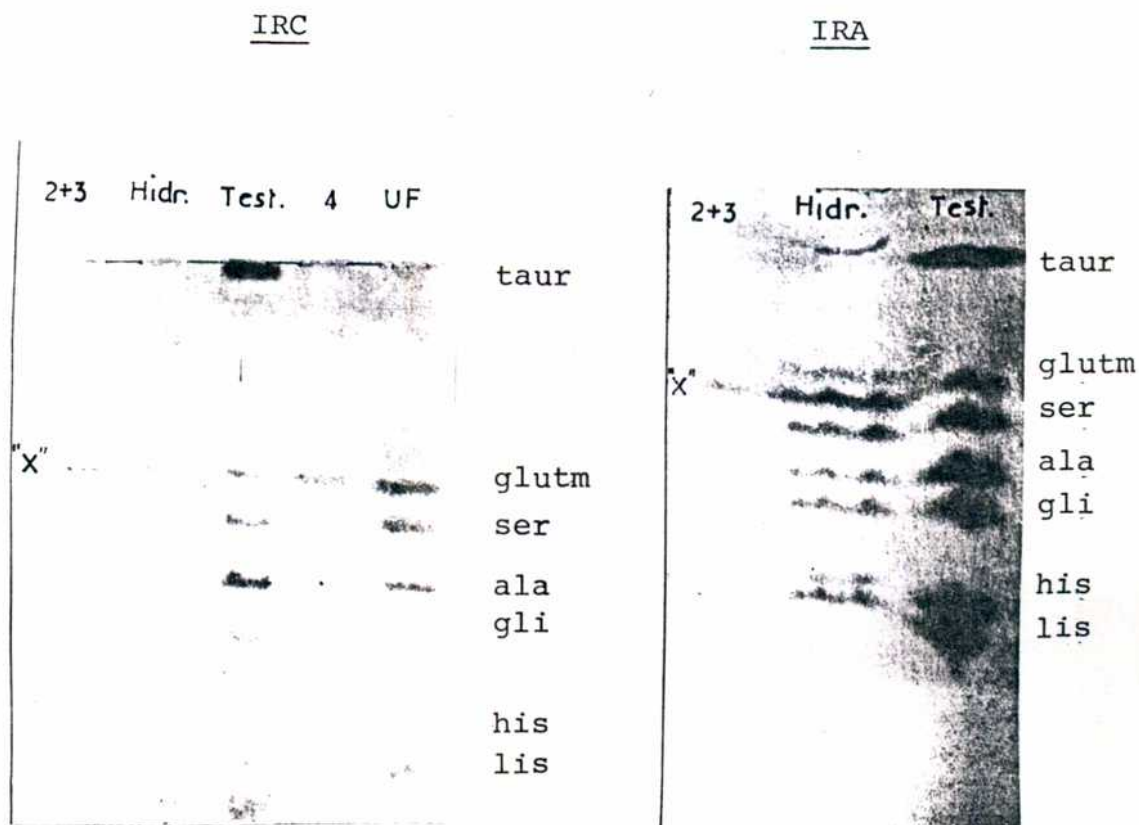


Figura 29.- Diagramas electroforéticos (EAV) correspondientes al hidrolizado de las fracciones (2+3), provenientes de plasmas con IRC y con IRA. Las muestras de IRC se pueden comparar con las corridas electroforéticas de los UF totales y de las fracciones (2+3) y (4).

UF      2+3

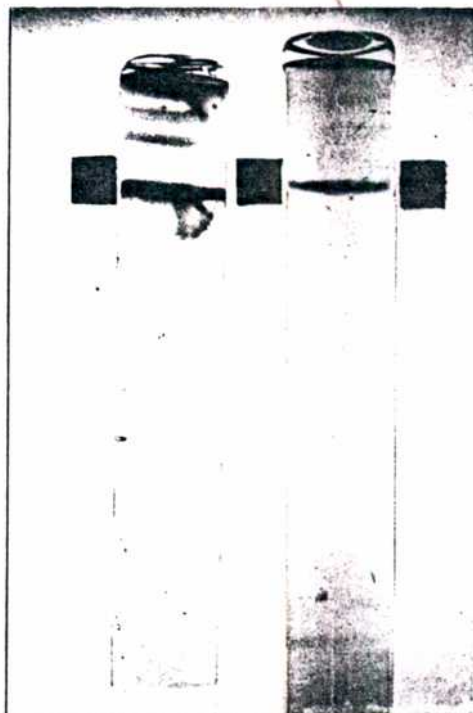


Figura 30.- Electroforesis en gel de poliacrilamida del UF total,  $PM < 10\ 000$  g/mol y de la fracción (2+3), de  $PM$  entre 500 y  $10\ 000$  g/mol, provenientes del plasma de un paciente con IRA.

3 bandas, coloreadas con azul de Coomasie, en el ultrafiltrado total y de una banda nítida y dos más tenues en la fracción (2 + 3) (Figura 30).

No se detectaron bandas electroforéticas en la fracción (2 + 3) ni en el ultrafiltrado total de los plasmas de los pacientes con IRC mediante electroforesis en gel de poliacrilamida.

#### 2.4. ENSAYOS CUALITATIVOS

a) Las reacciones cualitativas sobre papel de filtro fueron realizadas en los residuos reconstituídos de las Fracciones A, B y C. Resultaron negativas las pruebas para los siguientes grupos: monosacáridos, alcoholes de monosacáridos, sustancias reductoras, desoxiazúcares y mucopolisacáridos.

b) Ya se mencionó la presencia de sustancias ninhidrina positivas detectadas después de la EAV de fracciones obtenidas por ultrafiltración. Se encontraron aminoácidos libres en la fracción (4) de  $PM < 500$  g/mol y compuestos peptídicos en la fracción (2 + 3) de  $PM > 500$  g/mol

c) Se detectó la presencia de fósforo (debido a fosfatos libres o a compuestos orgánicos fosforados) en el residuo re-

constituido de la Fracción B del cromatograma plasmático de pacientes con IRA e IRC.

d) Después del desarrollo de la cromatografía de Wyatt para separación e identificación de nucleótidos se observaron varias manchas con fluorescencia a 254 nm en los residuos reconstituidos de las Fracciones A y B de los pacientes urémicos, pero los  $R_f$  de las mismas no coincidieron con los de las bases púricas ni pirimidínicas.

e) Se encontraron varios compuestos con intensa fluorescencia con excitación a 254 nm al exponer los papeles del fraccionamiento por EAV de las fracciones (1) (2 + 3) y (4) de los pacientes urémicos. Dicha fluorescencia estuvo ausente en los controles.

Esos compuestos no pudieron ser identificados, aún cuando se los compararon con diversas sustancias que presentaban fluorescencia similar a esa longitud de onda. No parecieron corresponder a vitaminas ni otros medicamentos recibidos por los pacientes.

f) Urea: dentro del volumen de elución correspondiente a la Fracción B se detectó la presencia de urea mediante:

- Método químico
- Fraccionamiento por EAV y detección con el reactivo de Ehrlich. Se caracterizó por su velocidad de migración electroforética y propiedades de tinción en comparación con testigo de urea.

g) Se detectó la presencia de creatinina dentro de los eluidos de la Fracción B mediante:

- Cromatografía de elución de una solución testigo de creatinina en el sistema empleado para el trabajo (Fig.4). Se determinó, por este medio, el volumen de elución correspondiente.
- Espectro de absorción en UV entre 230 y 320 nm: ya se mencionó la comparación entre los espectros de absorción de la creatinina y el de la Fracción B (Fig. 23 (a)).
- Método químico.

h) En los eluidos correspondientes a la Fracción D se detectó la presencia de ácido úrico mediante:

- Método químico.
- Espectros de absorción en UV: ya se mencionó la concordancia del espectro de absorción del ácido úrico con el de la Fracción D (Fig.23 (b)).



Conclusiones: (E)

Se determinó la presencia de:

- Urea y creatinina en la Fracción B
- Acido úrico en la Fracción D
- Componentes peptídicos -algunos de cuyos aminoácidos constituyentes fueron identificados- en la Fracción A, en mayor concentración en los pacientes con IRA que en los con IRC.
- Diversos compuestos fluorescentes sin identificar en fracciones correspondientes a distintos rangos de PM.

3. Fraccionamiento y caracterización de sustancias de BMPM en eritrocitos

La Figura 31 muestra los perfiles cromatográficos característicos obtenidos por fraccionamiento de los ultrafiltrados plasmáticos de sujetos controles y de pacientes con IRC mediante el sistema de una sola columna de Sephadex G-15 (0.9 x 100 cm). Se observó una mayor concentración de sustancias de BMPM con absorbancia en UV en los plasmas de IRC. Los resultados fueron concordantes con los obtenidos con el método cromatográfico de dos columnas detallado en la Fig.4.

La Figura 32 (a, b y c) muestra los perfiles cromatográfi-

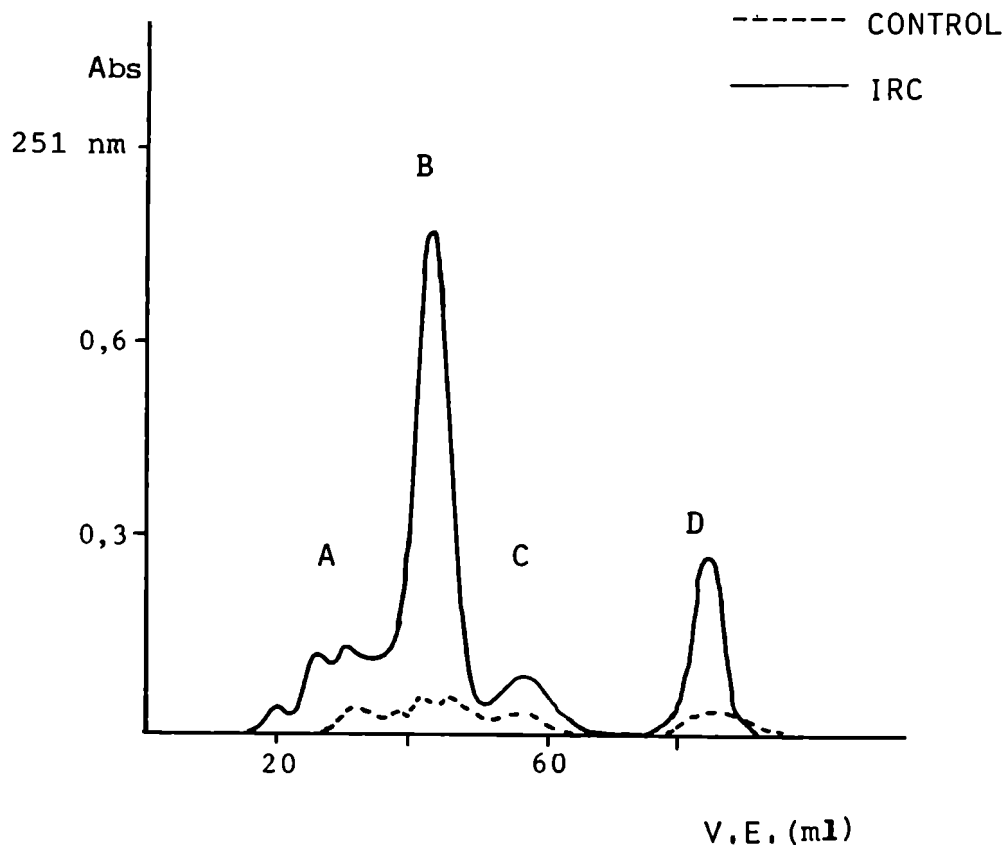


Figura 31.- Perfiles cromatográficos plasmáticos de sustancias de BMPM correspondientes a un sujeto con trol y a un paciente con IRC.  
 Fraccionamiento: columna de Sephadex G-15 (0,9 x 100 cm); eluyente  $\text{NH}_4\text{CO}_3\text{H}$  20 mmol/l; siembra 1 ml de ultrafiltrado plasmático PM-10.

cos correspondientes a los ultrafiltrados de lisados de eritrocitos de sujetos controles. La Figura 33 (a, b y c) muestra los perfiles correspondientes a los pacientes con IRC. En ambas figuras sólo están representados aquellos diagramas que mostraron diferencias entre sí, ya que los demás presentaron perfiles similares.

En los diagramas se diferencian 4 zonas de sustancias con absorbancia en UV: A, B, C y D. La fracción A está formada por varios picos difíciles de resolver.

En la Tabla XIV se presentan los valores medios correspondientes a las áreas integradas de cada fracción.

Los resultados de los estudios de identificación para las diferentes fracciones se muestran en la Tabla XV. Se detectaron sustancias ninhidrina positivas y péptidos (Folin positivos) sólo en la fracción A, confirmado el fraccionamiento electroforético por EAV de compuestos peptídicos en esa fracción.

Se comprobó, también, en la fracción A la presencia de glutatión mediante las siguientes pruebas:

a) Tiempo de retención en la columna cromatográfica: se encontró concordancia entre el volumen de elución de la fracción A y el de testigo de glutatión.

b) Electroforesis por alto voltaje revelada con reactivo de i

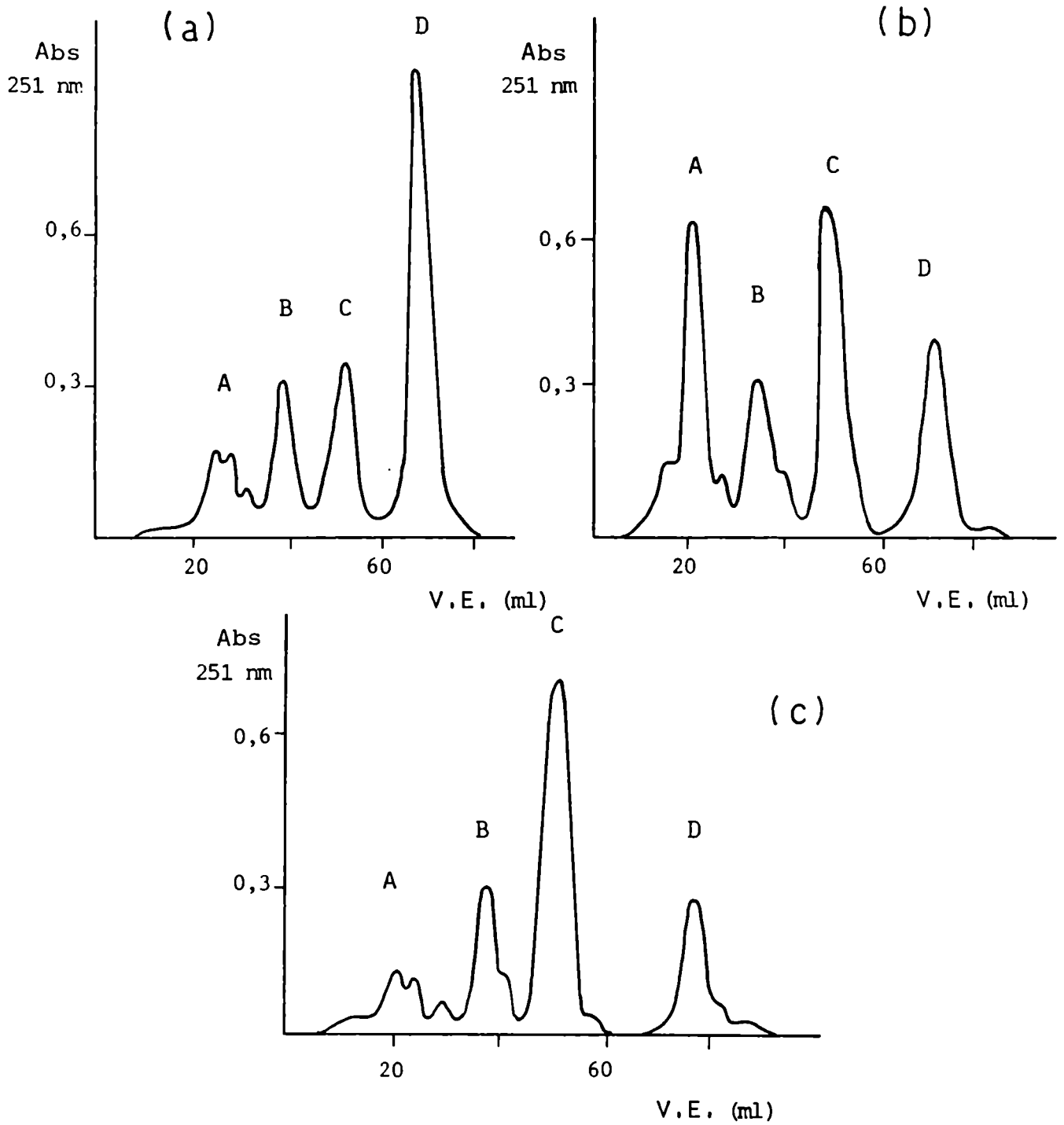


Figura 32.- Perfiles cromatográficos de ultrafiltrados (PM < 10 000 g/mol) de eritrocitos lisados correspondientes a sujetos controles.

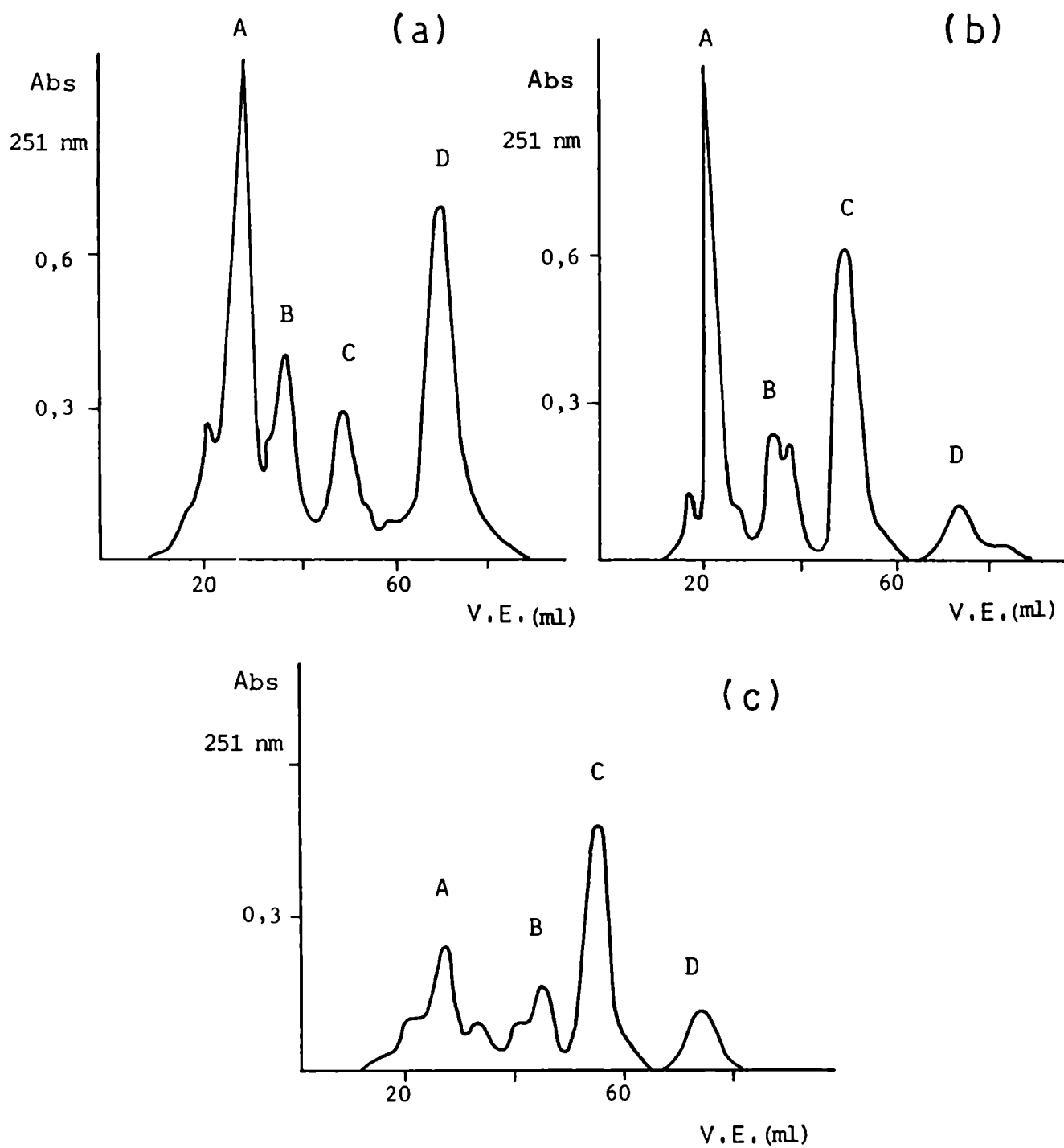


Figura 33.- Perfiles cromatográficos de ultrafiltrados (PM < 10 000 g/mol) de eritrocitos lisados correspondientes a pacientes con IRC.

