

A N A L I S I S M E D I A N T E
E S P E C T R O S C O P I A P O R R E S O N A N C I A
M A G N E T I C A P R O T O N I C A D E L O S
F E N O M E N O S D E I S Q U E M I A E N E L
T E J I D O R E N A L . R E S U L T A D O S
E X P E R I M E N T A L E S Y P O S I B L E S
A P L I C A C I O N E S C L I N I C A S .

Memoria que presenta el licenciado en Medicina y Cirugía D.
FERNANDO RUIZ SANTIAGO para la obtención del grado de doctor.

Facultad de Medicina
Universidad de Granada
Septiembre, 1990.

UNIVERSIDAD DE GRANADA

ACTA DEL GRADO DE DOCTOR EN Medicina

Curso de 19 70 a 19 71

Folio 103

Número 206

Reunido en el día de la fecha el Tribunal nombrado para el Grado de Doctor de D. Fernando Ruiz Sautiayo, el aspirante leyó un discurso sobre el siguiente tema, que libremente había elegido: Análisis, mediante espectroscopia por Resonancia Magnética Nuclear Protónica de los núcleos de hidrogenio en el tejido renal. Resultados

Terminada la lectura y contestadas la objeciones formuladas por los Jueces del Tribunal, este calificó de Apto "cum laude"

Granada 27 de Octubre de 19 70

EL PRESIDENTE,

El Secretario del Tribunal,

[Handwritten signature of the President]

[Handwritten signature of the Secretary]

[Handwritten signature of the Dean]
Fdo.: [Signature]

Fdo.: J.M. Ruiz de Alencázar

EL VOCAL,

EL VOCAL,

EL VOCAL,

[Handwritten signature of the first vocal]

[Handwritten signature of the second vocal]

[Handwritten signature of the third vocal]

Fdo.: F. Rodríguez-Rubio

Fdo.:

Fdo.:

J.M. Cuenca

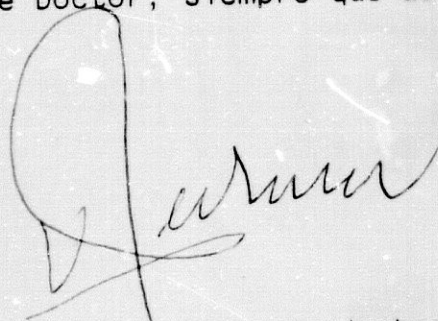
FIRMA DEL GRADUANDO,

[Handwritten signature of the graduate]



D. VICENTE PEDRAZA MURIEL, Catedrático de Radiología y Medicina Física de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada,

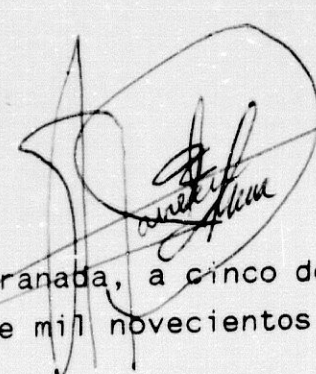
CERTIFICA: Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio del Tribunal que designe la Universidad de Granada sobre el tema "ANALISIS MEDIANTE ESPECTROSCOPIA POR RESONANCIA MAGNETICA PROTONICA DE LOS FENOMENOS DE ISQUEMIA EN EL TEJIDO RENAL. RESULTADOS EXPERIMENTALES Y POSIBLES APLICACIONES CLINICAS", ha sido realizada bajo mi dirección durante los cursos académicos 1986-1987, 1987-1988, 1988-1989 y 1989-1990, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa del autor, en condiciones tan aventajadas que le hacen acreedor del Título de Doctor, siempre que así lo considere el citado Tribunal.



Granada, a cinco de Septiembre
de mil novecientos noventa.

D. FRANCISCO JAVIER FERNANDEZ MENA, Doctor en Medicina por la Universidad de Granada y Profesor Asociado de Radiología de la Facultad de Medicina de Granada,

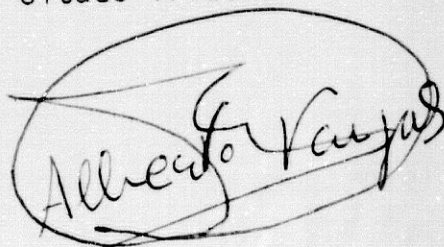
CERTIFICA: Que la tesis doctoral que presenta al superior juicio del Tribunal que designe la Universidad de Granada sobre el tema "ANALISIS MEDIANTE ESPECTROSCOPIA POR RESONANCIA MAGNETICA PROTONICA DE LOS FENOMENOS DE ISQUEMIA EN EL TEJIDO RENAL. RESULTADOS EXPERIMENTALES Y POSIBLES APLICACIONES CLINICAS", que ha sido realizada bajo mi dirección durante los cursos académicos 1986-1987, 1987-1988, 1988-1989, 1989-1990, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autor, en condiciones tan aventajadas que le hacen acreedor del Título de Doctor, siempre que así lo considere el citado Tribunal.



Granada, a cinco de Septiembre
de mil novecientos noventa.

D. ALBERTO M. VARGAS MORALES, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Granada,

INFORMA: Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio del Tribunal que designe la Universidad de Granada sobre el tema "ANALISIS MEDIANTE ESPECTROSCOPIA POR RESONANCIA MAGNETICA PROTONICA DE LOS FENOMENOS DE ISQUEMIA EN EL TEJIDO RENAL. RESULTADOS EXPERIMENTALES Y POSIBLES APLICACIONES CLINICAS", ha sido realizada parcialmente bajo mi dirección durante los cursos académicos 1986-1987, 1987-1988, 1988-1989, 1989-1990, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autor, en condiciones tan aventajadas que le hacen acreedor del Título de Doctor, siempre que así lo considere el citado Tribunal.

A handwritten signature in cursive script, reading "Alberto M. Vargas", enclosed within a hand-drawn oval. The signature is written in dark ink on a light-colored paper.

Granada, a cinco de Septiembre
de mil novecientos noventa.