Tabla XIV.- Areas integradas de las fracciones cromatográficas correspondientes a lisados de eritrocitos

|                  | FRACCIONES |        |        |        |
|------------------|------------|--------|--------|--------|
|                  | A          | B      | C      | D      |
|                  | UAAI/l     |        |        |        |
| CONTROL<br>n = 8 | 10 ± 4     | 8 ± 1  | 15 ± 6 | 13 ± 4 |
| IRC<br>n = 8     | 20 ± 8     | 10 ± 3 | 14 ± 5 | 8 ± 3  |

Los resultados se expresan como  $\bar{X} \pm s$ .

Tabla XV.- Resultados de los estudios de identificación de las fracciones cromatográficas obtenidas con los lisados de eritrocitos controles y de IRC

|                                  | A     |       | B |     | C |     | D |     |
|----------------------------------|-------|-------|---|-----|---|-----|---|-----|
|                                  | C     | IRC   | C | IRC | C | IRC | C | IRC |
| CREATININA (*)                   |       |       | + | +++ |   |     |   |     |
| REACCION CON NINHIDRINA          | +     | +     |   |     |   |     | - |     |
| PEPTIDOS<br>$\bar{X} \pm s$ (**) | 53+13 | 80+25 |   |     |   |     |   |     |

(\*) Semicuantificación: +: 0,8-1,2 mg/dl

++: 4 mg/dl

(\*\*) Expresión de los datos: ug Alb /100 ml

dentificación para grupos tioles: la velocidad de migración electroforética y las características de tinción de los eluídos de la fracción A fueron similares a las de una muestra testigo de glutatión.

c) Espectro de fluorescencia: se observó concordancia de los espectros de fluorescencia que mostraron los eluídos de la fracción A con el de una solución testigo de glutatión. Los máximos de excitación y emisión se obtuvieron, en ambos casos, a las longitudes de onda de 420 y 435 nm, respectivamente.

En la fracción B se detectó la presencia de creatinina y se la determinó cuantitativamente por método químico. Se encontraron valores significativamente más elevados en la fracción correspondiente a los lisados de eritrocitos de los pacientes con IRC con respecto a los controles (Tabla XV).

Conclusiones: (F)

- Se encontraron sustancias de BMPM con absorbancia en UV (picos A, B, C y D) presentes en los lisados de eritrocitos controles y urémicos.
- Los perfiles cromatográficos eritrocitarios mostraron diferencias individuales, tanto entre los sujetos controles como entre los pacientes con IRC.
- Se detectó la presencia de glutatión, péptidos, creatinina y ácido úrico dentro de las fracciones de BMPM



#### 4. Estudios de toxicidad

##### 4.1. EFFECTOS DE LAS SUSTANCIAS DE BMPM SOBRE LA RESPUESTA LINFO- PROLIFERATIVA

a) Los ultrafiltrados plasmáticos (PM 10 000 g/mol) correspondientes a los pacientes urémicos (IRA e IRC; n = 4) mostraron una importante inhibición de los cultivos estimulados por células alogeneicas (MLC). La incorporación de <sup>3</sup>H - timidina fue de 10% para la IRA y 12% para la IRC, en comparación con el control de suero humano normal.

b) La Figura 34 muestra los resultados obtenidos en uno de los ensayos de toxicidad, donde los cultivos de linfocitos estimulados por PHA y por células alogeneicas (MLC) fueron realizados en presencia de sustancias de BMPM totales plasmáticas provenientes de un sujeto control y de un paciente con IRC. La estimulación celular se determinó por la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina y se midió en cpm. En la figura se puede observar la importante inhibición de la proliferación celular causada por las fracciones urémicas plasmáticas, tanto en el cultivo mixto de linfocitos como en el estimulado por PHA (68% y 54% de inhibición, respectivamente, con respecto al control realizado en ausencia de fracciones).

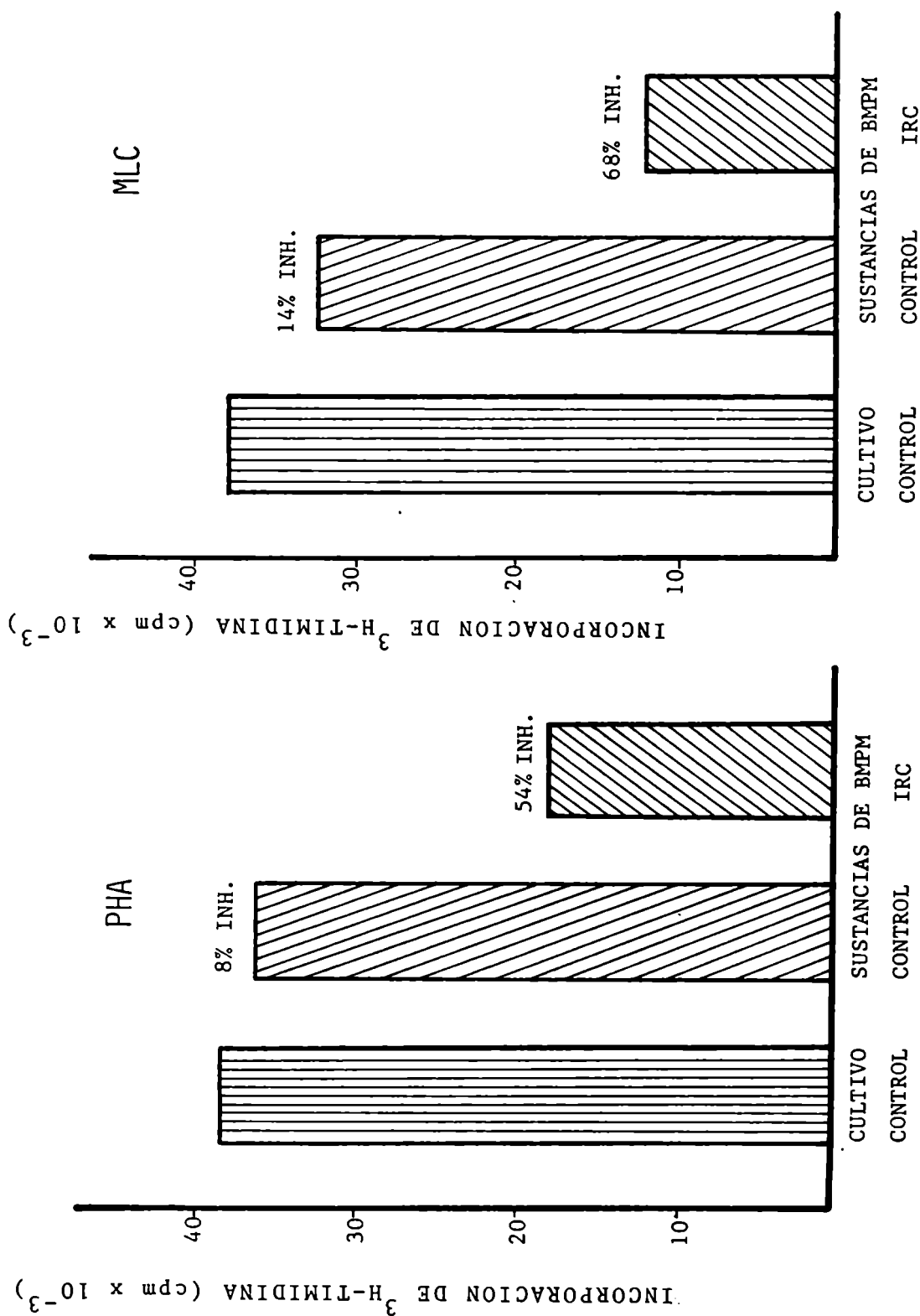


Figura 34.- Efectos que ejercen las sustancias de BMPM plasmáticas de un sujeto control y de un paciente con IRC sobre los cultivos de linfocitos es timulados con PHA (izq.) o por células alogeneicas (MLC)(der.).

La Fig.34 es representativa de los resultados obtenidos con todos los pacientes, cuyo resumen se muestra en la Tabla XVI y en la Figura 35. Los valores están expresados como promedios y una desviación estándar de los porcentajes de estimulación calculados con respecto al cultivo control -que no incluyó sustancias de BMPM- considerado como 100%.

El ensayo autólogo corresponde a una sola población de linfocitos (sin estimulación) y el ensayo blanco, al medio de cultivo con nutrientes pero en ausencia de poblaciones celulares. Ambos ensayos constituyen controles de la técnica empleada y fueron incorporados en todos los estudios.

Las fracciones de BMPM totales urémicas sólo permitieron un pobre crecimiento celular en el MLC ( $25 \pm 10,9$  % las de IRC y  $11 \pm 8,5$  % las de IRA). Las fracciones provenientes del plasma de sujetos controles no afectaron, en promedio, el crecimiento celular normal ( $94 \pm 46,5$  % de estimulación). Se encontraron variaciones en las respuestas de las fracciones controles debido a que, en cada cultivo, se emplearon muestras correspondientes a diferentes individuos. Aún así, en todos los estudios las fracciones de BMPM del grupo control produjeron mayor incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina que las del grupo urémico ensayadas en el mismo cultivo.

La Fracción A, de la IRC, produjo una leve estimulación

Tabla XVI.- Efectos producidos por las fracciones de BMPM sobre la proliferación celular "in vitro"

| <u>Cultivos estimulados con PHA</u> |        | <u>% de estimulación</u> (*) |
|-------------------------------------|--------|------------------------------|
| BMPM <sub>CONTROL</sub>             | n = 3  | 94 ± 1,4                     |
| BMPM <sub>IRC</sub>                 | n = 3  | 48 ± 16,5                    |
| <u>Cultivo Mixto de Linfocitos</u>  |        | <u>% de estimulación</u> (*) |
| Blanco                              | n = 18 | 1 ± 0,3                      |
| Autólogo                            | n = 18 | 3 ± 1,5                      |
| BMPM <sub>CONTROL</sub>             | n = 7  | 94 ± 46,5                    |
| BMPM <sub>IRC</sub>                 | n = 9  | 25 ± 10,9                    |
| A <sub>IRC</sub>                    | n = 9  | 110 ± 32,5                   |
| B <sub>IRC</sub>                    | n = 10 | 27 ± 17,4                    |
| C <sub>IRC</sub>                    | n = 11 | 19 ± 12,1                    |
| D <sub>IRC</sub>                    | n = 2  | 14 ± 2,8                     |
| P <sub>IRC</sub>                    | n = 2  | 13 ± 2,1                     |
| BMPM <sub>IRA</sub>                 | n = 2  | 11 ± 8,5                     |
| A <sub>IRA</sub>                    | n = 2  | 10 ± 1,4                     |
| B <sub>IRA</sub>                    | n = 2  | 22 ± 9,2                     |
| C <sub>IRA</sub>                    | n = 2  | 4 ± 1,4                      |
| D <sub>IRA</sub>                    | n = 2  | 7 ± 2,8                      |

(\*)  $\bar{X} \pm s$  de la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina con respecto al cultivo control que no incluyó fracciones.

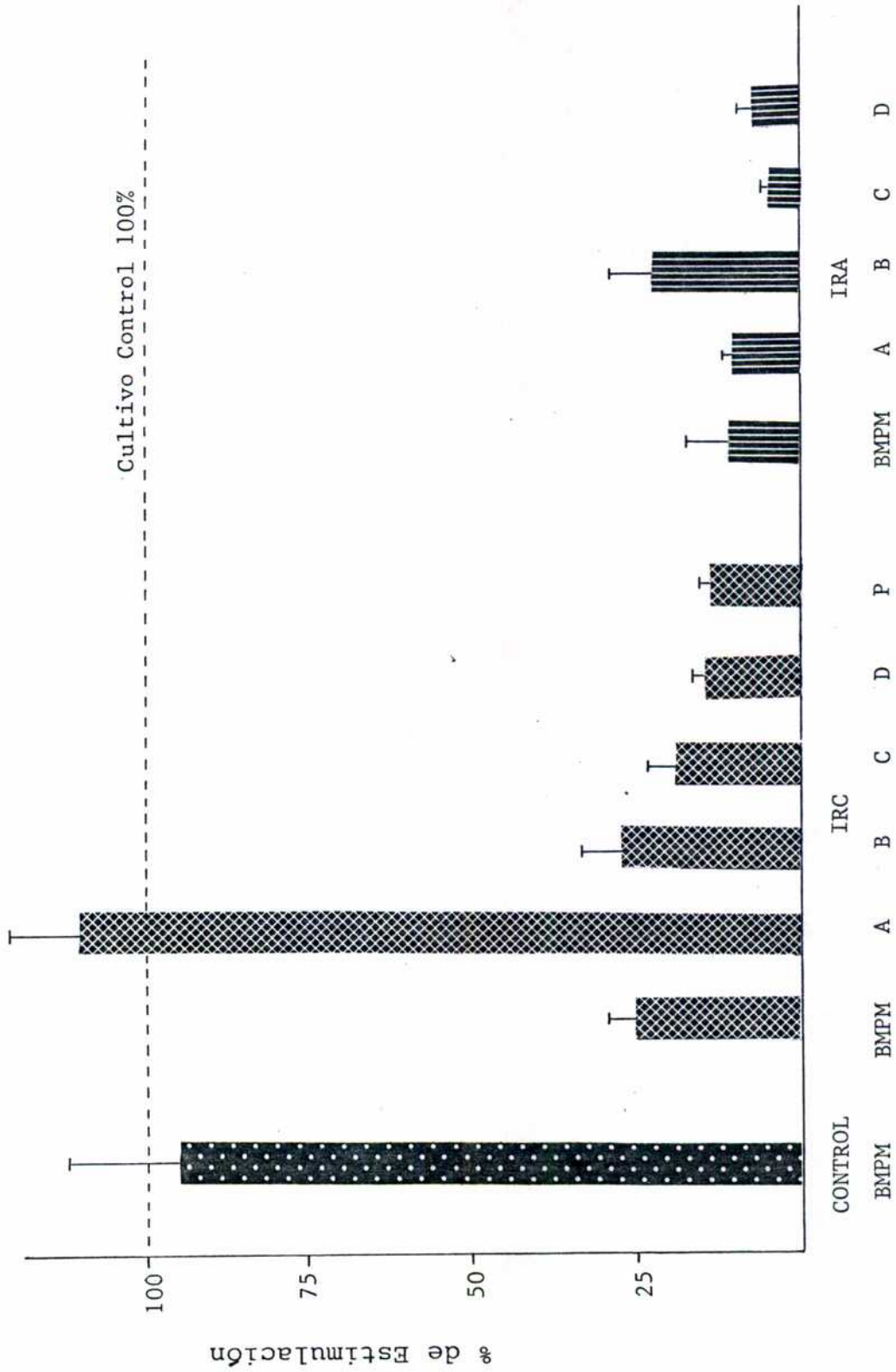


Figura 35.- Efectos producidos sobre la proliferación celular "in vitro" (MLC) por sustancias plasmáticas de BMPM totales y de sus fracciones correspondientes a sujetos controles y a pacientes con IRC y con IRA. Los resultados se expresan como  $\bar{X} \pm s_{\bar{X}}$ .

celular ( $110 \pm 32,5\%$ ). Las restantes fracciones de la IRC y todas las de la IRA produjeron distintos grados de inhibición de la proliferación celular.

Se encontraron efectos inhibitorios producidos por las fracciones P y D , cuando se emplearon muestras en las que se encontraban presentes.

Se trataron de establecer las correlaciones entre las concentraciones de las sustancias de BMPM totales y de cada una de sus fracciones con los efectos producidos sobre la proliferación celular. Se encontró que sólo la Fracción A , de los plasmas provenientes de pacientes con IRC, mostraba correlación lineal directa con el grado de estimulación del MLC ( $r = 0,97$ ;  $p < 0,001$ ;  $n = 8$ ).

Las observaciones morfológicas se realizaron, en varios estudios, simultáneamente con la determinación de incorporación de timidina radiactiva. Los resultados mostraron una pobre transformación blástica ( $27 \pm 15,3 \%$ ) cuando las células se incubaron con fracciones de BMPM urémicas, a diferencia de la hallada cuando los cultivos se realizaron en presencia de fracciones provenientes de sujetos controles , cuyo valor fue de  $83 \pm 5,8 \%$ .

La viabilidad celular se mantuvo inalterada en todos los casos.

La dilución de las muestras en estudio produjo la disminución de los efectos, tanto de estimulación como de inhibición.

No se encontraron correlaciones entre los efectos producidos por las fracciones plasmáticas A, B y C y el número de linfocitos circulantes en la sangre de los pacientes.

c) La Figura 36 muestra los volúmenes de elución correspondientes a 11 subfracciones de sustancias de BMPM, con y sin absorbancia en el rango de UV, provenientes de pacientes con IRC, en las que se investigó la acción tóxica. En la misma Figura se presentan los resultados de los efectos que, sobre la proliferación celular, produjeron cada una de las subfracciones.

Los ensayos efectuados con plasma de pacientes con IRC (n = 5) mostraron una estimulación celular muy marcada (entre 119 y 500 %) por acción de la subfracción  $\gamma$  y una importante inhibición ( $9 \pm 8,4$  % de incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina) cuando se estudió la subfracción  $\beta$ . Ambas,  $\gamma$  y  $\beta$ , están incluidas dentro de los volúmenes de elución correspondientes al pico A.

Las subfracciones  $\pi$ ,  $\rho$  y  $\omega$ , con volúmenes de elución correspondientes a los de sustancias con BPM, produjeron

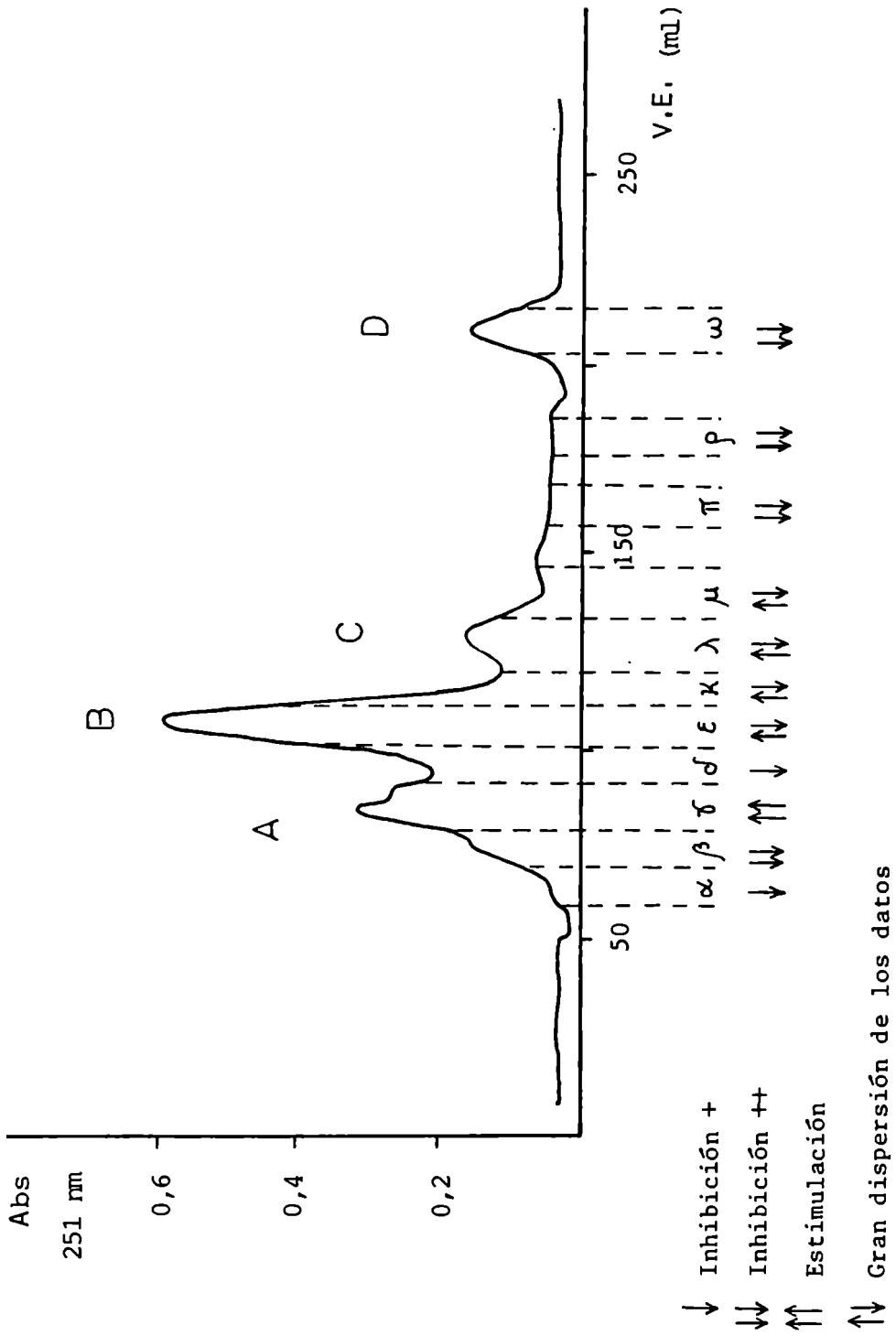


Figura 36.- Volúmenes de elución correspondientes a 11 subfracciones con y sin absorbancia en UV y resultados de los efectos de los efectos que tales compuestos producen sobre la proliferación celular (MIC).

El fraccionamiento se realizó según el método descrito en la Fig.4.



ron inhibición de la proliferación celular ( $20 \pm 13,4\%$  de incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina).

Los resultados obtenidos con las restantes fracciones mostraron gran dispersión debido a diferencias individuales produciendo, en algunos ensayos, inhibición y, en otros, ningún efecto.

Las mismas 11 subfracciones, obtenidas a partir de plasma de sujetos controles ( $n = 3$ ) no produjeron un efecto importante sobre el crecimiento celular, encontrándose valores de estimulación entre 50 y 105%.

d) Los eluidos cromatográficos (Figs. 8(a) y 8 (b)) de las fracciones obtenidas por ultrafiltración de plasma urémico (IRC e IRA) a través de membranas selectivas, según el procedimiento descrito en la Fig. 7, mostraron los siguientes resultados cuando fueron incubados con los linfocitos en el MLC:

IRC (Figura 8 a)

Fracción 2 ( $10\ 000 > \text{PM} > 1\ 000$ )

Pico único (dentro de la Fracción A)      Sin efecto sobre el crecimiento

Fracción 3 ( $1\ 000 > \text{PM} > 500$ )

Pico 1° (dentro de la Fracción A)      ↑ Estimulación

|                                   |                  |
|-----------------------------------|------------------|
| Pico 2° (dentro de la Fracción B) | ↓↓ Inhibición ++ |
| <u>Fracción 4</u> (PM < 500)      |                  |
| Pico 1° (dentro de la Fracción B) | ↑ Estimulación   |
| Pico 2° (dentro de la Fracción C) | ↓↓ Inhibición ++ |
| Pico 3° (dentro de la Fracción D) | ↓ Inhibición +   |

IRA (Figura 8 b)

|   |                  |
|---|------------------|
| <u>Fracción 2</u> (10 000 > PM > 1 000) |                  |
| Pico único (dentro de la Fracción A)    | ↓↓ Inhibición ++ |
| <u>Fracción 3</u> (1 000 > PM > 500)    |                  |
| Pico único (abarca A + B + C)           | ↓↓ Inhibición ++ |
| <u>Fracción 4</u> (PM < 500)            |                  |
| Pico 1° (dentro de la Fracción B)       | ↓ Inhibición +   |
| Pico 2° (dentro de la Fracción C)       | ↓↓ Inhibición ++ |

En los estudios en los que se empleó plasma de IRC, dos fracciones, de diferentes PM, mostraron estimulación del cultivo, una no afectó el crecimiento celular y las restantes produjeron inhibición en distintos grados.

Todas las fracciones provenientes del plasma de IRA produjeron inhibición marcada de la proliferación celular.

e) La Tabla XVII muestra los resultados de los efectos que

Tabla XVII.- Efectos producidos por sustancias testigos sobre la proliferación celular en el MLC

| <u>SUSTANCIA</u>               | <u>PM</u> | <u>CONCENTRACION</u> | <u>% DE ESTIMULACION</u> (*) |
|--------------------------------|-----------|----------------------|------------------------------|
| Creatinina                     | 113       | 1,8 mmol/l           | 75 ± 20,4                    |
| Urea                           | 60        | 0,15 mol/l           | 63 ± 8,6                     |
| Acido úrico                    | 168       | 0,9 mmol/l           | 25 ± 22,3                    |
| Guanidina.ClH                  | 96        | 0,1 mmol/l           | 51 ± 5,9                     |
| Metilguanidina.ClH             | 111       | 0,1 mmol/l           | 70 ± 25,6                    |
| Espermina (ClH) <sub>4</sub>   | 348       | 0,03 mmol/l          | 38 ± 13,9                    |
| Espermidina (ClH) <sub>3</sub> | 255       | 0,04 mmol/l          | 60 ± 35,9                    |
| Putrescina (ClH) <sub>2</sub>  | 161       | 0,06 mmol/l          | 93 ± 11,7                    |
| Cadaverina                     | 102       | 0,4 mmol/l           | 21 ± 3,5                     |
| ATP                            | 507       | 0,02 mmol/l          | 112 ± 27,0                   |
| Glutation                      | 614       | 1,2 mmol/l           | 5 ± 3,2                      |

---

(\*)  $\bar{X} \pm s$  de la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina en cada ensayo con respecto al cultivo control, que no incluyó sustancias en estudio.

presentaron diversas sustancias testigos sobre la proliferación celular estudiada por el MLC.

Se destaca la importante inhibición producida por el glutatión y, en menor proporción, por el ácido úrico y por las poliaminas espermina y cadaverina.

Conclusiones: (G)

- Las fracciones y subfracciones, conteniendo sustancias de BMPM, provenientes de plasma de sujetos controles no afectaron la respuesta linfoproliferativa.
- Una subfracción ( $\delta$ ) de plasma de IRC, ubicada dentro de los eluidos del pico A, produjo estimulación del MLC.
- Varias subfracciones de plasma de IRC, de diferentes PM (con y sin absorbancia en UV), produjeron diversos grados de inhibición del MLC.
- Todas las fracciones y subfracciones, provenientes de plasma de IRA, produjeron inhibición del MLC.

4.2. EFFECTOS DE LAS SUSTANCIAS DE BMPM SOBRE LA ACTIVIDAD  
NEUROMUSCULAR

La Tabla XVIII muestra los resultados obtenidos en la estimación de la eficiencia muscular y los correspondientes a los estudios de las propiedades mecánicas del músculo y a los de velocidad de conducción nerviosa:

EM: eficiencia muscular, tiempo de permanencia durante el cual los animales se mantienen colgados de una barra suspendida a 50 cm de altura, hasta la caída.

T<sub>s</sub>: tensión de la contracción simple.

T<sub>t</sub>: tensión de la contracción tetánica.

TC: tiempo de contracción.

T<sub>1/2R</sub>: tiempo medio de relajación.

EA: duración del estado activo.

A<sub>(PA)</sub>: amplitud del potencial de acción evocado.

Retardos de las primera y segunda deflexiones.

Duración de las primera y segunda deflexiones.

Duración total del complejo.

VCN: velocidad de conducción nerviosa.

Se presentan los datos correspondientes a los cuatro grupos experimentales estudiados:

Tabla XVIII.- Efectos de las sustancias de BMPM sobre la actividad neuromuscular  
 Determinaciones de eficiencia muscular (EM), propiedades mecánicas del músculo (TC, T1/2R, T<sub>s</sub>, T<sub>t</sub> y EA) y velocidad de conducción nerviosa (amplitud y duración del PA, retardo y duración de los componentes del complejo y VCN).

| GRUPOS                  | EM (s)                  | TC (ms)                | T1/2R (ms)             | T <sub>s</sub> (g)     | T <sub>t</sub> (g)      | T <sub>s</sub> /A (g/cm <sup>2</sup> ) | T <sub>t</sub> /A (g/cm <sup>2</sup> ) | EA (ms)                 |
|-------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|--|--|-------------------------|
| Ratas Control 1 (n = 7) | 27,0 <sub>+14</sub> ,37 | 28,8 <sub>+2</sub> ,96 | 29,6 <sub>+3</sub> ,67 | 19,6 <sub>+2</sub> ,39 | 74,2 <sub>+11</sub> ,08 | 648,6 <sub>+149</sub> ,5               | 2436,0 <sub>+571</sub> ,95             | 29,2 <sub>+7</sub> ,18  |
| Ratas Control 2 (n = 7) | 24,4 <sub>+7</sub> ,61  | 29,6 <sub>+3</sub> ,44 | 33,0 <sub>+4</sub> ,67 | 19,2 <sub>+3</sub> ,13 | 71,4 <sub>+11</sub> ,51 | 610,4 <sub>+136</sub> ,78              | 2218,6 <sub>+543</sub> ,42             | 31,0 <sub>+5</sub> ,01  |
| Ratas IRC (n = 8)       | 26,1 <sub>+12</sub> ,61 | 32,3 <sub>+6</sub> ,45 | 33,9 <sub>+6</sub> ,23 | 22,4 <sub>+3</sub> ,43 | 75,2 <sub>+6</sub> ,88  | 665,6 <sub>+124</sub> ,91              | 2107,1 <sub>+588</sub> ,41             | 28,6 <sub>+8</sub> ,49  |
| Ratas IRA (n = 8)       | 23,6 <sub>+10</sub> ,26 | 29,6 <sub>+2</sub> ,28 | 30,4 <sub>+3</sub> ,38 | 22,5 <sub>+4</sub> ,30 | 80,8 <sub>+9</sub> ,84  | 710,1 <sub>+205</sub> ,98              | 2492,0 <sub>+565</sub> ,29             | 30,0 <sub>+11</sub> ,65 |
|                         | N.S.                    | N.S.                   | N.S.                   | N.S.                   | N.S.                    | N.S.                                   | N.S.                                   | N.S.                    |

Los resultados se expresan como  $\bar{X} \pm s$ .

Tabla XVIII.- Continuación

| GRUPOS                  | Retardo         |                 | Duración        |                 | Duración total (ms) | Amplitud (uV) | VCN m/s |
|-------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------|---------------|---------|
|                         | 1ª Deflex. (ms) | 2ª Deflex. (ms) | 1ª Deflex. (ms) | 2ª Deflex. (ms) |                     |               |         |
| Ratas Control 1 (n = 3) | 0,6±0,29        | 1,2±0,40        | 0,6±0,21        | 1,9±1,03        | 4,2±0,80            | 620,7±383,51  | 33±20,4 |
| Ratas Control 2 (n = 2) | 0,6±0,07        | 1,3±0,14        | 0,7±0,07        | 2,4±0,28        | 4,5±1,34            |               | 26± 2,9 |
| Ratas IRC (n = 4)       | 0,3±0,08        | 1,1±0,34        | 0,8±0,29        | 1,7±0,38        | 4,1±1,17            | 576,5±395,38  | 60±17,8 |

Los resultados se expresan como  $\bar{X} \pm s$ .

RATAS CONTROL 1: inyectadas con solución glucosasa isotónica.

RATAS CONTROL 2: inyectadas con sustancias de BMPM plasmáticas correspondientes a sujetos controles.

RATAS IRC: inyectadas con sustancias de BMPM plasmáticas correspondientes a pacientes con IRC.

RATAS IRA: inyectadas con sustancias de BMPM plasmáticas correspondientes a pacientes con IRA.

No se redujo la VCN ni se presentaron modificaciones en los distintos componentes del potencial de acción cuando los animales fueron inyectados con sustancias urémicas.

Los datos de la osmolaridad plasmática de las muestras de las ratas, obtenidas al final de la experiencia, se muestran a continuación:

RATAS CONTROL 1:  $331 \pm 73,9$  mOsm/l

RATAS CONTROL 2:  $311 \pm 17,7$  mOsm/l

RATAS IRC :  $312 \pm 47,8$  mOsm/l

RATAS IRA :  $314 \pm 4,8$  mOsm/l

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Para el estudio estadístico entre los distintos grupos se empleó análisis de varianza de un factor, con posteriores contrastes de Scheffé.



Los siguientes datos corresponden a las concentraciones de sustancias de BMPM presentes en el plasma de las ratas inyectadas con sustancias de BMPM provenientes del plasma de pacientes con IRC. Se comparan con las concentraciones de las sustancias urémicas retenidas en el plasma de las ratas por efecto de la nefrectomía.

Para el fraccionamiento se empleó una mezcla de las muestras correspondientes a cada grupo

|                        |        | BMPM <sub>tot.</sub> | A    | B    | C    | D   |
|------------------------|--------|----------------------|------|------|------|-----|
| Sin nefr. ni inyec.    | UAAI/1 | 14,4                 | 2,3  | 1,5  | 4,9  | 5,7 |
| 20 min nefr.sin iny.   | UAAI/1 | 21,6                 | 5,3  | 4,3  | 7,3  | 4,7 |
| cantidad inyectada     | UAAI   | 0,5                  |      |      |      |     |
| 20 min nefr.+ iny.IRC  | UAAI/1 | 15,3                 | 2,3  | 2,3  | 4,3  | 6,4 |
| 45 min nefr.sin iny.   | UAAI/1 | 20,6                 | 7,4  | 4,2  | 9,0  | 0   |
| cantidad inyectada     | UAAI   | 1,1                  | 0,4  | 0,6  | 0,1  | 0   |
| 45 min nefr.+ iny.IRC  | UAAI/1 | 23,6                 | 7,0  | 11,0 | 5,6  | 0   |
| 180 min nefr.sin iny.  | UAAI/1 | 23,7                 | 4,7  | 5,1  | 8,4  | 5,5 |
| 360 min nefr.sin iny.  | UAAI/1 | 43,9                 | 10,2 | 15,5 | 18,2 | 0   |
| cantidad inyectada     | UAAI   | 0,2                  | 0,06 | 0,13 | 0,01 | 0   |
| 360 min nefr.+ iny.IRC | UAAI/1 | 49,2                 | 16,9 | 14,7 | 17,6 | 0   |

No se pueden diferenciar las variaciones entre los tratamientos de las debidas al comportamiento individual de cada animal

#### 4.3. EFECTOS DE LAS SUSTANCIAS DE BPPM SOBRE NERVIO AISLADO DE RANA

En la tabla XIX se muestran los resultados del porcentaje de la disminución de la amplitud, del porcentaje del aumento de la latencia y de la duración del potencial de acción.

La comparación entre los grupos 1 y 3 no mostró diferencias en lo referente a las modificaciones de la amplitud y de la latencia del potencial de acción, mientras que se observaron diferencias significativas con respecto a la duración del mismo ( $p < 0,05$ ).

Los grupos 2 y 3 no presentaron diferencias significativas para ninguna de las variables determinadas.

La importante disminución del PA provocada por las muestras del Grupo 4a fue reversible, luego del lavado del nervio con solución de Ringer.

Después del ajuste del pH, osmolaridad y de las concentraciones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  las disminuciones de la amplitud del PA fueron mucho menores. Uno de los ensayos, aquí incluido, no produjo modificaciones del PA después de la normalización de

Tabla XIX.- Modificaciones de la duración, amplitud y latencia del potencial de acción en los ensayos sobre nervio sural aislado de rana.

|                            | Disminución<br>de la amplitud<br>% | Aumento de<br>la latencia<br>% | Duración<br>ms   |
|----------------------------|------------------------------------|--------------------------------|------------------|
| Grupo 1<br>Control         | 0                                  | 0                              | 1,4 $\pm$ 1,43   |
| Grupo 2<br>IRC s/neurop.   | 0                                  | 0                              | 16,4 $\pm$ 10,61 |
| Grupo 3<br>IRC c/neurop.   | 0                                  | 12,5-60-100                    | 23,2 $\pm$ 4,79  |
| Grupo 4 a<br>Orina s/corr. | 88,6 $\pm$ 6,01                    | 35,9 $\pm$ 32,16               | No se midió      |
| Grupo 4 b<br>Orina corr.   | 29,0 $\pm$ 18,9                    | 33,3 $\pm$ 24,06               | 20,1 $\pm$ 8,54  |

Los resultados se expresan como promedio y error estándar

$$(\bar{X} \pm s_{\bar{X}})$$

la muestra.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) cuando se compararon los resultados de la disminución de la amplitud del PA producida por los Grupos 4a y 4b.

La Figura 37 muestra los perfiles cromatográficos correspondientes a las muestras del grupo 4b (UF de orinas normalizadas).

Las concentraciones de sustancias de BMPM totales en las muestras empleadas para estudiar la toxicidad sobre nervio aislado de rana fueron:

Muestra N°3 : 49 UAAI/l

Muestra N°5 : 39 UAAI/l

Muestra N°2 : 212 UAAI/l

No se observó correlación entre las concentraciones de sustancias de BMPM presentes en las muestras y las modificaciones del PA que éstas produjeron en el ensayo "in vitro".

Conclusiones: (H)

- No se encontraron alteraciones de la actividad neuromuscular en ratas inyectadas con fracciones de BMPM de IRC y de IRA, con respecto a los controles.

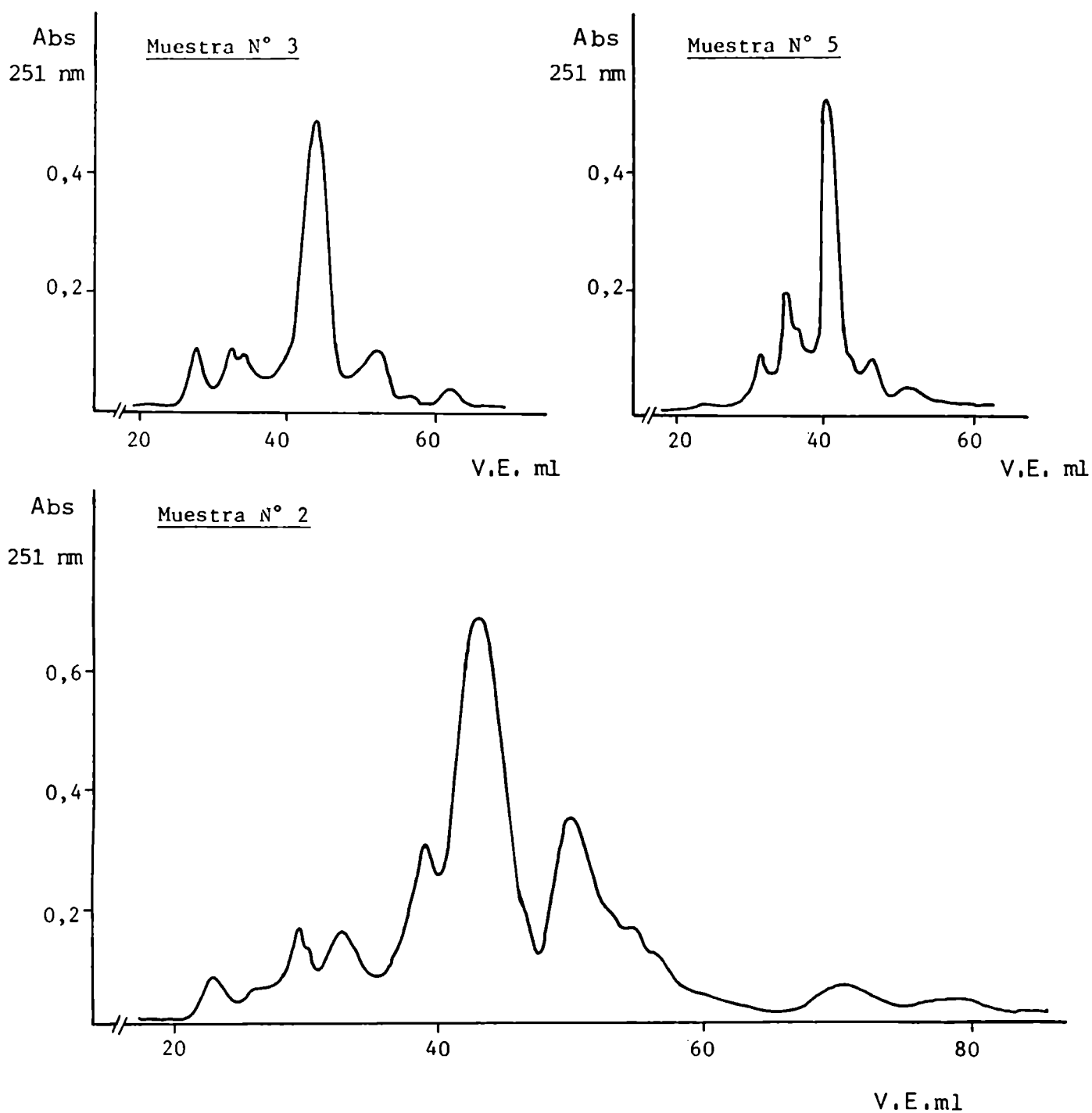


Figura 37.- Perfiles cromatográficos de las muestras de UF de orinas normalizadas empleadas para estudiar la acción de sustancias de BMPM sobre nervio aislado de rana.

- No se encontraron diferencias de los efectos sobre el PA, en nervio aislado de rana, producidos por las muestras provenientes de pacientes con IRC con y sin polineuropatía.
- Las modificaciones drásticas del PA producidas por algunas muestras desaparecieron o disminuyeron significativamente después de la corrección de la composición de las soluciones empleadas.

5. Resultados obtenidos al someter los datos a un análisis factorial de correspondencias (A.F.C.)

Los resultados se observan en las Figuras 38, 39 y 40.

Cuando se analizaron las variables de los individuos de los tres grupos experimentales (C, IRC e IRA) se encontró que con los 3 primeros ejes se explicaba el 82% de la varianza total, correspondiendo a los 2 primeros ejes la explicación del 72% de la misma.

La Figura 38 corresponde a la proyección sobre el plano 1-2 de las 32 variables correspondientes a los grupos C, IRC e IRA. El primer eje (abscisas) caracteriza el estado de salud (separación de sujetos controles, IR 01, de los pacientes



urémicos, IR 02 e IR 03). El segundo eje (ordenadas) caracteriza el tipo de enfermedad (separación entre IRC e IRA).