Quiero mostrar mi gratitud, en primer lugar, a mis directores de tesis por la confianza depositada en mí, por una gran idea que ha merecido un esfuerzo semejante y por su asesoramiento sabio, puntual y oportuno.

Hago extensiva esta gratitud a las innumerables personas que han colaborado de forma desinteresada en múltiples aspectos de este trabajo:

A Fernando Perán Mesa, Adjunto del Servicio de Análisis Clínicos de la Ciudad Sanitaria de Granada.

A Juan Villalba, Profesor Titular del Departamento de Radiología del Hospital Universitario de Granada.

A José Aguilera, Adjunto del Departamento de Fisiología Animal del Centro Experimental del Zaidín.

A Carmelo Ruiz Rejón, Profesor Titular del Departamento de Genética de la Facultad de Ciencias de Granada.

A María E. Onorato, responsable del servicio de Resonancia Nuclear Magnética de Granada.

A Andrés García Granados, profesor titular del Departamento de Química Orgánica de Granada.

A Manuel Rico, investigador del Instituto de Estructura de la Materia (CSIC) (Madrid).

A Sebastián Cerdán, investigador del Centro de Investigaciones Biomédicas (Madrid).

A Rafael Vazquez Zamorano, Técnico Especialista de Cirugía Experimental (Htaí Universitario de Granada).

A Francisco O'Valle, becario del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Granada.

A Concepción Martín Sánchez, ATS del Laboratorio de Oncología del Hospital Universitario.

A Angela, ATS del laboratorio de Análisis Clínicos de la Ciudad Sanitaria de Granada.

Es imposible incluir sólo
magnitudes observables en una
teoría. Más bien es la teoría la
que decide lo que se puede
observar (Einstein).

No sabían que era imposible y lo
hicieron (Anónimo).

Para Amalia y mi hija

INDICE.

I- INTRODUCCION.	1
1- ESPECTROSCOPIA. NOCIONES GENERALES.	2
1.1 Definición de espectroscopia. El fenómeno espectroscópico.	2
1.2 Tipos de espectroscopia.	4
2- BASES FISICAS DE LA ESPECTROSCOPIA POR RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR.	5
2.1 Momento magnético nuclear.	6
2.2 Conducta de un núcleo atómico bajo la acción de un campo magnético.	7
2.3 El fenómeno de la resonancia magnética nuclear.	9
2.4 Tiempos de relajación.	11
2.5 Magnitud de la señal en RMN.	12
3- INSTRUMENTACION EN ESPECTROSCOPIA POR RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR.	15
3.1 El imán.	15
3.2 La sonda.	18
3.3 El emisor-receptor de radiofrecuencia.	18
3.4 Adquisición de datos y análisis de los mismos.	19
3.5 Localización espacial en RMN.	20
4- EFECTOS BIOLOGICOS	21
4.1 Campo magnético estático (B_0).	21
4.2 Campo magnético variable (de gradiente).	23
4.3 Campo de radiofrecuencia.	24
4.4 Contrastes paramagnéticos.	25
5- CONTRIBUCION DE LOS METODOS DIAGNOSTICOS ACTUALES A LA EXPLORACION FUNCIONAL Y AL CONOCIMIENTO DE LA FISIOPATOLOGIA RENAL.	25
5.1 Técnicas de laboratorio.	26
5.2 Técnicas Isotópicas de Scanning (TIS).	27

5.3 Radiología convencional, angiografía, US y TAC.	29
5.4 IRM y ERM.	32
6- FENOMENOS ISQUEMICOS EN LA FISIOPATOLOGIA RENAL.	36
6.1 Importancia de la isquemia en la fisiopatología renal.	36
6.2 Contribución de los métodos diagnósticos actuales al conocimiento y detección de los fenómenos isquémicos renales.	37
6.3 Aportaciones de la ERM al conocimiento de los fenómenos isquémicos renales.	42
6.4 Modelos animales de fallo renal isquémico por oclusión arterial.	46
7- POSIBILIDADES DE LA ¹ H RMN EN EL DIAGNOSTICO DE LA ISQUEMIA RENAL.	48
7.1 Hallazgos bioquímicos de la isquemia renal.	48
7.2 Méritos relativos de la espectroscopia ¹ H RMN "versus" la ³¹ P RMN.	51
7.3 Situación actual de la espectroscopia ¹ H RMN en el estudio de los fenómenos de isquemia y fallo renal.	54
8-RESUMEN	55
II- OBJETIVOS.	57
III- MATERIAL Y METODOS.	59
1- MATERIAL.	60
1.1 Especie ensayada.	60
1.2 Instrumentación y técnicas utilizadas.	60
1.3 Productos.	62
2- METODOS.	63
2.1 Procedimiento quirúrgico.	63
2.2 Tratamiento de las muestras.	64
2.3 Estudio mediante HPLC.	65
2.4 Estudio mediante ¹ H RMN.	68
2.4.1- <i>Asignación de resonancias.</i>	69

2.4.2- Metabolitos identificados en los extractos tisulares.	79
2.4.3- Metabolitos identificados en el sobrenadante del homogenizado sin filtrar.	82
2.4.4- Metabolitos identificables en el homogenizado de riñón completo.	82
2.4.5- Cuantificación de los espectros.	84
2.5 Medición del contenido de proteínas de las muestras.	85
2.6 Determinación enzimática del lactato.	86
2.7 Tratamiento estadístico.	88
IV- RESULTADOS.	89
1- EVOLUCION DE LOS NIVELES TISULARES DE AMINOACIDOS Y DIVERSOS METABOLITOS DURANTE LA ISQUEMIA POR CLAMPAJE DEL PEDICULO RENAL.	90
1.1 Valores determinados mediante HPLC.	90
1.2 Valores determinados mediante ¹ H RMN en extractos en tampón fosfato	93
1.3 Valores determinados mediante ¹ H RMN en los extractos perclóricos de tejido renal	98
2- VALORACION DE LOS METABOLITOS RENALES TRAS LA HIPOXIA Y LA ACIDOSIS INDUCIDA MEDIANTE 7 MINUTOS DE ASFIXIA.	105
2.1 Valores determinados mediante HPLC.	106
2.2 Valores determinados mediante ¹ H RMN (extractos en tampón fosfato).	108
3- CONCENTRACION DE AMINOACIDOS EN SANGRE Y RIÑON DE RATAS NORMOXICAS E HIPOXICAS (ACIDOSIS).	111
V- DISCUSION.	114
1- GENERALIDADES.	115
2- ASIGNACION DE RESONANCIAS.	117
3- CUANTIFICACION DE LOS ESPECTROS POR RMN.	117