Las Figuras 39 y 40 muestran las proyecciones sobre los planos 1-2 y 1-3, respectivamente, de las variables correspondientes a los grupos IRC e IRA.

Se pueden resumir los resultados:

- Los valores más elevados de las concentraciones plasmáticas de sustancias de BMPM totales (BM 07, BM 08), de las fracciones A (AZ 03, AZ 04) y B (BZ 04, BZ 05) y de los porcentajes del pico A (AO 05) se asociaron con la IRA (IR 03), con períodos prolongados (TP 03) de 3 a 6 días de oliguria (OL 02) y con etiologías de aborto séptico con síndrome de Mondor (ET 03), post-quirúrgicas (ET 04) y post-parto (ET 05).
- La mayor proporción encontrada para la variable B% (BO 06) se asoció con la IRC, independientemente de las concentraciones totales de sustancias de BMPM.
- Los valores de las concentraciones plasmáticas de sustancias de BMPM totales encontrados en la IRC (BM 04), junto con porcentajes bajos de la Fracción A (AO 02) se asociaron con períodos prolongados de evolución de la enfermedad (TM 04, TM 05), con HTA severa (HT 04, HT 05) y con la presencia de alteraciones óseas (OS 04).
- Concentraciones elevadas de la Fracción A (AZ 03) se asocia





1.409  
1.420  
1.426  
1.437  
1.450  
1.458  
1.470  
1.481  
1.490  
1.500  
1.511  
1.522  
1.532  
1.543  
1.554  
1.564  
1.574  
1.585  
1.596  
1.606  
1.617  
1.627  
1.637  
1.647  
1.657  
1.667  
1.677  
1.687  
1.697  
1.707  
1.717  
1.727  
1.737  
1.747  
1.757  
1.767  
1.777  
1.787  
1.797  
1.807  
1.817  
1.827  
1.837  
1.847  
1.857  
1.867  
1.877  
1.887  
1.897  
1.907  
1.917  
1.927  
1.937  
1.947  
1.957  
1.967  
1.977  
1.987  
1.997

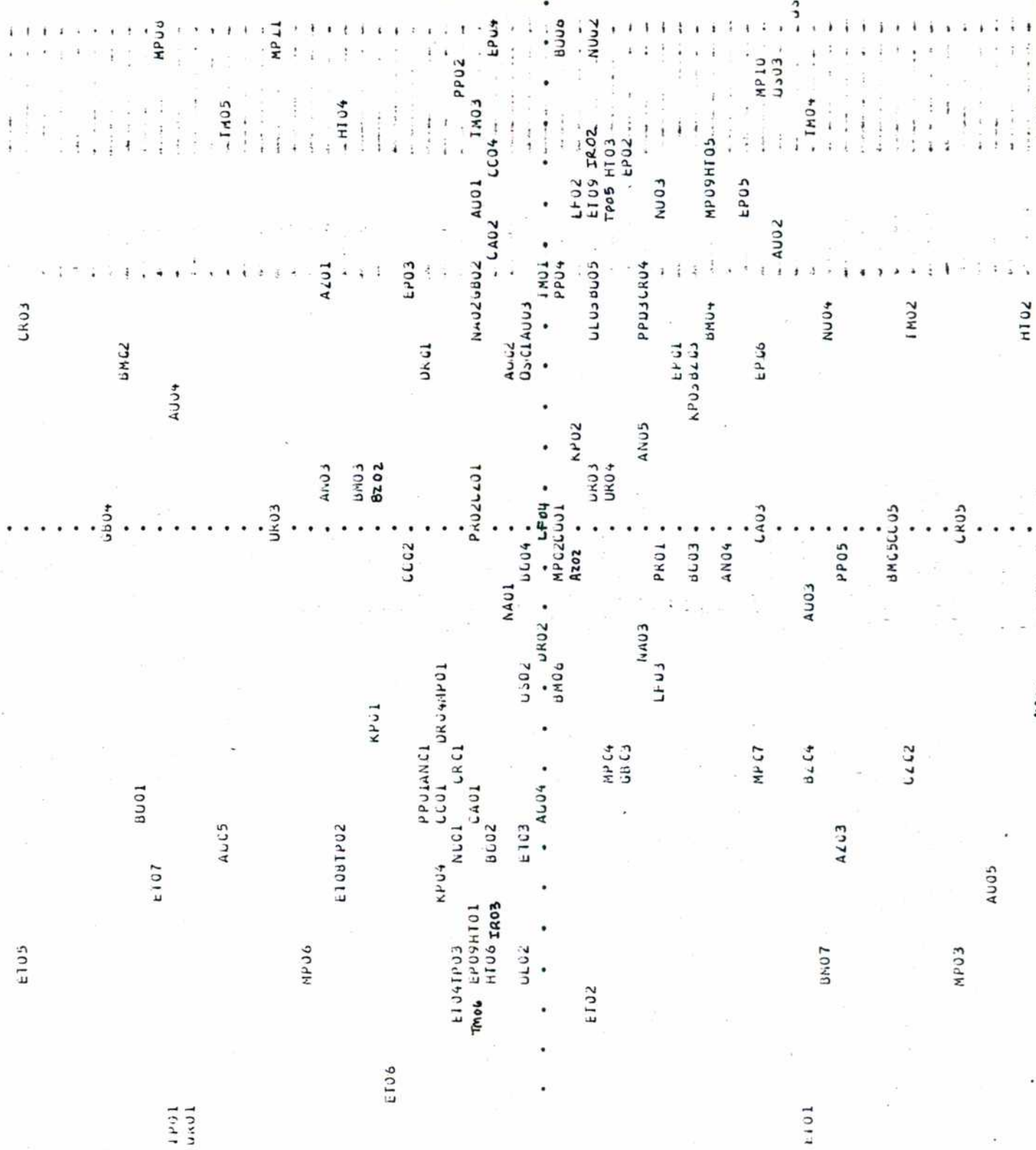


Figura 40.- Análisis Factorial de Correspondencias  
 Proyección de las variables (grupos IRC e IRA) sobre  
 los planos 1-3.

ron con el tratamiento con antibióticos de los pacientes con IRA (MP 03).

- La variable etiología de la IRA pre-renal (ET 07) se asoció con porcentajes de la Fracción A mucho mayores (AO 05) que los de la Fracción B (AO 01).
- Valores normales de las variables sodio (NA 02), potasio (KP 02), calcio (CA 02) y ácido úrico (AU 02) plasmáticos se asociaron con valores moderadamente elevados de fósforo plasmático (PP 03, PP 04) y con valores de sustancias de BMPM totales superiores a los valores normales (BM 02), correspondientes a pacientes con IRC.
- La presencia de alteraciones neurológicas en la IRC no se asoció con el tiempo de evolución de la enfermedad ni con la severidad de otros síntomas.
- No mostraron relevancia las variables sexo, edad ni la presencia en el cromatograma de la Fracción P.
- La variable grado de anemia no aportó información para separar las dos enfermedades (IRC e IRA) ni se asoció con la severidad de la insuficiencia renal, medida por el clearance de creatinina y por la concentración de urea plasmática.

## DISCUSION

### DISCUSION DE LA METODOLOGIA

La elección de la separación de sustancias en base a sus pesos moleculares se fundamenta en la importancia atribuída a la toxicidad potencial de las "moléculas medias", enunciada en la hipótesis de Babb et al. (1971, 1972 a).

En este trabajo se probaron diversos sistemas de columnas de fraccionamiento para cromatografía de exclusión. El que se muestra en la Figura 2 permite una buena separación entre los componentes de elevado peso molecular (proteínas plasmáticas, entre ellos) y los de bajo peso molecular, mediante el fraccionamiento en Sephadex G-75, pero la necesidad de concentrar los eluidos -por evaporación al vacío, ultrafiltración o liofilización- para proceder a un nuevo fraccionamiento cromatográfico en Sephadex G-15 o G-25 prolonga demasiado el tiempo de los análisis sin una buena justificación para ello. La separación de componentes de alto peso molecular se puede lograr mediante ultrafiltración inicial de las muestras a través de membrabas Diaflo PM-10, de tamaño de poro tal que permiten la retención de sustancias con pesos moleculares mayores de, aproximadamente , 10 000 g/mol.

El fraccionamiento mediante cromatografía de filtración

por geles se basa en el principio de separación por pesos moleculares pero es sólo aproximadamente cierto. Lo anterior se corrobora, en este trabajo, al intentar calibrar el sistema de filtración con una serie de compuestos de PM conocido. Los datos graficados en la Figura 6 muestran que si bien algunos compuestos se ubican en un orden esperado por su PM, otros presentan un comportamiento anómalo. Bradiquinina y vitamina B<sub>12</sub>, con estructuras totalmente diferentes, son retenidas en la columna debido, probablemente, a un efecto de interacción de las sustancias con las partículas de Sephadex. En cambio, creatinina y urea eluyen en un volumen mucho menor que el que les correspondería por su PM. Este comportamiento es difícil de interpretar, no pudiéndose determinar que esos compuestos sufran agregación molecular durante el proceso de filtración.

Los resultados obtenidos con los compuestos de PM conocido utilizados muestran que el volumen de elución necesario para separar varios solutos de la columna de Sephadex no guarda una relación inversa estricta con los logaritmos de los PM de los solutos. Ya en otros trabajos se habían mencionado problemas similares con algunos marcadores de peso molecular (Cueille, 1978; Chapman et al., 1980).

Muchos de los compuestos empleados para la calibración - creatinina, urea, ácido úrico, guanidina- fueron elegidos por

que se encuentran presentes en concentraciones aumentadas en la uremia. La vitamina B<sub>12</sub> se incluye, especialmente, en este estudio debido a que es un maracador muy empleado para este tipo de calibración y porque gran cantidad de investigaciones realizadas en el tema adjudican un "peso molecular medio" a aquellas fracciones que eluyen en las cercanías de la vitamina B<sub>12</sub>, separándolas, de ese modo, de las sustancias de BPM.

En base a los resultados presentes se puede sugerir que esas fracciones, definidas de tal modo como "moléculas medias" (Dzúrik et al., 1973 a; Migone et al., 1974; Chang et al., 1974 ; Man et al., 1976; Fürst et al., 1976; Mamdani et al., 1979), podrían corresponder a sustancias de tamaño menor, como ya han demostrado algunos de esos investigadores. Es así como, de la fracción 7<sub>c</sub> de Fürst (asociada a los pacientes urémicos y ausente en los sujetos normales), que en un principio se ubicó entre 1 200-1 400 g/mol de PM (Fürst et al., 1976), se ha aislado, recientemente, su principal componente con PM de 371 g/mol (Bergström et al., 1981; Zimmerman et al., 1981). También Chapman et al (1981) obtuvieron para la fracción 7<sub>c</sub> de Fürst un PM entre 500 y 700 g/mol mediante el estudio de la depuración de la fracción 7<sub>c</sub> en un dializador calibrado (MTSC 1,0; Fresenius, Franckfurt) y por extrapolación del valor del clearance obtenido en una curva de calibración (ln PM vs. C<sub>sust.</sub>). Lo mismo sucedió con

la fracción  $b_{4-2}$  de Funck-Brentano. Mientras que, inicialmente, se le adjudicó un PM de 1200 g/mol por su comportamiento cromatográfico (Funck-Brentano et al.,1975), después de purificarla se determinó que correspondería a, aproximadamente, 500-600 g/mol (Cueille et al.,1981).

Luego de esas evidencias se puede suponer que otras fracciones (reportadas por diferentes autores) cuyos PM fueron estimados por cromatografía de filtración por geles comparándolos con los de marcadores conocidos, podrían también corresponder a tamaños menores.

Por los datos obtenidos en el presente trabajo queda demostrado que la vitamina  $B_{12}$  es un mal marcador de pesos moleculares para calibrar columnas de Sephadex G-25 y G-15. De la misma manera, es probable que tampoco sea un buen parámetro para calcular el clearance de "moléculas medias" in vitro e in vivo, a través de membranas biológicas o sintéticas, como se ha empleado en algunos estudios (Babb et al.,1973), ya que el comportamiento de interacción de la vitamina  $B_{12}$  con tales membranas no fue determinado.

A la luz de las demostraciones presentes, numerosos resultados publicados en la bibliografía deberían ser nuevamente discutidos.

Además de los expuestos, otros hallazgos del presente tra

bajo confirman la falta de una estricta discriminación de compuestos de diferente tamaño molecular mediante filtración por geles:

- El hecho de que el espectro de absorción de la Fracción B no se modifique con las variaciones del pH del medio en forma paralela al de la creatinina y la ausencia de correlación entre las superficies integradas de los picos B (en la IRC) y las concentraciones plasmáticas de creatinina determinadas por método químico indicaría que dicha fracción está constituida por más de una sustancia, incluyendo, entre ellas, a la creatinina. Esta sugerencia se corrobora al separar las fracciones por membranas selectivas, técnica mediante la que se puede demostrar que algunos compuestos de la Fracción B tienen PM entre 1 000 y 500 g/mol y otros, menores de 500 g/mol.

- Los resultados de la determinación de péptidos en los eluidos cromatográficos corroboran la suposición de que las fracciones separadas están compuestas por un grupo de sustancias de diferentes características e indican que los compuestos peptídicos no son los únicos responsables de la absorbancia a 280 nm, ya que ambas curvas -la de absorción a 280 nm y la de concentración peptídica- no se corresponden en muchos de los pacientes con IRC sometidos a tratamiento hemodialítico.



Los resultados de ultrafiltración a través de membranas con tamaños de retención calibrados permitirían descartar la interacción de las sustancias con las membranas empleadas, descrita por otros autores (Buckalew, 1972; Klein et al., 1981). La buena reproducibilidad obtenida con una misma muestra a diferentes pH y con muestras de distintos individuos, a pesar de haberse empleado volúmenes de muestra y tiempos de ultrafiltración muy diferentes, mostraría que el fraccionamiento es adecuado y que, probablemente, no se producen fenómenos de adsorción o se minimizan los de interacción con la membrana por la incorporación de la diafiltración dentro del proceso.

La combinación de las técnicas de cromatografía de filtración por geles y la separación por membranas selectivas permite determinar que algunas fracciones, preferentemente los picos B y C, estarían compuestos por sustancias de muy diferente PM.

Los datos obtenidos evidencian que:

1) La filtración por geles no es una técnica analítica apropiada para determinar la concentración de "moléculas medias", conclusión que se desprende, también, de datos publicados recientemente (Schoots et al., 1982) obtenidos empleando, además, técnicas de cromatografía gaseosa, espectrometría de masa, isotacoforesis y cromatografía líquida de alta presión, para caracterizar las fracciones separadas previamente por Sephadex.

2) La combinación de las técnicas de cromatografía de exclusión y ultrafiltración por membranas selectivas permite obtener fracciones con pesos moleculares menores de, aproximadamente, 2 500 g/mol (ya que las sustancias mayores son, prácticamente, excluidas del sistema) y establecer ciertos límites entre las mismas. En la Fracción A se encontrarían los componentes con mayor PM, ya que no se hallaron, formando parte de la misma, sustancias con absorbancia en UV con pesos moleculares menores de 500 g/mol. En las Fracciones restantes, de menor PM (B, C y D) no se encontraron sustancias con pesos moleculares mayores de 1 000 g/mol.

En base a esos resultados, el conjunto de las fracciones obtenidas puede ser considerado como constituido por sustancias de bajo y mediano peso molecular (BMPM) y, como tal, estudiar las características y efectos tóxicos de las mismas, independientemente de las diferencias entre los pesos moleculares de las sustancias componentes de las distintas fracciones.

Para semicuantificar los resultados se emplea el método de integración de áreas. Como se observa en la Figura 9, dentro de un rango adecuado para la lectura de absorbancia, se encuentra correlación lineal entre las cantidades de muestra utilizadas para realizar el fraccionamiento y las superficies de cada

pico en el diagrama cromatográfico.

La metodología empleada no permite comparar las áreas de los diferentes picos obtenidos dentro de un cromatograma, adjudicándoles una relación lineal área-concentración, debido a que cada fracción (A, B, C y D) está constituida por diferentes sustancias con absorbancia en UV, cada una de ellas con distinta absortividad molar a la longitud de onda a la que se está detectando. Las áreas no sólo estarían determinadas por la cantidad de una sustancia dada sino también por las características de absorción de la luz que tiene esa sustancia, características de pendientes de la estructura química del compuesto y de las propiedades del medio. Por lo tanto, sólo pueden obtenerse datos semicuantitativos.

Las magnitudes absolutas de las fracciones no pueden determinarse debido a la imposibilidad de realizar curvas de referencia con sustancias testigos conocidas, ya que se desconoce la estructura de los compuestos investigados. No se emplea una sustancia de referencia para comparar las superficies de las distintas fracciones pues ello no aportaría información adicional. Por lo tanto, se prefieren estudiar los diferentes cromatogramas en su aspecto cualitativo y comparar los datos semicuantitativos de cada fracción entre los distintos individuos, para lo cual se establece la suposición de que se comparan los

mismos grupos de sustancias en cada muestra. Esta suposición parecería bastante acertada ya que los espectros de absorción en el UV y los volúmenes de elución de cada fracción coinciden bastante bien en todos los casos estudiados. De esta forma, se pueden establecer comparaciones y diferencias y hacer discriminaciones, aunque semicuantitativas, entre los diferentes pacientes.

#### DISCUSION DE LOS RESULTADOS DE LOS PERFILES CROMATOGRAFICOS Y DE LA CARACTERIZACION DE SUSTANCIAS

Mediante la aplicación de la técnica descrita a líquidos biológicos obtenidos en situaciones clínicas específicas se pudieron realizar análisis comparativos de los resultados en un intento por ampliar la información acerca de la naturaleza química y del potencial significado clínico de los solutos detectados.

Se estudiaron 287 muestras de líquidos biológicos que incluyeron plasma y orina de sujetos controles y de pacientes urémicos (con IRC y con IRA, previos o posteriormente a haber comenzado los tratamientos con hemodiálisis o diálisis peritoneal) y de pacientes en recuperación después de una insuficiencia renal aguda y en días sucesivos a un trasplante renal, como así también, líquidos de hemodiálisis, hemofiltración y de diálisis

peritoneal y plasma de pacientes con diferentes patologías sin compromiso renal.

(A)

- Se detectaron sustancias de BMPM, con absorbancia en UV , en el plasma de los pacientes urémicos a diferencia de los sujetos controles y de los pacientes no renales.
- Se observaron diferencias entre los perfiles cromatográficos plasmáticos de los pacientes con IRC y los de IRA.

Los resultados obtenidos permiten demostrar la presencia de sustancias de BMPM, con absorbancia en UV, en el plasma de pacientes urémicos no dializados. Estos hallazgos concuerdan con los obtenidos por otros autores, a pesar de diferir en algunos detalles metodológicos (Dall'Aglío et al., 1972; Dzúrik et al., 1973 a; Man et al., 1973 b; Migone et al., 1974; Fürst et al., 1975; Mamdani et al., 1979; Chapman et al., 1980). Se podría sugerir que esa presencia se debe a acumulación de sustancias, como producto de la supresión de la función renal por el hecho de que no han sido detectadas en sujetos controles o en otros pacientes no renales. Sin embargo, no se puede discriminar, por estos resultados, si las diferencias halladas entre plasmas con controles y urémicos se deben a la aparición de productos patológicos, provocada por la enfermedad, o a la acumulación, como consecuencia de la toxicidad urémica, de sustancias que normal-

mente circulan en cantidades no detectables por los métodos empleados.

Algunos trabajos publicados indicaron la presencia de un mayor número de fracciones urémicas cuando las muestras fueron sometidas a la separación cromatográfica en Sephadex G-25 o G-15, aunque muchos de los picos no fueron bien resueltos o sólo se trataba de inflexiones en las curvas. En este estudio se incluyen todas las subfracciones en tres picos principales (A, B y C) -aún cuando en algunos cromatogramas parecerían estar formados por más de una fracción- debido a que los tres picos mencionados están bien resueltos, presentan volúmenes de elución definidos y constantes que se reproducen en todas las muestras provenientes de los diferentes individuos.

En dos pacientes con IRC moderada ( $C_{cr}$  mayor de 25 ml/min) se encontraron concentraciones de sustancias de BMPM totales en el límite superior de los valores hallados para los sujetos controles. Sin embargo, los perfiles cromatográficos se pueden diferenciar perfectamente por su aspecto cualitativo; los de los pacientes renales muestran, aún en bajas concentraciones, las 3 fracciones características de la IRC mientras que los pertenecientes a los sujetos controles presentan pequeñas fracciones, no bien definidas, ninguna de las cuales tiene espectros de absorción característicos como los de las fracciones urémicas A,

B o C.