3- CUANTIFICACION DE LOS ESPECTROS POR RMN.	117
4- EFECTOS DE LA ISQUEMIA EN EL CONTENIDO METABOLICO RENAL	118
5- EFECTOS DE LA HIPOXIA PRODUCIDA POR ASFIXIA EN EL CONTENIDO METABOLICO RENAL.	126
6- EVOLUCION DE LOS OSMOLITOS RENALES EN LA ISQUEMIA Y LA ACIDOSIS.	131
7- DIAGNOSTICO DE ISQUEMIA MEDIANTE RMN A NIVEL EXPERIMENTAL Y CLINICO. POSIBILIDADES DE LA ¹ H RMN CON RESPECTO AL RESTO DE LOS NUCLEOS UTILIZADOS EN ESPECTROSCOPIA.	134
7.1 Hallazgos con ³¹ P RMN.	134
7.2 Hallazgos con ¹ H RMN.	135
7.3 Problemas con la espectroscopia <i>in vivo</i> de ¹ H RMN.	136
7.4 ¹ H RMN y reversibilidad o irreversibilidad de la lesión.	137
8- RMN Y PATRONES DE FALLO RENAL.	140
9- RESUMEN.	143
VI- CONCLUSIONES.	144
VII- ABREVIATURAS Y GLOSARIO.	147
1- ABREVIATURAS.	148
2- GLOSARIO.	150
VIII- BIBLIOGRAFIA.	153

INTRODUCCION.

I-INTRODUCCION.

1-ESPECTROSCOPIA: NOCIONES GENERALES.

1.1-Definición de espectroscopia. El fenómeno espectroscópico.

La espectroscopia es una rama de la ciencia que se inicia en 1666 con la descomposición, por Newton, de la luz blanca, mediante un prisma, en un espectro de colores. En términos de radiación, la luz visible ocupa una pequeña parte del espectro electromagnético (conjunto de energías radiantes clasificadas según su frecuencia (ν) y longitud de onda (λ). (Fig I.1) (Gadian 1982).

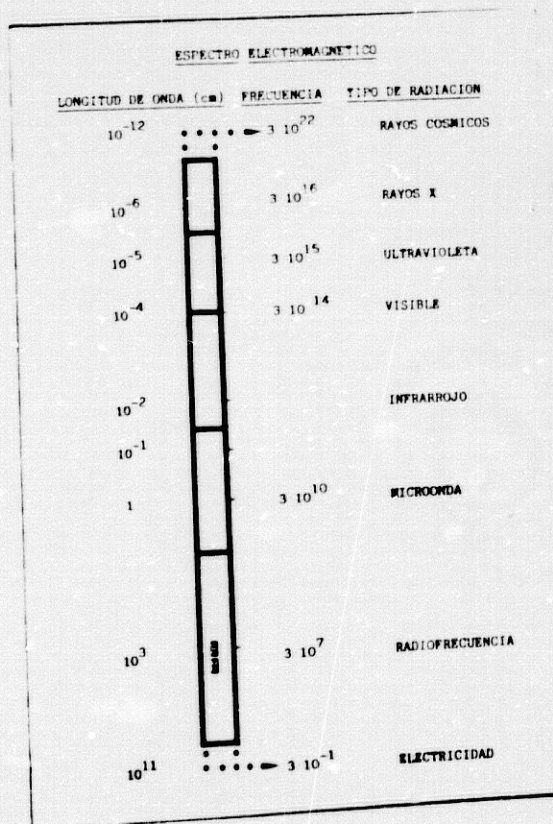


Fig. I.1- El espectro electromagnético incluye distintos tipos de energía radiante, clasificadas por frecuencia y longitud de onda. La instrumentación para producir y registrar la radiación electromagnética en cada región es diferente.

El análisis de la estructura molecular de la materia mediante la interacción con la misma de las distintas formas de radiación electromagnética constituye, en esencia, el fundamento del método espectroscópico (Petersen y cols 1985c).

En principio, todos los métodos espectroscópicos son semejantes: en el curso de la interacción de la radiación con la materia se absorbe una cierta cantidad de energía, que se emite después en un proceso sujeto a medición en el que se pueden determinar la frecuencia y la longitud de onda de la radiación emitida, proporcionando el resultado de la medida una idea bastante aproximada de la conformación molecular del medio irradiado. En la práctica, los distintos procedimientos espectroscópicos difieren en la frecuencia de radiación o franja del espectro electromagnético utilizada. Generalmente, aun cuando las características del fenómeno a estudiar influyen sobre la elección de la frecuencia de radiación más útil a emplear, las divisiones sobre ésta suelen ser arbitrarias y tienen su origen en la capacidad de los sistemas de instrumentación para producir y registrar las distintas frecuencias del espectro electromagnético (Streitwieser y Heathcock 1982).

Todos los espectrómetros deben poseer, por ello (Spice 1967): a) una fuente de radiación; b) un sistema de selección de longitudes de onda conocidas; c) un soporte para la muestra material objeto de estudio; d) un detector de radiación.

1.2-Tipos de espectroscopia.

La absorción o emisión de radiación por la materia tiene lugar en forma de cuantos de energía de magnitud $h \times \nu$ (h : constante de Planck; ν : frecuencia de la radiación). El proceso de absorción y / o emisión ocurre sólo si la magnitud del cuanto energético iguala exactamente al cambio de energía de algún proceso atómico o molecular. En consecuencia, cada tipo de proceso está asociado con un determinado intervalo de frecuencia del espectro electromagnético (Catalá 1979).