Algunos autores (Asaba et al., 1976) encontraron que para poder detectar sustancias de "PMM" (la fracción llamada por el pico 7<sub>c</sub>) sería requisito indispensable que la filtración glomerular estuviera sustancialmente disminuída. Si consideramos las sustancias de BMPM en su totalidad, tal como se determinan en el presente trabajo, se observa que los pacientes con IRC moderada, con C<sub>cr</sub> de, aproximadamente, 30 ml/min, ya presentan los perfiles cromatográficos característicos de la IRC, con concentraciones plasmáticas de BMPM totales levemente superiores a las de los controles. La misma asociación, junto con valores normales de otras determinaciones plasmáticas se encuentra, también, por el A.F.C.

Es interesante destacar el hallazgo de cantidades comparables de BMPM totales en los pacientes con IRA (quienes padecen una supresión brusca y casi total de la función renal) y en los pacientes con IRC terminal (quienes han sufrido una prolongada evolución de la enfermedad). Sin embargo, los valores más altos de BMPM y de la Fracción A están asociados con la IRA y, dentro de ésta, con los casos severos de abortos sépticos con síndrome de Mondor, post-quirúrgicas y post-parto (A.F.C.).

Si se establece la suposición de que cada una de las fracciones está constituída por los mismos componentes, las varia -

ciones entre las distintas patologías serían, sólo, cuantitativas. Si esta suposición no es totalmente cierta, podríamos sugerir que lo que hace variar las áreas de los cromatogramas es la presencia de diferentes sustancias con absorbancia en UV en los dos síndromes estudiados: IRC e IRA, y pondría de manifiesto la importancia de una función renal residual, aún mínima, en la IRC para la depuración de determinados compuestos, especialmente los de mayor PM (Fracción A).

Independientemente de las interpretaciones, el hallazgo de una diferente distribución de las fracciones urémicas en la IRC y en la IRA (Figura 10) resulta muy importante, ya que, mediante esta metodología se puede aportar un dato valioso para el diagnóstico diferencial de la patología renal.

La diferente distribución de sustancias de BMPM que se encuentra en la IRA y en la IRC podría tener relación con el tiempo de evolución de la enfermedad. La mayor cantidad y/o diferente calidad de compuestos de peso molecular mayor (pico A), así como la detección de su naturaleza peptídica en los pacientes agudos podría indicar que, en estadios precoces de la insuficiencia renal, se acumularían sustancias distintas de las que son retenidas en el proceso más lento de la IRC y que aquéllas podrían ser producto de un exagerado catabolismo proteico.

El mayor porcentaje de la Fracción B se asocia con perfo-



dos prolongados de evolución de la IRC y con la presencia de síntomas tales como alteraciones óseas e hipertensión arterial severa, que involucran mecanismos metabólicos y homeostáticos (A. F.C.).

Poco interés fue demostrado en las investigaciones relacionadas con la uremia en caracterizar las posibles toxinas acumuladas en la etapa aguda. Sólo en dos trabajos, de los numerosos que componen la bibliografía relacionada con el tema, se describieron perfiles cromatográficos del plasma de pacientes con IRA (Gordon et al., 1975; Mamdani et al., 1979). En ambos se hace referencia, sin discutirlo, al hallazgo de diferencias con respecto a los perfiles de la IRC. Si bien no pueden compararse totalmente los resultados con los del presente trabajo por haber sido obtenidos con distinta metodología, se podrían establecer ciertas analogías, ya que los perfiles de la IRA mostrados en dichos trabajos también presentarían mayor concentración de compuestos de PM mayor, aunque en fracciones no bien descriptas.

De acuerdo con los resultados que se presentan aquí se podría postular que en la IRC se encuentra una mayor proporción de sustancias de BPM. Esto sería consistente con la acumulación de metabolitos intermedios debido a alteraciones metabólicas como resultado de inhibiciones enzimáticas, fallas nutricionales o desequilibrios hormonales, establecidos a lo largo de una en-

fermedad de prolongada evolución.

Los perfiles cromatográficos de algunos pacientes con IRC y con IRA que no concordaron con los característicos obtenidos para cada uno de esos grupos no se asociaron con ninguna de las variables analizadas por el A.F.C., tales como etiología, grado de evolución de la enfermedad, tratamiento, signos clínicos ni otros datos bioquímicos.

No se puede descartar totalmente la presencia de metabolitos de algún medicamento, como artefacto de los perfiles cromatográficos que no concordaron con los característicos de su patología. Chapman et al. (1980) encontraron varios artefactos cuando emplearon fraccionamiento por intercambio iónico de plasmas con agregado de aminofilina, furseמידa y metildopamina.

Algunos medicamentos, pero no sus metabolitos, se probaron en el sistema cromatográfico empleado en este trabajo, sin encontrar interferencias.

Valores elevados de la variable Fracción A se asocian con la administración de antibióticos (ATB) en la IRA (A.F.C.) pero puede deberse a que es la medicación frecuente en la IRA con sepsis severas en las que la Fracción A aparece elevada.

De los 7 pacientes con IRA cuyos perfiles se desvían de los característicos, 4 eran tratados con ATB y los 3 restantes aún no recibían medicación en el momento de la extracción de la

muestra.

Ninguno de los 3 pacientes con IRC con perfiles cromato -  
gráficos no característicos recibía ATB y uno solo, corticoides.

(B)

- Se observó que las sustancias de BMPM son excretadas, normal-  
mente, por orina.
- No se encontraron diferencias estadísticamente significativas  
entre los  $C_{\text{BMPM}}$  y  $C_{\text{cr}}$  correspondientes a sujetos controles y  
a pacientes urémicos en diferentes estadios de la enfermedad.
- Los  $C_{\text{BMPM}}$ ,  $C_A$  y  $C_B$  se correlacionaron linealmente con el  $C_{\text{cr}}$ .

La similitud de los perfiles cromatográficos del plasma  
de los pacientes urémicos con los de orina de los sujetos con -  
troles (Figuras 5 y 14) indicaría que las sustancias de BMPM  
son eliminadas por esa vía. La falta de paralelismo entre las  
concentraciones plasmáticas de sustancias de BMPM y las de crea  
tinina en la IRC, indicaría que las sustancias de BMPM no se a-  
cumulan sólo pasivamente como resultado de una función renal  
disminuída. Este mecanismo probablemente sea cierto para algu -  
nas de ellas pero no ocurriría así con todas las encontradas en  
las fracciones cromatográficas, lo que permitiría explicar la  
pobre correlación encontrada. La falta de correlación entre las  
concentraciones plasmáticas de sustancias de BMPM y de creatinii

na también podría deberse a que la concentración plasmática de creatinina no constituye un parámetro totalmente confiable para evaluar la función renal, debido a que sus niveles dependen de la edad, sexo, masa muscular, dieta y superficie corporal. Se ha postulado como dato alternativo para calcular el filtrado glomerular la determinación plasmática de  $\beta_2$  - microglobulina (Shea et al., 1981). Con el mismo fin podría utilizarse la determinación de los niveles plasmáticos de las sustancias de BMPM ya que las asociaciones de los mismos con el tiempo de evolución de la IRC y con la severidad de ciertos síntomas (A.F.C.) así lo justificaría.

Bergström et al. (1976) encontraron grandes variaciones en la acumulación y excreción de sustancias de "PMM" (pico  $7_c$ ) en un mismo individuo e, inclusive, en algunos pacientes urémicos no encontraron fracciones plasmáticas de "PMM". En el presente trabajo no se observan grandes variaciones entre distintas muestras de un mismo individuo tomadas en días cercanos (coeficientes de dispersión menores del 10%). Se encuentran variaciones individuales cuantitativas en distintas etapas de la evolución de la enfermedad correlacionadas con las modificaciones de otros parámetros indicadores de la acumulación de sustancias.

Tampoco se encuentran variaciones en la excreción diaria de sustancias de BMPM totales entre los diferentes pacientes

con distintos grados de severidad de la IRC, excepto en aquellos casos de uremia terminal muy descompensados (Tabla IX). Los valores de  $(O_{\text{BMPM}} \times V)$  no difieren significativamente de los obtenidos en sujetos controles, lo que sugeriría, por lo menos hasta ciertos límites de función renal ( $C_{\text{cr}} < 5 \text{ ml/min}$ ), la presencia de un sistema de adaptación funcional para eliminar esas sustancias, probablemente tóxicas para el organismo, corroborando la importancia del mantenimiento de una, aunque mínima, función renal residual.

La estrecha correspondencia hallada entre el  $C_{\text{BMPM}}$  y el  $C_{\text{cr}}$  ( $r = 0,98$ ;  $p < 0,001$ ), tanto en los sujetos controles como en los pacientes urémicos dentro de un amplio rango del grado de insuficiencia renal debida a diferentes etiologías, podría indicar un mecanismo de excreción semejante de las sustancias de BMPM y de la creatinina. Dentro de los compuestos de BMPM, las dos fracciones más importantes, A y B, también presentan una depuración plasmática linealmente relacionada con la de creatinina ( $r=0,92$  y  $0,94$ , respectivamente; en ambos casos,  $p < 0,001$ ).

Parecería que tanto las sustancias de BPM (Fracción B) como las de tamaño molecular mayor (Fracción A) tendrían un mecanismo de excreción semejante al de la creatinina. Estos resultados difieren de los hallados por Dzúrik et al. (1973), quienes observaron que una fracción considerada de "peso molecular me -

dio" -pero con un volumen de elución que parecería corresponder al de la Fracción B del presente trabajo- sería reabsorbida en los túbulos en un 80%, reabsorción que iría disminuyendo con el progreso de la insuficiencia renal (medido por la disminución del filtrado glomerular).

La concentración sanguínea de las sustancias de BMPM se incrementa a medida que disminuye el filtrado glomerular, mientras se excretan cantidades relativamente normales de las mismas. La acumulación sérica de sustancias de BMPM durante un período prolongado hasta la etapa terminal de la insuficiencia renal no parecería deberse, entonces, a una disminuída excreción urinaria de las sustancias en cuestión.

(C)

- Se demostró que las sustancias plasmáticas de BMPM, con absorbancia en UV, son dializables a través de las membranas convenacionales de hemodiálisis y de la membrana peritoneal.
- No se encontró correlación lineal entre la disminución relativa porcentual de sustancias de BMPM y las disminuciones de urea y creatinina, producidas por la diálisis.
- Se observó que la cantidad de sustancias de BMPM totales depuradas en una sesión de hemodiálisis está directamente relacionada con la concentración plasmática pre-diálisis de dichas

sustancias.

La remoción de sustancias del organismo está condicionada por sus dimensiones moleculares y su permeabilidad a través de las membranas de diálisis.

Las sustancias de BMPM atraviesan, en cierta proporción, las membranas de hemodiálisis y del peritoneo. Esto se demuestra por la disminución de su concentración plasmática post-diálisis (Tabla XI) y por su aparición en los líquidos de hemodiálisis y de dializado peritoneal, después del tratamiento.

La hemodiálisis empleada produjo una disminución de la concentración de sustancias de BMPM plasmáticas del 38%, en promedio. Dzúrik et al. (1973 a) encontraron un 40% de disminución de las llamadas "moléculas medias" aunque, por el procedimiento de separación empleado, cabría la posibilidad de que la fracción investigada estuviera contaminada con sustancias de BPM.

En el presente trabajo sólo un paciente, en tratamiento dialítico, muestra una concentración plasmática post-diálisis de BMPM mayor que la pre-diálisis; en las mismas muestras también se encuentran aumentadas las concentraciones de creatinina y de urea. Se interpretan estos resultados como debidos a contracción del volumen plasmático, con consecuente concentración de las sustancias circulantes.

Por otra parte, se puede observar en la Figura 15 (b) y (d) que, en varios estudios, las concentraciones plasmáticas de las Fracciones A y C aumentan después de la diálisis mientras que las concentraciones de urea y de creatinina disminuyen dentro de los valores esperados. Estos hallazgos podrían indicar que los componentes de las Fracciones A y C serían sintetizados o liberados por los tejidos muy rápidamente. Esto explicaría la falta de correlación lineal de las cantidades de sustancias de BMPM totales o las de algunos de sus componentes con las cantidades de urea y de creatinina eliminadas por la diálisis.

Rutinariamente, sólo urea y creatinina son las sustancias que se cuantifican para determinar la eficacia de una diálisis. Los resultados aquí presentados permitirían sugerir que esos datos proveen una información incompleta para estimar la eliminación de los compuestos, probablemente tóxicos, acumulados en la uremia. Parecería que los dos grupos de sustancias, de BMPM por una parte y creatinina y urea por otra, se comportaran en forma diferente al ser sometidas al procedimiento de diálisis extra - corpórea.

Con estos únicos datos no se puede predecir el mecanismo de diálisis de las sustancias de BMPM. Por tratarse de varios compuestos son muchos los factores que pueden estar involucrados, tales como diferente velocidad de difusión a través de las



membranas de diálisis, distribución en distintos compartimientos del organismo, distinta velocidad de intercambio entre uno y otro compartimiento (flujo desde el intracelular, el intersticial o el eritrocítico hacia el plasma) y diferente ritmo de producción en el organismo.

La relación existente entre la cantidad de sustancias de BMPM depuradas por la diálisis con su concentración plasmática pre-diálisis (Figura 16) permite sugerir un mecanismo de difusión simple, a través de las membranas sintéticas, para todas o para la mayoría de las sustancias involucradas.

La concentración plasmática pre-diálisis de las sustancias de BMPM totales no resulta significativamente diferente de la de los pacientes con IRC terminal sin tratamiento.

Se observa una gran variabilidad de las concentraciones plasmáticas pre-diálisis de las sustancias de BMPM pero ningún paciente presenta valores normales, como reportaron otros autores (Dzúrik et al., 1973 a).

Se puede decir que el tratamiento dialítico intermitente convencional empleado no es satisfactorio para la remoción de las sustancias de BMPM estudiadas ya que, si bien cada diálisis provoca una disminución promedio de la concentración de 38%, tales sustancias reaparecen en circulación tan rápidamente que su concentración es restaurada antes de la próxima diálisis; es de

cir, que las sustancias son sintetizadas o difunden desde otros compartimientos muy rápidamente. Estos hallazgos coinciden con los obtenidos por otros investigadores que emplearon diferentes membranas y parecerían indicar que el tratamiento hemodialítico no conduce a una disminución permanente de las concentraciones plasmáticas de sustancias de BPPM; más bien, contribuye a mantenerlas en niveles semejantes a los de los pacientes renales crónicos en tratamiento conservativo, antes de comenzar con la diálisis.

Numerosos sistemas de diálisis y membranas sintéticas se diseñaron para depurar las sustancias de "PMM" de la sangre con mayor rapidez. Para determinar la eficacia del sistema, algunos autores realizan la cuantificación de dichas sustancias en el plasma, antes y después de la diálisis. Esta forma de expresión de un sistema dialítico no sería correcta ni útil hasta tanto no se demuestre la toxicidad de las llamadas "MM" y, por lo tanto, la necesidad de una mayor depuración de las mismas. Menos apropiadas, todavía, resultan aquellas técnicas que emplean marcadores de "PMM" -tales como la vitamina B<sub>12</sub>, de PM igual a 1355 g/mol- para predecir el comportamiento dialítico de las "MM", ya que no se ha comprobado que tengan un comportamiento semejante. Ya se ha discutido, en este trabajo, el comportamiento anómalo de algunas sustancias, entre ellas, la vitamina B<sub>12</sub>,

en cromatografía de exclusión debido a la retención en la columna por interacción con el gel. No se puede descartar que esas anomalías también se reflejen en la difusión a través de membranas. Algunos compuestos podrían ser dializados como si tuvieran un tamaño mayor; este fenómeno puede esperarse debido a que algunas especies son adsorbidas por atracción de van der Waals sobre los polímeros hidrofóbicos que conforman las membranas sintéticas (Klein et al., 1981).

Si bien no debe abandonarse el problema de la remoción de sustancias de BMPM del organismo, debe prestarse especial atención a la investigación de sus características tóxicas y a sus relaciones metabólicas, fisiológicas y clínicas para poder determinar con certeza si las manifestaciones urémicas que aún se mantienen en los pacientes con tratamiento dialítico son debidas a la presencia de factores pobremente dializables. Sólo así se podrá desarrollar una estrategia dialítica adecuada mediante un procedimiento selectivo.

(D)

- Se observó que la concentración plasmática de sustancias de BMPM se normaliza cuando se restablece la función renal, después del trasplante.
- En el caso estudiado, se encontró que la Fracción A aumentó

precozmente frente a un rechazo del órgano trasplantado.

- Al comenzar la evolución desfavorable del trasplante la creatinina pareció ser el único componente de la Fracción B, agregándose otras sustancias en dicha fracción, a medida que progresa el daño renal.
- La concentración plasmática de sustancias de BMPM aumentó rápidamente con la disminución progresiva de la función renal y disminuyó hasta valores normales con el restablecimiento de la misma.

La normalización de la concentración plasmática de las sustancias de BMPM inmediatamente después del trasplante renal (Figura 17) como así también en la fase de recuperación de la IRA (Figura 19), con perfiles cromatográficos semejante a los de los sujetos controles, permitiría suponer que esas sustancias se retendrían debido al fallo renal y serían depuradas por un riñón sano (por catabolismo renal o por excreción urinaria).

El aumento precoz de la Fracción A coincide con el hallazgo de una mayor proporción de la misma fracción en los pacientes con IRA; parecería ser una fracción característica de la fase aguda. Este aumento de la Fracción A podría deberse a la retención de sus componentes por la disminución, aún leve, de la función renal o a un incremento en la producción o liberación tisular de esas sustancias, en cuyo caso el aumento podría pre-

ceder a la alteración renal. La aparición de la Fracción A por causa extrarrenal estaría sustentada, en parte, por la observación de que los 2 pacientes con IRA prerrenal (con insuficiencia cardíaca) presentaron concentraciones de la Fracción A muy superiores a las de la Fracción B.

La falta de correlación lineal entre el aumento de la concentración plasmática de la Fracción A y la disminución de los  $C_{cr}$  y  $C_{ur}$  permitiría suponer la presencia de alguna otra causa, además de la acumulación pasiva de los componentes de la Fracción A por la disminución de la función renal.

La correlación inversamente lineal entre la concentración plasmática de la Fracción B y el  $C_{cr}$  estaría relacionada con que, al principio de la insuficiencia renal, el pico B parecería estar formado, casi exclusivamente, por creatinina (Tabla XIII).

De todos los hallazgos es importante destacar el aumento precoz de la concentración plasmática de la Fracción A, ya que es previo a las variaciones de las demás determinaciones (Figura 17). Sería interesante tratar de establecer relaciones de las concentraciones de las sustancias de BMPM o de cualquiera de sus fracciones con la irreversibilidad del rechazo del órgano. Si esto se lograra, se podría contar con un parámetro adecuado y confiable para controlar la evolución del trasplante

renal.

(E)

Se determinó la presencia de:

- Urea y creatinina en la Fracción B.
- Acido úrico en la Fracción D.
- Componentes peptídicos -algunos de cuyos aminoácidos constituyentes fueron identificados- en la Fracción A, en mayor concentración en los pacientes con IRA que en los con IRC.
- Diversos compuestos fluorescentes sin identificar en fracciones correspondientes a distintos rangos de PM.

La separación por cromatografía de alta presión y los ensayos de identificación permiten confirmar que las Fracciones A, B y C están constituidas por varios compuestos.

Creatinina y urea se encuentran dentro de los volúmenes de elución de la Fracción B. La Fracción D, cuyo componente principal o único es ácido úrico, está aumentada en los pacientes urémicos, aunque no se encuentra presente en todos los cromatogramas.

Entre las sustancias de BMPM se hallan compuestos peptídicos no identificados totalmente, ya que por hidrólisis y posterior fraccionamiento electroforético sólo se pudieron determinar algunos de los aminoácidos constituyentes. Estos resultados

concuerdan con los obtenidos por otros autores (Migone et al., 1974; Klein et al., 1978).

El incremento de las concentraciones séricas de sustancias peptídicas en la uremia podría no deberse exclusivamente a la disminución de la función excretora del riñón, ya que Adam et al. (1972) encontraron una excreción aumentada de sustancias ninhidrina positivas en los pacientes con IRC, con respecto a los controles. En ese caso, los mecanismos de acumulación se corresponderían mejor con un aumento de la producción debido a una mayor degradación proteica o a un disminuído catabolismo peptídico.

La observación de que los compuestos peptídicos se encuentran en la IRA en cantidades apreciables principalmente en los eluídos cromatográficos plasmáticos correspondientes a la Fracción A apoyaría la sugerencia de que la elevada proporción de esa fracción , que se observa en la IRA, podría deberse a sustancias provenientes de un incrementado catabolismo proteico desencadenado en la etapa aguda de la enfermedad.

Se observa que sustancias peptídicas componentes de la Fracción A son eliminadas del plasma urémico por hemodiálisis y por diálisis peritoneal (Figura 26); es decir, que son compuestos que difunden a través de las membranas sintéticas o biológicas comúnmente empleadas. Además, se podría afirmar que no cons-

tituyen un factor muy importante de toxicidad urémica -porque no se detectan en muchos de los pacientes sometidos a tratamientos dialíticos prolongados- mientras que otros compuestos, incluyendo probablemente a otras sustancias de BMPM sin absorban- cia en UV, tienen que ser permanentemente eliminados del organismo para mantener un estado adecuado de esos pacientes.

Los resultados de la separación electroforética por E.A.V. permiten suponer la presencia de un solo componente peptídico , en la fracción con PM 500 g/mol, o bien, de varios péptidos con muy semejantes tamaños moleculares, estructura y movilidad - des electroforéticas en distintas condiciones de pH (2,2 y 4,7). La mayor concentración de ese péptido en la IRA permite la identificación de alguno de sus aminoácidos constituyentes pero no se puede comparar con el material peptídico presente en la IRC, ya que en estas muestras desaparece el componente peptídico luego de la hidrólisis pero no se pudieron identificar los aminoácidos.

Algunos investigadores (Hanicki et al.,1974) hallaron un péptido, en una fracción plasmática de la IRC, empleando electroforesis en capa delgada. Las condiciones de pH y de revelado de la electroforesis fueron las mismas que las empleadas en el presente trabajo; podría tratarse de la misma sustancia, aunque no es posible asegurarlo ya que ellos no indicaron la velocidad



de migración del péptido.

Los estudios de fraccionamiento empleando HPLC, una técnica con elevado poder de resolución y gran sensibilidad, permiten determinar la presencia de varios compuestos con absorbancia en UV en los UF plasmáticos totales y en las fracciones acotadas por PM, en la uremia (Figuras 20, 21 y 22). Los volúmenes de elución o tiempos de retención, característicos de cada sustancia separada por esta técnica, no pueden ser comparados con los obtenidos mediante cromatografía de filtración por Sephadex. Ello se debe a que para el fraccionamiento por HPLC se emplea una columna de fase reversa que permite la separación de los compuestos de acuerdo a su estructura y no por su tamaño molecular, si bien las sustancias separadas por HPLC son componentes de las fracciones de BMPM.

La detección de compuestos fluorescentes en las fracciones cromatográficas de los plasmas urémicos concuerda, en parte, con otros resultados publicados. Vladutiu (1978, 1981) encontró sustancias fluorescentes en el plasma de pacientes con IRC sin tratamiento dialítico y en el de los sometidos a plan de hemodiálisis o de diálisis peritoneal pero no en el de los pacientes con IRA. Inclusive, sugirió la determinación de esos compuestos como método diferencial para distinguir ambas formas de enfermedad renal. También halló compuestos fluorescentes en la orina

de los pacientes con IRC y, uno de esos fluorógenos, en orina normal. Las sustancias fluorescentes no identificadas se encontraron unidas a albúmina y/o a otros compuestos plasmáticos con PM cercanos a 100 000 g/mol. Otros autores encontraron compuestos fluorescentes en los líquidos de diálisis (Schwertner et al 1980).

(F)

- Se encontraron sustancias de BMPM con absorbancia en UV (picos A, B, C y D) en los lisados de eritrocitos controles y urémicos.
- Los perfiles cromatográficos eritrocitarios mostraron diferencias individuales, tanto entre los sujetos controles como entre los pacientes con IRC.
- Se detectó la presencia de glutation, péptidos, creatinina y ácido úrico dentro de las fracciones de BMPM eritrocíticas.

Los resultados que se obtienen con los perfiles cromatográficos de eritrocitos lisados indican que existe una marcada diferencia en la cantidad y/o calidad de las sustancias con absorbancia en UV respecto del plasma. Esta diferencia es muy acentuada en los eritrocitos controles, ya que en el plasma de los mismos individuos no se detectan sustancias con comportamiento cromatográfico semejante.

En los perfiles cromatográficos plasmáticos no se observan grandes variaciones entre los individuos de un mismo grupo. No ocurre lo mismo con los perfiles cromatográficos de los eritrocitos. La presencia de las sustancias investigadas parecería estar más afectada por factores individuales que por modificaciones introducidas por la enfermedad. Si hubiera que adjudicar la causa de la anemia a una sustancia o grupo de ellas obtenidas por el método cromatográfico empleado, en base a estos resultados se elegiría un compuesto extracorpúscular, ya que dentro de los glóbulos rojos no se encontraron diferencias significativas entre los controles y urémicos. Chapman et al. (1980) también encontraron similitud entre los perfiles cromatográficos de los lisados de eritrocitos normales y urémicos, aunque estos hallazgos se refieren a los subpicos de una fracción, llamada de "PMM", obtenida con metodología algo diferente a la utilizada en el presente trabajo.

La gran diferencia de concentración de sustancias de BMPM entre los lisados de eritrocitos y los plasmas de los sujetos controles sugiere que, por lo menos algunos compuestos, se originarían dentro del glóbulo rojo y estarían, normalmente, unidos a componentes celulares o serían transferidos desde la célula por transporte activo mientras que, en la uremia, difundirían hacia el plasma por alteración en los mecanismos de transpor

te .

La diferente distribución de varios compuestos entre el plasma y los eritrocitos puede tener consecuencias importantes en el aspecto metodológico de los estudios: 1) debe evitarse la hemólisis de las muestras para prevenir la aparición de artefactos en los resultados, sobre todo cuando se quieren estudiar perfiles cromatográficos de plasmas controles, donde las interferencias podrían ser de magnitud considerable; 2) cualquier modelo matemático utilizado para modificar los niveles de esas sustancias durante el curso de estudios clínicos prospectivos de su toxicidad debe tener en cuenta la posible naturaleza doble compartimental de su distribución. Esta observación pone en duda la utilidad de los índices de diálisis empleados para predecir los tiempos de diálisis a partir de la remoción calculada de sustancias con hipotéticos "PMM", distribuidas en un único compartimiento del organismo.

#### DISCUSION DE LOS ESTUDIOS DE TOXICIDAD

##### (G)

- Las fracciones y subfracciones, conteniendo sustancias de BMPM, provenientes de plasma de sujetos controles no afectaron la respuesta linfoproliferativa.
- Una subfracción ( $\delta$ ) de plasma de IRC, ubicada dentro de los e

luídos del pico A, produjo estimulación del MLC.

- Varias subfracciones de plasma de IRC, de diferentes PM (con y sin absorbancia en UV), produjeron diversos grados de inhibición del MLC.
- Todas las fracciones y subfracciones provenientes de plasma de IRA produjeron inhibición del MLC.

Los resultados obtenidos muestran una importante inhibición de la proliferación linfocitaria (inducida "in vitro" por mitógenos inespecíficos -PHA- y por células alogeneicas, en el MLC) cuando los cultivos se realizan en presencia de fracciones plasmáticas de BMPM totales de pacientes con IRC. Fracciones plasmáticas comparables, provenientes de sujetos controles, no producen inhibición significativa.

El subfraccionamiento de sustancias de BMPM pone en evidencia que, en el plasma de los pacientes con IRC, se encuentran presentes sustancia(s) potenciadora(s) de la proliferación celular "in vitro" (Fracción  $\delta$ , de PM > 500 g/mol) y varios compuestos que impiden la síntesis de DNA en las células (estos últimos, probablemente, con PM < 500 g/mol). La acción inhibitoria parecería estar más asociada con una estructura o función química que con solutos de determinado PM.

La correlación lineal directa que se encuentra entre la concentración de la Fracción A y el grado de estimulación de la

proliferación celular que produce esa fracción podría indicar que las sustancias involucradas en ese proceso absorben a 251 nm y se detectan por el método cromatográfico empleado. La falta de igual correlación con las concentraciones de las Fracciones B y C, así como también la inhibición del MLC producida por e-luidos cromatográficos sin absorbancia en UV indicaría que o - tras sustancias, además de las detectadas a 251 nm, ejercen e - fectos tóxicos.

Los hallazgos de linfopenia y acortamiento de la sobrevi - da "in vitro" de los linfocitos de pacientes urémicos podrían in - terpretarse como un resultado compatible con una acción citotó - xica directa. Los estudios del presente trabajo con azul tripán no muestran pérdida de la viabilidad de los linfocitos normales incubados en medios urémicos. Newberry et al. (1971) demosta - ron que, si las células son previamente incubadas con suero uré - mico y luego lavadas y colocadas en un sistema estimulador apro - piado, no se producía inhibición de la síntesis de DNA, resulta - dos corroborados con ensayos similares en el presente estudio. Esas observaciones apoyarían la hipótesis de la existencia de factores tóxicos circulantes, presentes en el medio en el que la célula debe funcionar, más que a un defecto primario de la es - tructura celular. La disminuída respuesta linfoproliferativa tampoco puede adjudicarse a la deficiencia o carencia de un nu -

triente o factor necesario para la función linfocitaria. Se puede descartar esta posibilidad pues todos los ensayos se realizan en presencia de una misma concentración (20%) de suero humano AB que aporta los factores esenciales para el crecimiento.

La respuesta a la estimulación linfocitaria por PHA o por células alogeneicas "in vitro" refleja la transformación potencial de los linfocitos T que son los responsables de la inmunidad mediada por células. Parecería posible, por los resultados de este trabajo, que las sustancias investigadas suprimieran fenómenos inmunológicos de ese tipo "in vivo". La Fracción  $\text{f}$ , de la IRC, que produce un marcado aumento de la respuesta linfoproliferativa, podría estar estimulando una población de linfocitos T supresores afectando, de ese modo, la respuesta celular normal. Podría inferirse que las distintas fracciones de sustancias de BMPM estudiadas son biológicamente activas con respecto a mecanismos inmunológicos .

Las diferencias que se observan entre las distintas fracciones plasmáticas (A, B y C) de la IRC no se encuentran en las mismas fracciones plasmáticas de la IRA, ya que todas las últimas producen inhibición de la respuesta linfoproliferativa. Esta observación podría estar relacionada con la presencia de diferentes sustancias acumuladas en la uremia crónica y en la aguda detectadas por los perfiles cromatográficos y por los ensayos

de identificación, ya descriptos en este trabajo.

La mayoría de las sustancias ensayadas para control de toxicidad ejercen poco o ningún efecto sobre la respuesta linfo - proliferativa (Tabla XVII), aún en concentraciones varias veces superiores a las que se encuentran en el plasma urémico. La inhibición producida por las poliaminas (espermina, espermidina y cadaverina) podría estar relacionada con el mecanismo enzimático de producción de estas sustancias durante el crecimiento celular estimulado.

El efecto inhibitorio casi total que produce el glutatión podría sugerir un mecanismo de bloqueo enzimático competitivo , mecanismo que también podría ejercer alguna de las sustancias sulfuradas, detectadas entre los compuestos de BMPM, que se acumulan en la uremia.

No se puede descartar, sin embargo, la acción tóxica que pueda introducir alguna impureza de las sustancias testigos estudiadas, como fue reportado por Traeger et al. (1981), quienes encontraron que, empleando metilguanidina altamente purificada, se obtenía una inhibición de la proliferación linfocitaria mu - cho menor que la observada en trabajos previos propios.

El origen y significado biológico de las sustancias de BMPM con actividad sobre la proliferación celular pertenece, aún, al terreno de las especulaciones, pudiendo postularse las si -



güentes posibilidades:

- a) son sustancias tóxicas acumuladas por el fallo renal o producidas en mayor concentración como resultado de un metabolismo anormal, o
- b) son factores reguladores de la proliferación celular afectados por disfunciones metabólicas o alterado catabolismo renal.

Cualquiera sea la naturaleza de esos compuestos podrían contribuir a la inmunodeficiencia de los pacientes urémicos.

(H)

- No se encontraron alteraciones de la actividad neuromuscular en las ratas inyectadas con fracciones de BMPM de IRC y de IRA, con respecto a las controles.
- No se encontraron diferencias de los efectos sobre el PA en nervio aislado de rana, producidos por las muestras provenientes de pacientes con IRC con y sin polineuropatía.
- Las modificaciones drásticas del PA producidas por algunas muestras desaparecieron o disminuyeron significativamente después de la corrección de la composición de las soluciones empleadas.

No se encuentran alteraciones significativas de las propiedades mecánicas del músculo ni de la VCN por acción de los compuestos urémicos en ensayos con ratas.

De la imposibilidad de demostrar toxicidad surge la necesidad de investigar la presencia de sustancias de BMPM circulantes a posteriori de la inyección i.v. Los perfiles cromatográficos de los UF plasmáticos de las ratas con distintos períodos de nefrectomía son indistinguibles de los de las inyectadas con sustancias de BMPM plasmáticas de pacientes con IRC. Esto sugeriría una distribución de las sustancias inyectadas en otros compartimientos, además del vascular, o su eventual incorporación a algunos tejidos. Lo anterior es más evidente con la Fracción B, de la que se inyectaron mayor número de unidades que no fueron recuperadas en circulación. La comparación de los perfiles cromatográficos también muestra una rápida acumulación de sustancias de BMPM después de la nefrectomía. Por lo tanto, el modelo sería válido para estudiar la acción tóxica de compuestos urémicos pero no se pueden distinguir los efectos producidos por las sustancias inyectadas de los que provocan los compuestos urémicos endógenos que se están generando por la nefrectomía bilateral.

Los resultados de Funck-Brentano et al. (1978 b) sobre nervio aislado expuesto a suero de pacientes polineuropáticos son, prácticamente, el único sustento experimental de la hipótesis de la participación de las sustancias de "PMM" en la patogénesis de la neuropatía urémica. Se reconoce que la neuropatía

de la IRC es un proceso crónico con una coincidente alteración estructural, por lo que no es muy riguroso vincular los efectos casi inmediatos encontrados por esos autores con la patogenia de la enfermedad.

Para tratar de reproducir esos hallazgos se realizan experimentos similares. Los resultados que se exponen en el presente trabajo no permiten confirmar las diferencias en el deterioro del PA evocado , empleando nervio aislado sural de rana, por acción de las muestras de pacientes con y sin polineuropatía , como encontraron los autores antes mencionados.

Además, en aquellas muestras de orinas controles con las que se obtiene, inicialmente, un deterioro dramático del PA, el efecto desaparece o se reduce significativamente después de realizar una minuciosa corrección (del pH, osmolaridad y concentración de electrolitos). Lo expuesto muestra la importancia de realizar controles estrictos y estandarizar las condiciones en ensayos experimentales de este tipo que, de lo contrario, podrían conducir a conclusiones incorrectas.

Sin embargo, el deterioro remanente después de la normalización de algunas muestras, así como también las pequeñas modificaciones de la duración del PA, que producen las muestras de pacientes con IRC con respecto a las controles, hacen que no se pueda excluir totalmente un efecto tóxico, que podría aumentar

a lo largo de la evolución de la insuficiencia renal.

Los ensayos experimentales de este tipo son pasibles de algunas objeciones :1) el empleo de animales de experimentación (rana) de género muy diferente al de aquéllos con los que se desean homologar los resultados y 2) la extrapolación de un fenómeno agudo a un daño clínicamente crónico.

Es casi seguro que la neuropatía presente en pacientes con IRC es la consecuencia de un efecto tóxico que se establece con el desarrollo de la enfermedad aunque su progreso parecería estar más afectado por otras causas distintas del tiempo de evolución, ya que no se encontraron asociaciones por el A.F.C. El mecanismo de producción de la afección podría estar relacionado con una interferencia en los procesos metabólicos, por lo cual las alteraciones requerirían períodos más prolongados que minutos u horas para ser producidas.

La insuficiencia renal, sea aguda o crónica, es una manifestación de una suma compleja de alteraciones en el organismo.

En la IRC, esa complejidad deriva de la imposibilidad de señalar un signo precoz de la enfermedad, la que va, de ese modo, avanzando lentamente hasta provocar el deterioro total de la función renal.

Frente a los conocimientos presentes resulta evidente que

numerosos compuestos se acumulan en el organismo en el estado urémico; indudablemente, son muchos más que los que se detectan sólo por sus propiedades de absorción de la luz UV. No caben dudas de que, entre los compuestos, varios corresponden al rango de PM de las "moléculas medias". Sin embargo, los datos actuales son insuficientes para apoyar, como única válida, la hipótesis de las MM y adjudicar a éstas la causa de la profusa gama de síntomas urémicos.

En conjunto con las sustancias de PMM se encuentran -utilizando distintas técnicas metodológicas- sustancias de BPM. Muchas de ellas se encuentran, aún, sin identificar aunque se las detecta por sus efectos tóxicos directos. Por lo tanto, no se las puede descartar totalmente en una investigación de "toxinas urémicas".

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Montoya", written over a horizontal line.

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Alvarez", written over a horizontal line.

## BIBLIOGRAFIA

- Abiko, T., Kumikawa, M., Dazai, S., Takahashi, H., Ishizaki, M. and Sekino, H. (1978 a). Studies on uremic toxins; structure-activity correlation in H-Asp(Gly)-OH. Biochem. Biophys. Res. Commun., 82:707.
- Abiko, T., Kumikawa, M., Ishizaki, M., Takahashi, H. and Sekino, H. (1978 b). Identification and synthesis of a tripeptide in ECUM fluid of an uremic patient. Biochem. Biophys. Res. Commun., 83:357.
- Abiko, T., Kumikawa, M., Higuchi, H. and Sekino, H. (1978 c). Identification and synthesis of a heptapeptide in uremic fluid. Biochem. Biophys. Res. Commun., 84:184.
- Abiko, T., Kumikawa, M. and Sekino, H. (1979 a). Inhibition effect of rosette formation between human lymphocytes and sheep erythrocytes by specific heptapeptide isolated from uremic fluid and its analogs. Biochem. Biophys. Res. Commun., 86:945.
- Abiko, T., Onodera, I. and Sekino, H. (1979 b). Isolation, structure and biological activity of the Trp-containing pentapeptide from uremic fluid. Biochem. Biophys. Res. Commun., 89:813.
- Adam, J., Dzúrik, R. and Valovičová, E. (1972). Ninhydrin-positive substances in serum and urine of patients with chronic

- uraemia. Clin. Chim. Acta, 36:241.
- Arieff, A. and Guisado, R. (1976). Effects on the central nervous system of hypernatremic and hyponatremic states. Kidney Int., 10:104.
  - Asbury, A., Victor, M. and Adams, R. (1963). Uremic polyneuropathy. Arch. Neurol., 8:413.
  - Assenza, S. and Brown, Ph. (1980). Evaluation of reversed-phase radially compressed, flexible-walled columns for the separation of low molecular weight, UV-absorbing compounds in serum. J. Liquid Chromat., 3:41.
  - Babb, A.L., Popovich, R.P., Christopher, T.G. and Scribner, B.H. (1971). The genesis of the square meter-hour hypothesis. Trans. Am. Soc. Artif. Internal Organs, 17:81.
  - Babb, A.L., Farrell, P.C., Uvelli, D.A. and Scribner, B.H. (1972 a). Hemodialyzer evaluation by examination of solute molecular spectra. Trans. Am. Soc. Artif. Internal Organs, 18:98.
  - Babb, A.L., Farrell, P.C., Strand, M.J., Uvelli, D.A., Milutinovic, J. and Scribner, B.H. (1972 b). Residual renal function and chronic hemodialysis therapy. Proc. Clin. Dial. Traspl. Forum, 2:142.
  - Babb, A.L., Johansen, P.J., Strand, M.J., Tenckhoff, H. and Scribner, B.H. (1973). Bi-directional permeability of the human peritoneum to middle molecules. Proc. Eur. Dial. Traspl.

- Assoc., 10:247.
- Bagdade, J.D., Shafir, E. and Wilson, D.E. (1976). Mechanism (s) of hyperlipidemia in chronic uremia. Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs, 22:42.
  - Balestri, P., Biagini, M., Rindi, P. and Giovannetti, S. (1970) Uremic toxins. Arch. Intern. Med., 126:843.
  - Balestri, P., Rindi, P., Biagini, M. and Giovannetti, S. (1972) Effects of uraemic serum, urea, creatinine and methyl guanidine on glucose metabolism. Clin. Sci. (London), 42:395.
  - Barbour, B.H., Bernstein, M., Cantor, P.A., Fisher, B.S. and Stone, W.Jr. (1975). Clinical use of NISR 440 polycarbonate membrane for hemodialysis. Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs, 21:144.
  - Bennett, N.B. and Ogston, D. (1970). Inhibitors of the fibrinolytic enzyme system in renal disease. Clin. Sci. (London), 39:549.
  - Bergström, J. and Bittar, E. (1969). The basis of uremic toxicity. En The Biological Basis of Medicina, ed. Bittar, E.E., Bittar, N., New York, Academic Press, vol. 6, p. 495.
  - Bergström, J. and Fürst, P. (1976). Uremic Middle Molecules. Clin. Nephrol., 5:143.
  - Bergström, J. and Fürst, P. (1978 a). Uremic toxins. Kidney Int., 13 (Suppl.8):S9.