Las distintas formas de espectroscopia pueden, por tanto, clasificarse según la frecuencia de la radiación utilizada o el tipo de transición energética que provocan (Slichter 1978). Así:

a) Los cuantos de radiación gamma resultan comparables a los cambios de energía de los procesos nucleares, por lo que son emitidos cuando tienen lugar tales cambios (Streitwieser y Heathcock 1982).

b) La espectroscopia de rayos X estudia las transiciones que tienen lugar en las nubes electrónicas internas que rodean a los átomos (Petersen y cols 1985c).

c) Las regiones ultravioleta y visible del espectro se encuentran asociadas con transiciones de los electrones de valencia (externos) y pueden utilizarse, por ello, para investigar el estado redox de los sistemas vivos (Harris y Mann 1978).

d) La región infrarroja es característica de los cambios de energía moleculares por vibración y se usa para estudiar los enlaces químicos (Spice 1967).

e) La espectroscopia por microondas estudia las transiciones de spin electrónico, mientras que la espectroscopia por ondas de radiofrecuencia estudia las transiciones de spin nuclear. En la espectroscopia por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) las señales se originan, por tanto, como consecuencia de la interacción de las ondas de radio con los propios núcleos atómicos (Gadian 1982).

2-BASES FISICAS DE LA ESPECTROSCOPIA POR RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR:

En física, es bien conocido el hecho de que una carga eléctrica oscilante crea en todos los puntos del espacio que la rodea un campo eléctrico y un campo magnético perpendiculares entre sí. Maxwell ha demostrado que la perturbación electromagnética originada por la carga se propaga en el espacio, a velocidad constante, en una dirección perpendicular a su vez a la de los campos eléctrico y magnético que forman la perturbación (Fig. I.2) (Gremy y Perrin 1971).

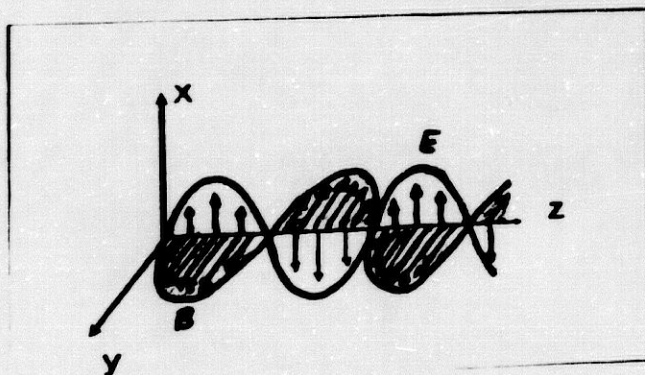


Fig. I.2- radiación electromagnética propagándose en la dirección Z. B: campo magnético oscilante. E: Campo eléctrico oscilante.

Cuando las cargas que inducen la perturbación no son libres (caso, por ejemplo, de una corriente eléctrica que atraviesa un conductor), en el espacio circundante sólo se manifiesta el campo magnético, debido a que las fuerzas eléctricas se anulan como consecuencia de los mecanismos de repulsión y atracción de cargas dentro del conductor (Bovey 1969; Sears y Zemansky 1973). Este fenómeno es aprovechado en RMN donde únicamente se utiliza el componente magnético de la radiación electromagnética.

2.1- Momento magnético nuclear.

Los núcleos atómicos contienen protones y neutrones que giran a alta velocidad (movimiento de Spin). Como giran y tienen masa (m), poseen un "momento angular". Estando el protón positivamente cargado ($q+$), el movimiento de Spin genera un pequeño campo magnético llamado "momento magnético" (Fig. I.3) (Abragam 1961). Pues bien, el cociente entre los módulos o valores del momento magnético y angular se llama cociente o constante giromagnética del núcleo y depende sólo del cociente entre su carga ($q+$) y su masa (m).

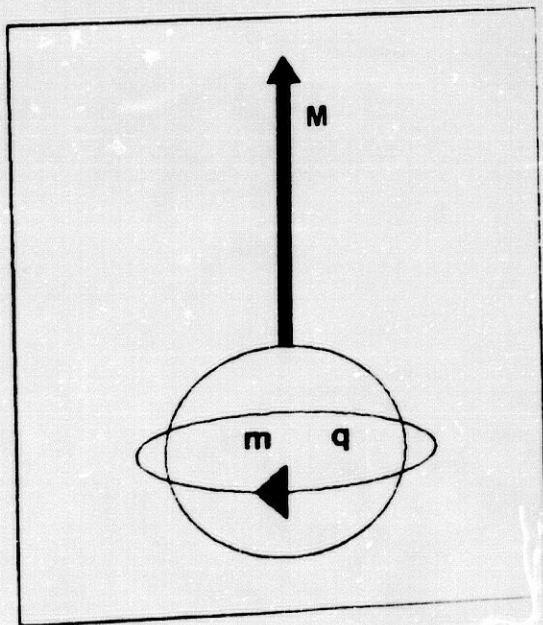


Fig. I.3- Momento magnético nuclear (M), definido por $M = \gamma \times J$, donde γ es la constante giromagnética proporcional a q/m , y J es el vector de momento angular proporcional a la masa y velocidad del núcleo ($m \times v$).

Aunque el neutrón es eléctricamente neutro, sus cargas no están uniformemente distribuidas y, por tanto, generan un "momento magnético" cuyo valor es, aproximadamente, igual a los $\frac{2}{3}$ del momento magnético del protón (Bradley y Tosteson 1981). Por esta razón, cuando un núcleo posee un número par de protones y neutrones (por ej: $^{20}\text{Ca}_{40}$) los "momentos magnéticos" de unos y otros se anulan mutuamente y el núcleo no es susceptible al fenómeno de la RMN (Elton 1964). En cambio, los núcleos con un número impar de protones, neutrones o ambos, exhiben un "momento magnético" neto, siendo capaces de absorber y emitir (resonar) energía cuando quedan sometidos a la acción de un campo magnético (Carrington y McLachlin 1967). Este fenómeno, descubierto por Bloch (Bloch y cols 1946) y Purcel (Purcel y cols 1946) en 1946 constituye la base de la RMN.