- Bergström, J. and Fürst, P. (1978 b). Uremic Toxins. En Replacement of renal function by dialysis. Ed. Drukker, W., Parsons, F., Maher, J., Londres, Martinus Nijhoff Med. Div., p.334.
- Bergström, J., Fürst, P. and Zimmerman, L. (1981). Separation and identification of uremic middle molecules. Proc. 8<sup>th</sup> Int. Congr. Nephrol. (Atenas, Grecia). Ed. Zurukzoglu, W. et al. , Salónica, S. Karger/Basel, p. 595.
- Bertello, L. (1980). Sistema Internacional de Unidades. Su aplicación en el área de salud. Buenos Aires, EUDEBA.
- Block, R., Durrum, E. and Zweig, G. (1958). A Manual of Paper Electrophoresis. Nueva York, Academic Press.
- Böen, S.T. (1980). Comunicación Personal. International Symposium on Peritoneal Dialysis. Buenos Aires, junio.
- Boulton-Jones, J., Vick, R., Cameron, J.S. and Black, J.P. (1973). Immune responses in uremia. Clin. Nephrol., 1:351.
- Bourgoignie, J.J., Klahr, H. and Bricker, N.S. (1971). Inhibition of transepithelial sodium transport in the frog skin by a low molecular weight fraction of uremic serum. J. Clin. Invest., 50:303.
- Bourgoignie, J.J., Hwang, K.H., Espinel, C., Klahr, H. and Bricker, N.S. (1972). A natriuretic factor in the serum of patients with chronic uremia. J. Clin. Invest., 51:1514 .
- Bourgoignie, J.J., Hwang, K.H., Ipakchi, E. and Bricker, N.S.

- (1974). The presence of a natriuretic factor in urine of patients with chronic uremia. *J. Clin. Invest.*, 53:1559.
- Bourke, E., Frindt, G., Preuss, H., Rose, E., Weksler, M. and Schreiner, G.E. (1970). Studies with uremic serum on the renal transport of hippurates and tetraethylammonium in the rabbit and rat: effects of oral neomycin. *Clin. Sci. (London)*, 38:41.
  - Boyer, J.L. and Scheig, R.L. (1970). Inhibition of postheparin lipolytic activity in uremia and its relationship to hypertriglyceridemia. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 134:603.
  - Boyum, A. (1966). Ficoll Hypaque method for separating mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, suppl., p.77.
  - Bricker, N., Klahr, S., Purkerson, M., Schultze, R., Avioli, L. and Birge, S. (1968). In vitro assay for a humoral substance present during volume expansion and uremia. *Nature*, 219:1058..
  - Bricker, N.S. (1972). On the pathogenesis of the uremic state An exposition of the "Trade off" Hypothesis. *New Engl. J. Med.*, 286:1093.
  - Bricker, N. and Fine, L. (1978). The trade-off hypothesis: current status. *Kidney Int.*, 13 (suppl. 8): S-5.
  - Brod, J. and Sirota, S. (1948). The renal clearance of endogenous creatinine in man. *J. Clin. Invest.*, 27:645.
  - Buckalew, V.M. Jr. (1972). Variable factors affecting ultra -

- filtration of a humoral sodium transport inhibitor. *Nephron* , 9:66.
- Buckalew, V.M. Jr. and Nelson, D.B. (1974). Natriuretic and sodium transport inhibitory activity in plasma of volume-expanded dogs. *Kidney Int.*, 5:12.
  - Bultitude, F.W. and Newham, S.J. (1975). Identification of some abnormal metabolites in plasma from uremic subjects. *Clin. Chem.*, 21:1329.
  - Cambi, V., Dall'Aglio, P., Savazzi, G., Arisi, L and Migone, L. (1972). Clinical assessment of haemodialysis patients with reduced small molecules removal. *Proc. Eur. Dial. Transpl. Assoc.* 9:67.
  - Castagnino, J.M. (1968). *Electroforesis. Aplicaciones Biológicas y Clínicas.* Buenos Aires, EUDEBA, p.228.
  - Černáček, P., Spustová, V. and Dzúrik, R. (1976). Cellular aspects of amino acid metabolism in uraemia. *Nephrol. Symp.* with Int. participation on metabolism of nitrogen substances in renal failure. Bratislava, p.4.
  - Ciccione, J.R., Keller, A.I., Braun, S.R., Murdaugh, H.V. and Preuss, H.G. (1968). Azotemic inhibition of organic acid transport in the liver. *Biochem. Biophys. Acta*, 163:108.
  - Cichocki, T., Hanicki, Z., Klein, A., Komorowska, Z., Sarnecka-Keller, M. and Sułowicz, W. (1980). Influence of middle -

molecular -weight solutes from dialysate on the migration rate of leukocytes. *Kidney Int.*, 17:231.

- Cole, C.H., Balfe, J.W. and Welt, L.G. (1968). Induction of ouabain-sensitive ATPase defect by uremic plasma. *Trans.Assoc. Am. Physicians*, 81:213.
- Condon, J.R. and Asatoor, A.M. (1971). Amino acid metabolism in uraemic patients. *Clin. Chim. Acta*, 32:333.
- Cross, R.A., Tyson, W.H. and Cleveland, D.S. (1971). Asymmetric hollow fiber membranes for dialysis. *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, 17:279.
- Cueille, G. (1978). Mise en évidence et évaluation des "Moyennes Molécules" de la taille de la vitamine B<sub>12</sub> présentes dans les liquides biologiques de sujets normaux et de patients urémiques. *J. Chromatog.*, 146:55.
- Cueille, G., Man, N.K., Sausse, A., Farges, A.P. and Funck-Brentano, J.L. (1981). Further characterization of a neurotoxic uremic middle molecule. *Proc. 8<sup>th</sup> Int. Congr. Nephrol.* (Atenas, Grecia). Ed. Zurukzoglu, W. et al., Salónica, S. Karger/Basel., p. 606.
- Chang, T.M. and Migchelsen, M. (1973). Characterization of possible "toxic" metabolites in uremia and hepatic coma based on the clearance spectrum for larger molecules by the ACAC microcapsule artificial kidney. *Trans. Am. Soc. Artif. Intern.*

Organs, 19:314.

- Chang, T.M., Migchelsen, M., Coffey, F. and Stark, A. (1974). Serum middle molecule levels in uremia during long term in -  
termittent hemoperfusions with the ACAC (coated charcoal) mi-  
crocapsule artificial kidney. Trans. Am. Soc. Artif. Intern.  
Organs, 20:364.
- Chapman, G.V., Ward, R.A. and Farrell, P.C. (1980). Separa -  
tion and quantification of the "middle molecules" in uremia .  
Kidney Int., 17:82.
- Chapman, G.V. and Farrell, P.C. (1981). Uremic middle molecu -  
les. Int. J. Artif. Organs, 4:52.
- Dall'Aglio, P., Buzio, C., Cambi, V., Arisi, L. et Migone, L.  
(1972). La rétention de moyennes molecules dans le sérum uré-  
mique. Proc. Eur. Dial. Transpl. Ass., 9:408.
- Dammin, G.J., Couch, N.P. and Murray, J.E. (1957). Prolonged  
survival of skin homografts in uremic patients. Ann. N.Y. Acad  
Sci., 64:967.
- Davies, J.W., Nininger, R.J. and Phillips, P.E. (1975). Failu-  
re of methylhistidines to inhibit platelet aggregation at con-  
centrations found in uremic plasma. Am. J. Clin. Nutr., 28:930.
- Delaporte, C. and Gros, F. (1981). In vitro inhibition of pro-  
tein synthesis by dialysates of plasma from uraemic patients.  
Eur. J. Clin. Invest., 11:139.

- Delbono, O., Losavio, A., Kotsias, B.A., Obejero Paz, C.A. y Muchnik, S. (1982). Trastornos neuromusculares en la Insuficiencia Renal Crónica. Medicina (Buenos Aires). En impresión.
- Depner, T.A. and Gulyassy, P.F. (1979). Chronic Renal Failure. En Strauss and Welt's Diseases of the Kidney, ed. Earley, L.E., Gottschalk, C.W., Boston, Little Brown and Co., v.1, cap.6.
- Dési, I., Fehér, I., Weisz, P. und Szold, E. (1957). Untersuchung der Toxizität des mit Ionenaustauschharzen behandelten uramischen Blutes. Z. ges. inn. Med., 12:1127.
- Dyck, P.J., Johnson, W.J., Lamber, E.H. and O'Brien, R.C. (1971) Segmental demyelination secondary to axonal degeneration in uremic neuropathy. Proc. Mayo Clin., 46:400.
- Dzúrik, R. and Krajčí-Lazáry, B. (1967). The effect of uremic serum on carbohydrate metabolism in rat diaphragm. Experientia, 23:798.
- Dzúrik, R., Niederland, T.R. and Čerňáček, P. (1969). Abnormal carbohydrate metabolism in liver slices incubated in uremic serum. Clin. Sci. (London), 37:409.
- Dzúrik, R., Adam, J., Valovičová, E., Rezníček, J. and Zvara, V. (1971). The effect of haemodialysis on blood peptide levels. Proc. Eur. Dial. Transpl. Ass. 8:167.
- Dzúrik, R., Božek, P., Rezníček, J. and Oborníková, A. (1973a). Blood level of Middle Molecular Substances during Uraemia and

- Haemodialysis. Proc. Eur. Dial. Transpl. Ass., 10:263.
- Dzúrik, R., Hupková, V., Černáček, P. and Valovičová, E. (1973 b). The isolation of an inhibitor of glucose utilization from the serum of uraemic subjects. Clin. Chim. Acta, 46:77.
  - Dzúrik, R., Černaček, P., Spustová, V. and Válek, A. (1978). The synthesis of MM substances in rat tissues: in vitro study. Proc. 15<sup>th</sup> Congr. Eur. Dial. Transpl. Ass., Estambul, Turquía.
  - Dzúrik, R., Spustová, V. and Gajdős, M. (1981). In vitro synthesis of Middle Molecular Substances. Proc. 8<sup>th</sup> Int. Congr. Nephrol. (Atenas, Grecia). Ed. Zurukzoglu, W. et al., Salónica, S. Karger/Basel, p. 600.
  - Emerson, P.M., Withycombe, W.A. and Wilkinson, J.H. (1965). Inhibition of lactate dehydrogenase by sera of uraemic patients. Lancet, 2:571.
  - Fehér, I., Dési, I. and Szold, E. (1958). Isolation of a toxic fraction from uraemic blood. Experientia (Basel), 14:292.
  - Fehrman, I., Ringden, O. and Bergström, J. (1980). MLC-blocking factors in uremic sera. Clin. Nephrol., 14:183.
  - Feldman, H.A. and Singer, I. (1975). Endocrinology and metabolism un uremia and dialysis: a clinical review. Medicine , 54: :345.
  - Fisher, B.S., Higley, W.S., Cantor, P.A. and Stone, W. Jr. (1973). Modified polycarbonate membranes for hemodialysis.

- Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs, 19:429.
- Fisher, J.W., Hatch, F.E., Roh, B.L., Allen, R.C. and Kelley, B.J. (1968). Erythropoietin inhibitor in kidney and plasma from anemic uremic human subjects. Blood, 31:440.
  - Fiske, C.H. and Subbarow, Y. (1925). The colorimetric determination of phosphorous. J. Biol. Chem., 66:375.
  - Folin, O., Berglund, H. and Derick, C. (1924). The uric acid problem. An experimental study of animals and man including gouty subjects. J. Biol. Chem., 60:361.
  - Formo, L. and Alston, W. (1967). Uremic polyneuropathy. Acta Neurol. Scand., 43:640.
  - Funck-Brentano, J.L. et Ventelon, J. (1963). Les polyneuritis des urémies chroniques traitée pour hemodialyses répétées. Proc. Int. Congr. Nephrol., Amsterdam.
  - Funck-Brentano, J.L., Sausse, A., Man, N.K., Granger, A., Rondon-Nucete, M. Zingraff, J. et Jungers, P. (1972). Une nouvelle méthode d'hémodialyse associant une membrane á haute perméabilité pour les moyennes molécules et un bain de dialyse en circuit fermé. Proc. Eur. Dial. Transpl. Ass., 9:55.
  - Funck-Brentano, J.L., Man, N.K., Sausse, A., Cueille, G., Zingraff, J., Druke, T., Jungers, P. and Billo, J.P. (1975). Neuropathy and "Middle" Molecule Toxins. Kidney Int., 7: S 352.
  - Funck-Brentano, J.L., Cueille, G.F. and Man, N.K. (1978 a). A



defense of the Middle Molecule Hypothesis. *Kidney Int.*, 13 (suppl. 8): S 31.

- Funck-Brentano, J.L., Boudet, J., Sausse, A., Cueille, G. and Man, N.K. (1978 b). In vitro sural nerve test for the evaluation of middle molecule neurotoxicity in uraemia. In *Technical Aspects of Renal Dialysis*, ed. Frost, T.H., Londres, Pitman Medical Publishing Co., v.1, p. 256.
- Fürst, P. (1972). <sup>15</sup>N- studies in severe renal failure. II Evidence for the essentiality of histidine. *Scand. J. Clin. Labor. Invest.*, 30:307.
- Fürst, P., Asaba, M., Gordon, A., Zimmerman, L. and Bergström, J. (1974). Middle Molecules in Uraemia. *Proc. Eur. Dial. Transpl. Ass.*, 11:417.
- Fürst, P., Bergström, J., Gordon, A., Johnsson, E. and Zimmerman, L. (1975). Separation of peptides of "middle" molecular weight from biological fluids of patients with uremia. *Kidney Int.*, 7 (suppl. 2):S 272.
- Fürst, P., Zimmerman, L. and Bergström, J. (1976). Determination of endogenous middle molecules in normal and uremic body fluids. *Clin Nephrol.*, 5:178.
- Gilboe, D.D. and Javid, M.J. (1964). Breakdown products of urea in uremic syndrome. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 115:633.
- Giordano, C., De Pascale, C., De Cristofaro, D., Capodicasa, G.,

- Balestrieri, C. and Baczyk, K. (1968). Protein malnutrition in the treatment of chronic uremia. En Nutrition in Renal Disease, ed. Berlyne, G., Baltimore, Williams and Wilkins, p.23.
- Giovanetti, S., Balestri, L.P. and Cioni, L. (1966). Spontaneous in vitro autohemolysis of blood from chronic uremic patients. Clin. Sci., 29:407.
  - Giovanetti, S. and Berlyne, G.M. (1975). An outline of the uremic syndrome. Nephron, 14:119.
  - Glaze, R.P., Morgan, J.M. and Morgan, R.E. ( 1967). Uncoupling of oxidative phosphorylation by ultrafiltrates of uremic serum. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 125:172.
  - Gordon, A., Bergström, J., Fürst, P. and Zimmerman, L. (1975). Separation and characterization of uremic metabolites in biological fluids: A screening approach to the definition of uremic toxins. Kidney Int., 7 (suppl. 2):S 46.
  - Goubeaud, G., Leber, H., Schott, H. and Schutterle, G. (1976). Middle molecules and haemoglobin synthesis. En Dialysis Transplantation Nephrology, ed. Robinson, Vereerstraeten & Hawkins, v.13, p.371.
  - Grollman, E.F. and Grollman, A. (1959). Toxicity of urea and its role in the pathogenesis of uremia. J. Clin. Invest., 38: 749.
  - Gulyassy, P.F., Aviram, A. and Peters, J.H. (1970). Evaluation

of aminoacid and protein requirements in chronic uraemia. Arch Intern. Med., 126:855.

- Hamilton, R., Ford, C., Colton, C., Cross, R., Steinmuller, S. and Henderson, L. (1971). Blood cleansing by diafiltration in uremic dog and man. Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs, 17:259.
- Hanicki, Z., Sarnecka-Keller, M., Klein, A. and Slizowska, K. (1974). Middle-sized ninhydrin-positive molecules in uraemic patients treated by repeated haemodialysis. I. Preliminary characteristics. Clin. Chim. Acta, 54:47.
- Hanicki, Z., Cichocki, T., Sarnecka-Keller, M., Klein, A. and Komorowska, Z. (1976). Influence of middle-sized molecule aggregates from dialysate of uremic patients on lymphocytes transformation in vitro. Nephron, 17:73.
- Hegstrom, R., Murray, J., Pendras, J., Burnell, J. and Scribner, B. (1961). Hemodialysis in the treatment of chronic uraemia. Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs, 7:136.
- Henderson, L.W., Besarab, A., Michaels, A. and Bluemle, L.Jr. (1967). Blood purification by ultrafiltration and fluid replacement (diafiltration). Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs, 13:216.
- Henderson, L.W. (1979). Hemodialysis. En Strauss and Welt' Diseases of the Kidney, ed. Earley, L.E., Gottschalk, C.W.,

Boston, Little, Brown and Co., v.1, cap. 12.

- Hicks, J.M., Young, D.S. and Wootton, I.D.P. (1964). The effect of uraemic blood constituents on certain cerebral enzymes. Clin. Chim. Acta, 9:228.
- Horowitz, H.I., Cohen, B.D., Marinez, P. and Papayoanou, M.F. (1967). Defective ADP-induced platelet factor 3 activation in uremia. Blood, 30:331.
- Hubbard, R.S. and Loomis, T.A. (1942). The determination of inulin. J. Biol. Chem., 145:641.
- Hume, D.M., Merrill, J.P., Miller, B.F. and Thorn, G.W. (1955) Experiences with renal homotransplantation in the human: report of nine cases. J. Clin. Invest., 34:327.
- Jebsen, R.H., Tenckhoff, H. and Hoult, J.C. (1967). Natural history of uremic polyneuropathy and the effects of dialysis. New Engl. J. Med., 277:327.
- Jones, M.R., Swendseid, M.E. and Kopple, J.D. (1975). Phenyl - alanine and tyrosine metabolism in uremia. Kidney Int., 8:459.
- Kachadurian, A., Knox, W.E. and Cullen, A.M. (1960). Colorimetric ninhydrin method for total alpha amino acids of urine. J. Lab. Clin. Med., 56:321.
- Kageyama, N. (1971). A direct colorimetric determination of uric acid in serum and urine with uricase-catalase system. Clin. Chim. Acta, 31:421.

- Kaplan, M.A., Bourgoignie, J.J., Rosecan, J. and Bricker, N. (1974) The effects of the natriuretic factor from uremic urine on sodium transport, water and electrolyte content and pyruvate oxidation by the isolated toad bladder. J. Clin. Invest., 53:1568.
- Kasakura, S. and Lowenstein, L. (1967). The effect of uremic blood on mixed leukocyte reactions and on cultures of leukocytes with PHA. Transplantation, 5:283.
- Kersting, F. and Brass, H. (1977). The effects of uraemic compounds on oxygen consumption and mechanical activity of isolated guinea pig hearts. Proc. Eur. Dial. Transpl. Ass., 13:472.
- Kjellstrand, C.M., Evans, R.L., Petersen, R.J., Rust, L.W., Shideman, J., Buselmeier, T.J. and Rozelle, L.T. (1972 a). Considerations of the middle molecule hypothesis. Proc. Dialysis Transpl. Forum, 2:127.
- Kjellstrand, C.M., Petersen, R.J., Evans, R.L., Shideman, J.R., Santiago, E.A., Buselmeier, T.J. and Rozelle, J.T. (1972 b). In vivo studies of a new ultrathin membrane for hemodialysis. Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs, 18:106.
- Kjellstrand, C.M., Petersen, R.J., Evans, R.L., Shideman, J.R., von Hatitzsch, B. and Buselmeier, T.J. (1973). Considerations of the middle molecule hypothesis. II. Neuropathy in nephrectomized patients. Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs, 19:325.
- Klein, A., Sarnecka-Keller, M. and Hanicki, Z. (1978). Middle-sized ninhydrin-positive molecules in uraemic patients treated

by repeated haemodialysis. II. Chief peptide constituents of the fraction. Clin. Chim. Acta, 90:7.

- Klein, E., Holland, F. and Ehrich, K. (1981). Membranes for isolating middle molecules in vitro e in vivo. Proc. 8<sup>th</sup> Int. Congr. Nephrol. (Atenas, Grecia). Ed. Zurukzoglu, W. et al., Salónica, S. Karger/Basel, p.618.
- Konotey-Ahuler, F.I.D., Baillod, R., Comty, C.M., Heron, J.R., Shaldon, S. and Thomas, P.K. (1965). Effect of periodic dialysis on peripheral neuropathy of end stage renal failure. Brit. Med. J., 2:1 212 .
- Kopple, J.D., Wang, M., Vyhmeister, I., Baker, N, and Swendseid, M. (1972). Tyrosine metabolism in uremia. En Uremia, ed. Kluthe, R., Berlyne, G., Burton, B., Stuttgart, Georg Thieme Verlag, p.150.
- Kopple, J.D., Gordon, S. and Wang, M. (1978). Effect of chronic uremia, protein intake and hemodialysis on guanidinosuccinic acid levels. Am. Soc. Nephrol., Abstracts, p. 87.
- Korz, R., Loebnitz, U., Brunner, H. and Heintz, R. (1977). Lymphocyte enzymes of DNA-synthesis in chronic renal failure. Proc. Eur. Dial. Transpl. Ass., 13:528.
- Kramer, H.J., Backer, A. and Kruck, F. (1974). Inhibition of intestinal (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>)-ATPase in experimental uremia. Clin. Chim. Acta, 50:13.
- Kramer, H.J., Gospodinov, D. and Kruck, F. (1976). Functional

and metabolic studies on red blood cell sodium transport in chronic uremia. *Nephron*, 16:344.