2.2-Conducta de un núcleo atómico bajo la acción de un campo magnético.

Los protones de un determinado núcleo pueden representarse como esferas giratorias con un vector de momento magnético orientado al azar (Fig. I.4a). Cuando los núcleos contenidos en un preparado biológico o material cualquiera se introducen en un campo magnético estático B_0 orientan sus vectores en las posiciones finitas permitidas, que para el núcleo de hidrógeno, de spin $\frac{1}{2}$, son dos: UP (Paralela a la dirección de B_0) y DOWN (Antiparalela a la dirección de B_0). Estas dos posiciones implican dos estados energéticos diferentes (Fig. I.4b). En el hidrógeno, al ser de menor valor la posición UP, predominan los protones que adquieren dicha posición, con un exceso sobre la posición DOWN de 1,4 núcleos por cada millón, en el agua a 37°C (Bradley y Tosteson 1981) (Fig. I. 5). De ello se deduce que el vector de magnetización es diminuto y que la señal con que se trabaja en RMN es muy pequeña.

Fig. I.4- A) El momento magnético de los protones no sometidos a un campo magnético se orienta al azar.
 B) Los protones sometidos a un campo magnético se orientan en las posiciones UP y DOWN.

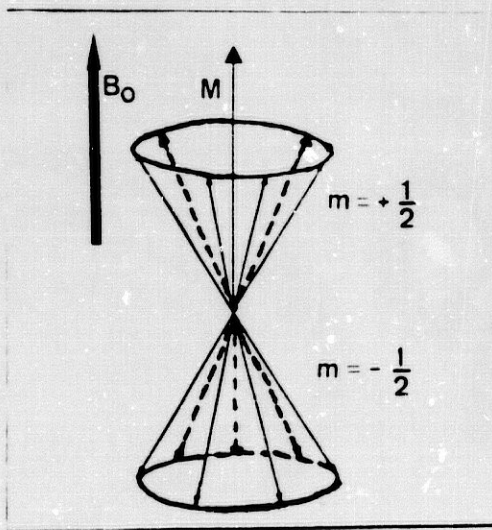
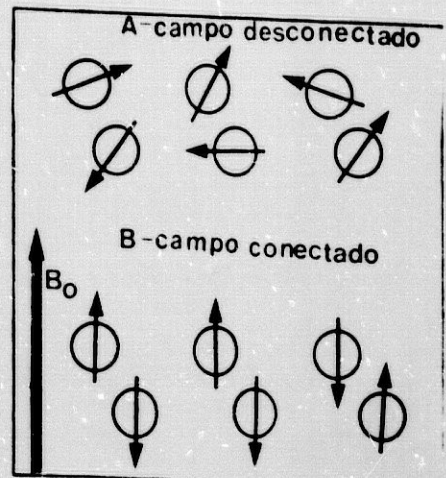


Fig I.5- Representación de una colección de spin en un momento dado. El vector M representa la magnetización neta que resulta de la suma de la contribución de cada uno de los spin y adopta la posición UP. Los vectores de momento magnético (m) para los núcleos de spin $\frac{1}{2}$ adquieren sólo dos valores: $+\frac{1}{2}$ y $-\frac{1}{2}$.

Los protones, sometidos a la acción del campo magnético B_0 y orientados en las posiciones descritas, giran en torno a la dirección de B_0 en forma característica (precesión) con ángulos de giro, el menor de los cuales es de $54,72$ para cada orientación (Kane y Sternheim 1978). En estas condiciones,

si a los núcleos en movimiento de precesión se les aplica un segundo campo B_1 que gira perpendicular a B_0 y en el mismo sentido y frecuencia de precesión que los protones bajo estudio, se genera una fuerza que tiende a desplazar el vector de magnetización aumentando su ángulo con respecto al campo estático B_0 (Moore 1982).

El método escogido para producir esta excitación nuclear es la aplicación de ondas de radio de alta intensidad durante un periodo muy corto de tiempo (microsegundos) (Petersen y cols 1985c). El valor del ángulo final desplazado respecto a B_0 (α), que sirve para caracterizar el efecto, depende básicamente del valor de B_1 , del tiempo durante el que se aplica éste y de la constante giromagnética de los núcleos (Gili Planas 1984). Debido a la corta duración de B_1 , hablamos, en caso de excitación nuclear, de haber suministrado un pulso. Y si, como consecuencia del mismo, se produce una desviación α , hablamos de un pulso α .

2.3-El fenómeno de la resonancia magnética nuclear.

La absorción de energía por los núcleos a partir de un campo energético de radiofrecuencia (B_1) se origina como consecuencia de la existencia de un número desigual de núcleos en un estado energético determinado (Fig. I.6). Si las distintas poblaciones nucleares excitadas se encontrasen en un estado energético uniforme, se produciría un número igual de transiciones entre las situaciones UP y DOWN, incompatible con la absorción o emisión neta de energía. En estas condiciones, no se generaría señal alguna (Gadian 1982).

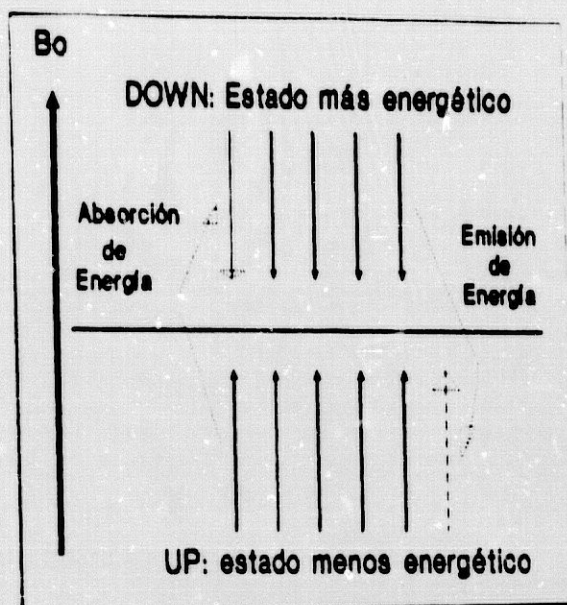


Fig.I.6- De los dos estados energéticos que adquieren los protones cuando son sometidos a los efectos de un campo magnético externo, son los núcleos UP los que tienen menor energía y constituyen, por ello, el estado energético más poblado. La transición de un núcleo del menor al mayor estado energético se acompaña de absorción de energía, mientras que la emisión ocurre por el proceso inverso. A mayor fuerza de campo, la diferencia energética entre los dos estados aumenta como resultado de la mayor población de núcleos en la posición UP y, por tanto, de una mayor magnetización neta, incrementándose la señal obtenida.

El fenómeno descrito, de base cuántica, puede explicarse de un modo más simple con un tratamiento basado en la física clásica: en efecto, colocados en un campo magnético, los núcleos desarrollan un momento magnético neto que se representa como un vector a lo largo del eje Z. Un pulso de radiofrecuencia perturba sus estados energéticos desplazando la magnetización neta al eje X. La energía de radiofrecuencia es absorbida en ese momento (Gili 1988a). Recibido el pulso de radiofrecuencia los núcleos precesan en el plano XY, precesión o giro durante el cual se produce una disminución de energía, con la subsiguiente pérdida de magnetización en el plano XY a la que llamamos tiempo de relajación spin-spin o T_2 . Consecuencia de la pérdida de energía durante la precesión es, por otra parte, el retorno del vector de magnetización a su posición de equilibrio sobre el eje Z, fenómeno al que caracterizamos mediante el llamado tiempo de relajación spin-retículo o T_1 , (Harms y cols 1984) (Fig. I.7).

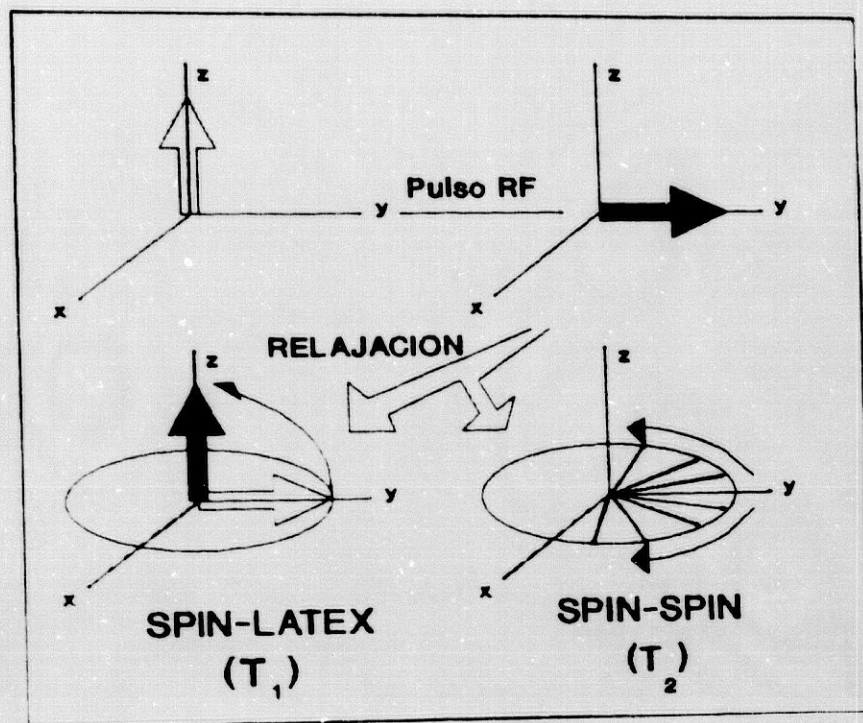


Fig. I.7- Un pulso de radiofrecuencia (RF) produce una magnetización neta en el plano XY. La pérdida de esta magnetización ocurre mediante dos procesos distintos de relajación: spin-látex y spin-spin. La relajación spin-látex es el retorno de la magnetización a la posición de equilibrio con el campo magnético aplicado (dirección Z) y el tiempo requerido viene caracterizado por el tiempo de relajación longitudinal o T_1 . La relajación spin-spin es la pérdida de la coherencia de fase de los spin nucleares. Con la pérdida de la coherencia, la magnetización neta en el plano XY tiende a cero. El tiempo requerido para este proceso viene caracterizado por el tiempo de relajación horizontal o T_2 .

2.4-Tiempos de relajación.

El T_1 , tiempo de relajación longitudinal o spin-látex, refleja el intercambio de energía entre los spin nucleares y el medio en el que se encuentran éstos y se define como el tiempo requerido para que un sistema recupere el 63% de su valor de equilibrio tras ser expuesto a un pulso de 90° (Petersen y cols 1985c). Para el agua el valor de T_1 es de unos tres segundos.

El T_2 , tiempo de relajación horizontal o spin-spin, refleja interacciones entre núcleos vecinos sin ningún intercambio de energía con el medio e informa sobre la desaparición de la señal en el plano XY (Muller y cols 1985a). Su valor para el agua pura es de unos tres segundos, por lo que el cociente T_1/T_2 en el agua es igual a uno.

En soluciones líquidas y cuerpos sólidos, la existencia de pequeños campos magnéticos moleculares determina que los núcleos se relajen con frecuencias de precesión ligeramente distintas (no coherentes), lo que hace que las interacciones spin-spin reduzcan, prácticamente a cero, el vector de magnetización en el plano XY antes de que se libere toda su energía al medio. De ello se deduce que, en tales condiciones, T_2 sea siempre inferior o igual a T_1 (Gili 1988a).

En términos generales, la señal obtenida en RMN es siempre dependiente de la densidad de protones del medio analizado y la mayor o menor influencia en la señal de los distintos tiempos de relajación depende de la secuencia de pulsos utilizada.

2.5-Magnitud de la señal en RMN.

Como la energía y la frecuencia de una radiación se encuentran directamente relacionadas entre sí ($E = h \times \nu$), la amplitud de la señal obtenida en RMN, que es una medida de la energía de radiación emitida, depende, en primer lugar, de la frecuencia de emisión.