- Ku, G., Hird, V.M., Varghese, Z., Ahmed, K.Y., Fiter, M., Ng, C.M. and Moorhead, J.F. (1974). Inhibition of DNA synthesis by guanidine compounds in uraemia. *Proc. Eur. Dial. Transpl. Ass.*, 11:427.
- Kuroyanagi, T., Kurisu, A., Sugiyama, H. and Saito, M. (1964). The ADP and ATP levels and the phosphorylating activity of erythrocytes in patients with uremia associated with chronic renal disease. *Tohoku J. Exp. Med.*, 84:105.
- Lai, C.Y. (1977). Detection of peptides by fluorescence methods. In *Methods in Enzymology*, ed. Colowick, Kaplan, Nueva York, Academic Press, v.47, p. 236.
- Lamperi, S., Bandiani, G., Fiorio, P., Muttini, P. and Scarinigi, G. (1974). Effects of some substances retained in uremia on erythropoiesis: the effect on bone marrow cell cultures. *Nephron*, 13:278.
- Lang, P.A., Ritzmann, S.E., Merian, F.L., Lawrence, M.C., Levin, W.C. and Gregory, R. (1966). Cellular evolution in induced inflammation in uremic patients. *Texas Rep. Biol. Med.*, 24:107.
- Lebart, L., Morineau, A. et Tabard, N. (1977). *Techniques de la description statistique*. Paris, Dunod.
- Leber, H.W., Goubeaud, G. and Spiegelhalter, R. (1979). Middle

- molecules in renal failure. *Ann. Clin. Biochem.*, 16:389.
- Lowry, O.H., Roseborough, N.J., Farr, L. and Randall, R. (1961). Protein measurements with Folin reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265.
  - Lutz, W. (1976). Chemical composition and rate of passage across semipermeable membranes of basic peptides isolated from peritoneal dialysis fluids of patients with chronic renal failure. *Acta Med. Pol.*, 17:137.
  - Maiorca, R., Castellani, A., Migozzi, G., Panzetta, G.O. and Usberti, M. (1974). Short time personalized dialysis: Good results in spite of high levels of small and middle molecules. *Proc. Eur. Dial. Transpl. Ass.*, 2:146.
  - Mamdani, B.H., Mashouf Shaykh, M., Evenson, M.A. and Dunea, G. (1979). Chromatographic studies of uremic plasma. *Int. J. Artif. Intern. Organs*, 2:187.
  - Man, N.K., Granger, A., Rondon-Nucete, M., Zingraff, J., Jun - gers, P., Sausse, A. and Funck-Brentano, J.L. (1973 a). One year follow-up of short dialysis with membranes highly permeable to middle molecules. *Proc. Eur. Dial. Transpl. Ass.*, 10:236.
  - Man, N.K., Terlain, B., Paris, J., Werner, G., Sausse, A.L. and Funck-Brentano, J.L. (1973 b). An approach to "Middle Mo - lecules" identification in artificial kidney dialysate with reference to neuropathy prevention. *Trans. Am. Soc. Artif. In - tern. Organs*, 19:320.



- Man, N.K., Cueille, G., Zingraff, J., Drueke, T., Jungers, P., Sausse, A., Billon, J. P. and Funck-Brentano, J.L. ( 1974 ). Investigations on clinico-chemical correlations in uraemic polyneuritis. Proc. Eur. Dial. Transpl. Ass., 11:214.
- Man, N.K., Cueille, G., Boudet, J., Zingraff, J., Becker, A., Drueke, T., Jungers, P., Sausse, A. and Funck-Brentano, J.L. ( 1976 ). Uremic Neurotoxins. Societé de Néphrologie. Abstracts. (Paris, 1976). Kidney Int., 10:338.
- Manji, T., Maeda, K., Kawaguchi, S., Kobayashi, K., Ohta, K., Saito, A., Amano, I., Shimoji, T. and Fujisaki, Y. ( 1974 ). Short time dialysis with 2 m<sup>2</sup> hollow fiber kidney. Proc. Eur. Dial. Transpl. Ass., 11:153.
- Mc Gale, E.H.F., Pickford, J.C. and Aber, G.M. ( 1972 ). Quantitative changes in plasma amino acids in patients with renal disease. Clin. Chim. Acta, 38:395.
- Menyhárt, J. and Gróf, J. ( 1977 ). Composition, toxicity and diffusibility of middle molecular weight substances (MMS) prepared from sera of healthy and uremic individuals. J.Mol.Med., 2:371.
- Menyhárt, J. and Gróf, J. ( 1981 ). Many hitherto unknown peptides are principal constituents of uremic "middle molecules" Clin. Chem., 27:1 712 .
- Merck , A.G.- Darmstadt. Chromatography. Colour reagents for

Paper Chromatography, 2<sup>a</sup> ed., Alemania, p. 132-165.

- Merrill, J.P., Legrain, M. and Hoigne, R. (1953). Observations on the role of urea in the uremia. Amer. J. Med., 14:519.
- Migone, L., Dall'Aglio, P. and Buzio, C. (1974). Uraemia and Middle Molecules. Rein et Foie, Maladies de la Nutrition, v. 16 B, p. 287.
- Millora, A.B., Woodruff, M.W. and Kiley, J.E. (1972). Comparison of higher blood flow hemodialysis with lower blood flow in light of the square meter-hour hypothesis. Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs, 18:85.
- Milutinovic, J., Strand, R., Casaretto, A., Follette, W., Babb, A.L. and Scribner, B.H. (1974). Clinical impact of residual glomerular filtration (CFR) on dialysis time. A preliminary report. Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs, 20:410.
- Minkoff, L., Gaertner, G., Darab, M., Mercier, C. and Levin, M. L. (1972). Inhibition of brain sodium-potassium ATPase in uremic rats. J. Lab. Clin. Med., 80:71.
- Mirahmadi, K.S., Kay, J.H., Miller, J.H., Gorman, J.T. and Rosens, M. (1974). Clinical evaluation of patients dialized with double Gambro 4 hours, three times per week. Proc. Eur. Dial. Transpl. Ass., 11:121.
- Miyakoshi, H., Aoki, T. and Hirasawa, Y. (1979). Effects of serum and plasma from hemodialysis patients on the lymphoprolif

- ferative response. Clin. Nephrol., 12:263.
- Morgan, J.M., Morgan, R.E. and Thomas, G.E. (1963). Inhibition of lactic dehydrogenase by ultrafiltrate of uremic blood. Metabolism, 12:1 051 .
  - Morgan, J.M. and Morgan, R.E. (1964). Study of the effect of uremic metabolites on erythrocyte glycolysis. Metabolism, 13 : : 629.
  - Moriyama, Y., Rege, A. and Fisher, J.W. (1975). Studies on an inhibitor of erythropoiesis. II. Inhibitory effects of serum from uremic rabbits on heme synthesis in rabbit bone marrow cultures. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 148:94.
  - Murase, T., Cattran, D.C., Ubenstein, B. and Steiner, G. (1975). Inhibition of lipoprotein lipase by uremic plasma, a possible cause of hypertriglyceridemia. Metabolism, 24:1 279 .
  - Musatti, C., Soares, V.A., Santos, L.M., De Lima, J.J. and Mendes, N.F. (1979). Immunosuppressive effect of soluble E receptors in uremic serum. Clin. Immun. Immunopath., 14:403.
  - Nakamura, H. and Pisano, J.J. (1976). Sensitive fluorometric assay for proteins: use of fluorescamine and membrane filters. Arch. Biochem. Biophys., 172:102.
  - Navarro, J., Touraine, J.L., Corre, C. and Traeger, J. (1977). Prolongation of skin allograft survival and inhibition of graft versus host reaction in rodents treated with "middle molecules"

Cell. Immunol., 31:349.

- Navarro, J., Gerlier, D., Touraine, J.L., Later, R., Contreras, P, Dore, J.F. and Traeger, J. (1979). A potent inhibitor of cell proliferation in "middle molecules" isolated from the urine of uremic patients. Biomedicine, 31:261.
- Nesse, A.B. y Castagnino, J.M. (1971). Fraccionamiento de aminoácidos empleando electroforesis por alto voltaje (E.A.V.) . Bioquímica Clínica, 5:112.
- Newberry, W.M. and Sanford, J.P. (1971). Defective cellular immunity in renal failure: depression of reactivity of lymphocytes to phytohemagglutinin by renal failure serum. J. Clin. Invest., 50:1262 .
- O'Leary, J., Reinsmaen, N. and Yunis, E.J. (1977). Mixed lymphocyte reaction. En Manual of Clinical Immunology, ed. Rose, N., Friedman, H, Am. Soc. Microbiol., p.820.
- Orringer, E.P., Weiss, F.R. and Preuss, E.G. (1971). Azotaemic inhibition of organic anion transport in the kidney of the rat mechanisms and characteristics. Clin. Sci. (London), 40:159.
- Peters, J.H., Gotch, F.A., Keen, M., Berridge, B.J.Jr. and Chao, W.R. (1974). Investigation of the clearance and generation rate of endogenous peptides in normal subjects and uremic patients. Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs, 20:417.
- Peters, J.H. and Gotch, F.A. (1975). Artificial kidneys: bio-

chemical evaluation. Proc. 8<sup>th</sup> Annual Contractors Conference ,  
DHEW Publication (NIH), p.46.

- Pickford, J.C., Mc Gale, E.H.F. and Aber, G.M. (1973). Studies on the metabolism of phenylalanine and tyrosine in patients with renal disease. Clin. Chim. Acta, 48:77.
- Popovich, R.P. and Moncrief, J.W. (1974). The prediction of metabolite accumulation concomitant with renal insufficiency: the middle molecule anomaly. Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs, 20:377.
- Popovich, R.P., Hlavinka, D.J., Bomar, J.B., Moncrief, J.W. and Decherd, J.F. (1975). The consequences of physiological resistances on metabolite removal from the patient-artificial kidney system. Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs, 21:108.
- Popovich, R.P., Moncrief, J.W., Nolph, K.D., Chods, A.J., Twardowski, Z.J. and Pyle, W.K. (1978). Continuous ambulatory peritoneal dialysis. Ann. Intern. Med., 88:449.
- Preswick, G. and Jeremy, D. (1964). Subclinical polyneuropathy in renal insufficiency. Lancet, 2:731.
- Prévost, J.L. et Dumas, J.A. (1821). Examen du sang et de son action dans les divers phénomènes de la vie. Ann. Chim. Phys., 23:90.
- Quastel, J.H. and Wheatley, A.H.M. (1933). The effects of amines on oxidations of the brain. Biochem. J., 27:1609.

- Quinton, W., Dillard, D. and Scribner, B.H. (1960). Cannula -  
tion of blood vessels for prolonged hemodialysis. Trans. Am.  
Soc. Artif. Intern. Organs, 6:104.
- Rachmilewitz, M. (1941). Effect of uremic serum and urine on  
growth of fibroblasts in vitro. Arch. Intern. Med., 67:1132.
- Radtke, H.W., Rege, A.B., La Marche, M.B., Bartos, D., Bartos,  
F., Campbell, R.A. and Fisher, J.W. (1981). Identification of  
spermine as an inhibitor of erythropoiesis in patients with  
chronic renal failure. J. Clin. Invest., 67:1623.
- Randall, R.E. Jr., Cohen, M.D., Spray, C.C. Jr. and Rossmeisl,  
E.C. (1964). Hypermagnesemia in renal failure. Etiology and  
toxic manifestations. Ann. Intern. Med., 61:73.
- Raskova, J. and Morrison, A.B. (1978). Humoral inhibitors of  
the immune response in uremia. I. Effect of serum and of the  
supernatant of spleen cultures from uremic rats on the mixed  
lymphocyte reaction. Labor. Invest., 38:103.
- Raskova, J. and Raska, K. (1981). Humoral inhibitors of the  
immune response in uremia. IV. Effects of serum and of isola -  
ted serum very low density lipoprotein from uremic rats on  
cellular immune reactions in vitro. Labor. Invest., 45:410.
- Rattazzi, T., Wathen, R., Comty, C., Raij, L., Leonard, A. and  
Shapiro, F. (1974). The comparison of low flow ( $Q_D$  200) to  
regular flow ( $Q_D$  500) dialysis. Trans. Am. Soc. Artif. Intern.

Organs, 20:402.

- Reiger, J., Quellhorst, E., Lowitz, H.D., Kong, R.G. and Scheller, F. (1974). Ultrafiltration for middle molecules in uremia. Proc. Eur. Dial. Transpl. Ass., 11:158.
- Renner, D. and Heintz, R. (1965). Oxygen consumption and utilization of carbohydrate and fat metabolites in kidney cortex slices and in brain homogenate using sera of chronic uraemic patients. Proc. Eur. Dial. Transpl. Ass., 2:128.
- Rinaudo, J.B., Gallice, P., Crevat, A., Saingra, S. and Murisasco, A. (1979). Action of middle molecules from chronic renal insufficiency treated by hemodialysis on mitochondrial respiration. Biomedicine, 30:215.
- Ringoir, S.M.G., van Landschoot, N. and De Smet, R. (1980). Inhibition of phagocytosis by middle molecular fraction from ultrafiltrate. Clin. Nephrol., 13:109.
- Russell, J.E. and Avioli, L.V. (1974). The effect of chronic uremia on intestinal mitochondrial activity. J.Lab.Clin.Med., 84:317.
- Sargent, J.A. and Gotch, F.A. (1974). The study of uremia by manipulation of blood concentrations using combination of hollow fiber devices. Trans, Am. Soc. Artif. Intern. Organs , 20:395.
- Scribner, B.H. (1965). Discussion. Trans. Am. Soc. Artif. In -

tern. Organs, 11:29.

- Schoots, A.C., Mikkers, F.E.P., Cramers, C.A.M. and Ringoir, R.S. (1979). Profiling of Uremic Serum by High-Resolution Gas Chromatography-Electron Impact, Chemical Ionization Mass Spectrometry. J. Chromatog., 164:1.
- Schoots, A.C., Mikkers, F.E.P., Claessens, H.A., De Smet, R., van Lanschoot, N. and Ringoir, S.M. (1982). Characterization of Uremic "Middle Molecular" Fractions by Gas Chromatography, Mass Spectrometry, Isotachophoresis and Liquid Chromatography. Clin. Chem., 28:45.
- Schreiner, G.E. and Maher, J. (1961). Uremia. Biochemistry , Pathogenesis and Treatment. Ed. Thomas, C.C., Illinois, I.L. Springfield.
- Schreiner, G.E. and Winchester, J.F. (1979). Uremia - 1978 perspective. Clin. Nephrol., 11:52.
- Schwertner, H.A., Weintraub, S.T. and Hawthorne, S.B. (1980). The unidentified fluorescent substance in serum of patients with chronic renal disease is also found in hemofiltrates , dialysis fluids and urine. Clin. Chem., 26:1927 .
- Senftleber, F.C., Halline, A.G., Veening, H. and Dayton, D.A. (1976). Reversed-Phase Liquid-Chromatographic Analysis of Hemodialyzate from Uremic Patients. Clin. Chem., 22:1522 .
- Shaldon, S. (1966). Hemodialysis in chronic renal failure .



Post. Grad. Med. J., 42, suppl. 9.

- Shannon, J.A. (1935). The renal excretion of creatinine in man. J. Clin. Invest., 14:403.
- Shea, P.H., Maher, J.F. and Horak, E. (1981). Prediction of Glomerular Filtration Rate by Serum Creatinine and  $\beta_2$ -Microglobulin. Nephron, 29:30.
- Shinaberger, J.H., Miller, J.H., Rosenblatt, M.G., Gardner, P. W., Carpenter, G.W. and Martin, F.E. (1972). Clinical studies of "low flow" dialysis with membranes highly permeable to middle weight molecules. Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs , 18:82.
- Siest, D., Siest, G. and Besson, S. (1961). Colorimetric ninhydrin method for total alpha aminoacids of urine. Soc. Pharm. (Nancy), 51:19.
- Silverstein, M.E., Ford, C.A., Lysaght, M.J. and Henderson, L. W. (1974). Response to rapid removal of intermediate molecular weight solutes in uremic man. Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs, 20:614.
- Smith, E.K.M. and Welt, L.G. (1970). The red blood cell as a model for the study of uremic toxins. Arch. Intern. Med., 126: :827.
- Smith, S.R., Pozefsky, T. and Chhetri, M.K. (1974). Nitrogen and amino acid metabolism in adults with protein-calorie mal-

nutrition. Metabolism, 23:603.

- Sokal, R.R. and Rohlf, F.J. (1969). Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. U.S.A., W.H. Freeman and Co.
- Somer, J.B., Stewart, J.H. and Castaldi, P.A. (1968). The effect of urea on the aggregation of normal human platelets. . Thromb. Diath. Haemorrh., 19:64.
- Stahl, E. (1969). Thin layer Chromatography. Nueva York, Springer-Verlag.
- Stenzel, K.H., Rubin, A.L., Yamayoshi, W., Miyata, T., Suzuki, T., Sohde, T. and Nishizawa, M. (1971). Optimization of collagen dialysis membranes. Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs, 17:293.
- Swendseid, M.E. and Kopple, J.D. (1973). Nitrogen balance, plasma amino acid levels, and amino requirements. Trans. N.Y. Acad. Sci., 35:471.
- Tenckhoff, H.A., Böen, S.T., Jepsen, R.H. and Spiegler, J.H. (1965a). Polyneuropathy in chronic renal insufficiency. J. Am. Med. Assoc., 192:1121.
- Tenckhoff, H.A., Shilipetar, G. and Böen, S.T. (1965 b). One year's experience with home peritoneal dialysis. Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs, 11:11.
- Tenckhoff, H.A. and Curtis, F.K. (1970). Experience with main -

tenance peritoneal dialysis in the home. Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs, 16:90.

- Teschan, P.E., Ginn, H.E., Bourne, J.R., Walker, P.J. and Ward, J.W. (1975). Quantitative neurobehavioral responses to renal failure and maintenance dialysis. Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs, 21:488.
- Touraine, J.L., Touraine, F., Revillard, J.P., Brocher, J. and Traeger, J. (1975 a). T-lymphocytes and serum inhibitors of cell-mediated immunity in renal insufficiency. Nephron, 14:195.
- Touraine, J.L., Navarro, J., Corre, C. and Traeger, J. (1975 b). Inhibitory effect of medium size molecules from patients with renal failure on lymphocyte stimulation by phytohemagglutinin. Biomedicine, 180:23.
- Traeger, J., Navarro, J., Contreras, P., Touraine, J.L., Later, R. and Fryria, A.M. (1981). Immunological activity of "middle molecules". Proc. 8<sup>th</sup> Int. Congr. Nephrol. (Atenas, Grecia). Ed. Zুরুzoglú , W. et al., Salónica, S. Karger/Basel, p.625.
- Udenfriend, S., Stein, S., Bohlen, P., Dairman, W., Leimgruber, W. and Weigle, M. (1972). Fluorescamine: a reagent for assay of amino acids, peptides, proteins and primary amines in the picomole range. Science, 178:871.
- Vladutiu, A.O., Cunningham, E.E. and Walshe, J. (1978). Attempts to characterize the fluorescent compound(s) in serum of pa -

- tients with chronic renal failure. Clin. Chem., 24:1 084 .
- Vladutiu, A.O. (1981). Fluorescent substance(s) in serum and urine of patients with chronic renal disease. Clin. Chem., 27: :1 139 .
  - Warnock, L.G., Cullum, U.X., Stouder, D.A. and Stone, W.J. (1974). Erythrocyte transketolase activity in dialysis patients with neuropathy. Biochem. Med., 10:351.
  - White, A.G. and Nachev, P. (1975). Uremic inhibition of purine uptake by rat hepatic slices. Am. J. Physiol., 228:436.
  - Wilson, W.E.C., Kirkpatrick, C.H. and Talmage, D.W. (1965). Suppression of immunologic responsiveness in uremia. Ann. Intern. Med., 62:1.
  - Yatzidis, H., Garidi, M., Vassilikos, C., Mayopoulou, D. and Akilas, A. (1964). An improved method for the simple and accurate colorimetric determination of urea with Ehrlich's reagent. J. Clin. Pathol., 17:163.
  - Young, D.S. and Wootton, I.D.P. (1964). The retention of amines as a factor in uraemic toxemia. Clin. Chim. Acta, 9:503.
  - Young, G.A. and Parsons, F.M. (1970). Plasma Amino Acid Imbalance in patients with chronic renal failure on intermittent dialysis. Clin. Chim. Acta, 27:491.
  - Young, G.A. and Parsons, F.M. (1973). Impairment of phenylalanine hydroxylation in chronic renal insufficiency. Clin. Sci.

Mol. Med., 45:89.

- Young, G.A., Keogh, J.B. and Parsons, F.M. (1975). Plasma Amino Acids and Protein levels in Chronic Renal Failure and changes caused by Oral Supplements of Essential Amino Acids. Clin. Chim. Acta, 61:205.
- Zimmerman, L., Jornvall, H., Bergstrom, J., Furst, P. and Sjovall, J. (1981). Characterization of a double conjugate in uremic body fluids. FEBS letters, 129:237.