La frecuencia de resonancia de un núcleo depende, a su vez, de tres factores:

1-FUERZA DEL CAMPO MAGNETICO (Tabla I.1).

A mayor fuerza de campo magnético mayor frecuencia de resonancia. Por ejemplo, a 1 Tesla los protones resuenan a 42,5 Mhz mientras que a 2 Tesla resuenan a 85 Mhz (Weiner 1986a). En esta variación de frecuencias, dependiente de la fuerza de campo está basada la Imagen por Resonancia Magnética (IRM). Variaciones controladas del campo magnético en el espacio proporcionan, por ello, un medio para determinar la posición anatómica de los núcleos (Weiner 1986b) (Fig. I.8).

2-CARACTERISTICAS FISICAS DEL NUCLEO BAJO ESTUDIO (Tabla I.1).

Diferentes núcleos resuenan a diferentes frecuencias, en un proceso dependiente de las partículas subatómicas y de la masa nuclear. Por ejemplo, en un campo magnético de 2,4 Tesla el ^1H resuena a 100 Mhz y el ^{31}P a 40,5 MHz (Weiner 1986a). En general, el hidrógeno tiene la mayor frecuencia de resonancia, lo que unido a su mayor abundancia determina una señal más intensa en RMN y proporciona una mayor sensibilidad a las mediciones (Levine 1983).

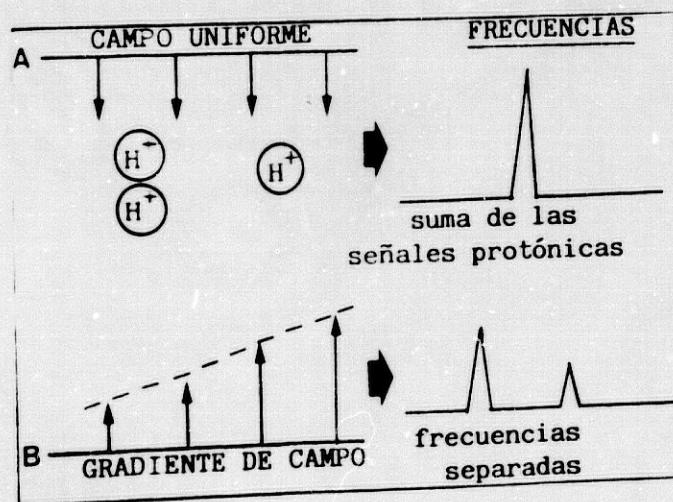


Fig. I.8- A) Los protones separados espacialmente si son sometidos a un campo magnético homogéneo resuenan a la misma frecuencia y la señal obtenida es la suma de las señales individuales.

B) Los mismos protones sometidos a un gradiente de campo experimentan distinta fuerza magnética resonando a desigual frecuencia, obteniéndose señales separadas que son utilizadas para su localización espacial.

TABLA I.1- FRECUENCIA DE RESONANCIA (MHZ) DE LOS PRINCIPALES NUCLEOS UTILIZADOS EN ESPECTROSCOPIA CON SUS ACTUALES CAMPOS DE APLICACION.

IMAN	CAMPO (TESLA)	¹ H	¹³ C	³¹ P
IRM	1	4,25	1,07	1,72
ERM	1,5	63,83	16,05	25,83
ERM	2	85,10	21,39	34,45
ERM	3	127,65	32,10	51,68
INVEST.	4	170,20	42,79	68,90
INVEST.	5	212,75	53,49	86,12
INVEST.	6	255,30	64,20	103,35
INVEST.	7	297,85	74,89	120,87

3-EFECTOS DEL ENTORNO ELECTRONICO.

El entorno electrónico nuclear induce un campo magnético, en el que están inmersos los núcleos atómicos, que ejerce cierta influencia sobre el campo magnético externo (Le Bihan 1985) y afecta a la frecuencia de resonancia de los núcleos en cuestión. Este fenómeno llamado "Chemical Shift" o desplazamiento químico proporciona la base para el uso de la Espectroscopia por Resonancia Magnética (ERM) en la determinación de la estructura química de una determinada sustancia (Weiner 1986b) (Fig. I.9). La influencia del entorno electrónico explica que no todos los protones tengan la misma frecuencia de resonancia (Frecuencia de Larmor o de precesión) cuando se les somete a un campo magnético externo. Por ejemplo, los núcleos de hidrógeno de un hidrocarburo resuenan a 40 Mhz, pero los núcleos de hidrógeno del agua se caracterizan por una frecuencia de Larmor que difiere de la anterior en aproximadamente 10 Hertz (Muller y cols 1985b).

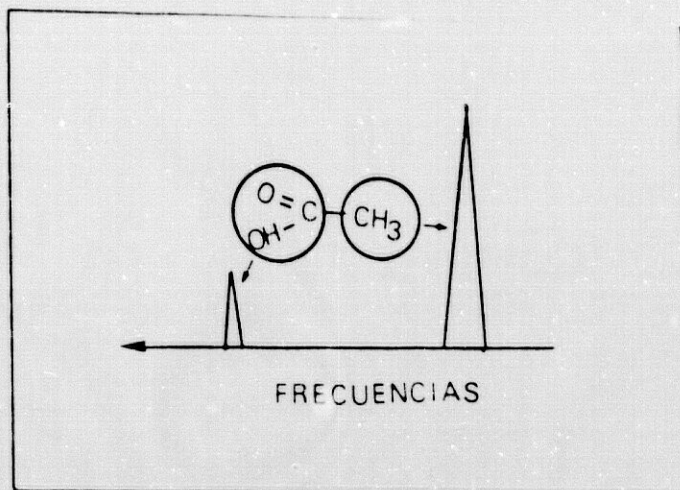


Fig. I.9- Espectro esquemático del ácido acético ($\text{CH}_3\text{-COOH}$). La presencia de oxígeno confiere un entorno electrónico diferente al protón del grupo carboxilo (COOH) con respecto al grupo metilo (CH_3) y por tanto presentan distinta frecuencia de resonancia. La señal del grupo metilo será tres veces mayor que la del grupo carboxilo ya que la relación de protones es de 3:1.

3-INSTRUMENTACION EN ESPECTROSCOPIA POR RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR.

La instrumentación básica de un espectrómetro de RMN consta de los siguientes elementos (Fig. I.10):

3.1-El imán.

Destinado a crear el campo magnético estático B_0 . Cualquier experimento por RMN exige la presencia de un campo magnético estable durante el tiempo de registro y homogéneo en toda la extensión de la muestra (Petersen y cols 1985c). Este campo puede generarse por distintos procedimientos:

a) Electroimanes o sistemas resistivos.

Consisten básicamente en unas bobinas a través de las cuales pasa la corriente generando una fuerza de campo cuyo límite máximo está en 0,7 Tesla (Petersen y cols 1985c). Tienen un consumo elevado de energía que aumenta con el cuadrado del campo (Kaufman y Crooks 1981).

b) Imanes superconductores.

Se utilizan como tales aleaciones de Niobio-Titanio embebidas en una matriz de cobre, que proporciona suficiente ductilidad mecánica al sistema y protege a las bobinas del superconductor de modificaciones térmicas excesivas que podrían originar la pérdida de la superconductividad (Ross y cols 1983). Requieren un sistema de enfriamiento doble a base de nitrógeno líquido y helio contenido en dispositivos tipo Dewar. Cuando están cargados de corriente los imanes, prácticamente, no utilizan fluido eléctrico, pero tienen un consumo importante de líquidos criogénicos (0,5 l/hora de helio). Las limitaciones de la fuerza de campo para los imanes superconductores aún no han sido establecidas (Petersen y cols 1985c).

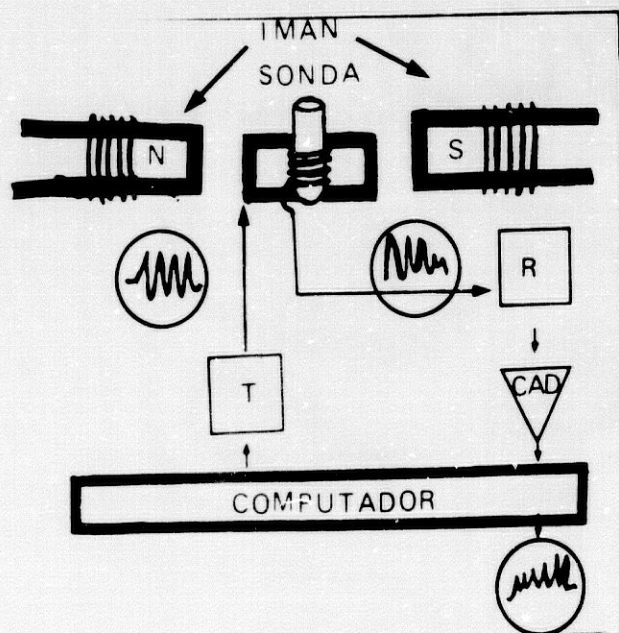


Fig. I.10- Instrumentación para RMN. Habitualmente se coloca la muestra en un pequeño tubo de vidrio en el centro del campo magnético, donde la homogeneidad es más alta. Se dispone una bobina transmisora alrededor de la muestra. Los núcleos se excitan transmitiendo un pulso de RF desde la bobina transmisora (T:transmisor). El receptor (R) amplifica luego la señal, la cual pasa al convertidor analógico-digital (CAD). Finalmente la señal es procesada por el ordenador.

c) Imanes permanentes.

Algunas aleaciones actualmente conocidas muestran propiedades ferromagnéticas. Un imán de estas características tiene un bajo costo de mantenimiento ya que no requiere líquidos criogénicos ni electricidad para mantener el campo. Las desventajas son su peso excesivo (los primeros imanes comerciales pesaban 100 toneladas para un campo magnético de 0,28 Tesla) y la ausencia de estabilidad térmica. La fuerza de campo conseguida no supera los 0,3 Tesla. Aparte de ello, si algún objeto metálico entra inadvertidamente en contacto con el imán, éste no puede desconectarse para retirarlo (Bradley y cols 1983). Tienen el inconveniente además, como los imanes resistivos y superconductivos, de crear un campo magnético exterior al imán que obliga a tomar ciertas precauciones en su instalación (Peters y Prosens 1984). Algunos autores han preconizado, para IRM, el uso de imanes permanentes contruidos a partir de aleaciones ferromagnéticas, que permiten reducir el peso en un factor de 10 (Bernard y cols 1988).

Como para la espectroscopia de resonancia magnética se requiere un campo magnético elevado (superior a 1,5 Tesla) capaz de producir una dispersión lateral lo suficientemente importante como para separar las diferentes frecuencias de resonancia y obtener una relación señal-ruido adecuada en un momento dado (Vinocur 1984), en la actualidad, en espectroscopia por RMN se utilizan únicamente imanes superconductores. En cambio, en estudios de imagen los tres tipos de imanes mencionados con anterioridad pueden ser utilizados (Sherzinger y Hendee 1985).

3.2-La sonda.

El diseño de la sonda es de gran importancia en el estudio de los sistemas vivos (Gadian 1982), puesto que la facilidad de manejo de las soluciones líquidas no resulta posible cuando se estudian órganos, animales o seres humanos.

El principal elemento de la sonda es el COIL o bobina de radiofrecuencia que rodea la muestra u órgano objeto de estudio y transmite dentro de ella el campo magnético alternativo de radiofrecuencia B_1 que induce la excitación de los núcleos sometidos al campo magnético estático B_0 (Moore 1982; Jones y cols 1985). El coil también detecta la señal asociada a la absorción-emisión de energía de los núcleos contenidos dentro de la muestra.

Para las aplicaciones *in vivo* se han creado los coil de superficie (Ackerman y cols 1980), que se sitúan próximos al órgano a explorar y que producen espectros e imágenes de alta resolución de estructuras superficiales como músculo, mama, cuello y órbita entre otras (Fitzsimmons y cols 1984). Se han obtenido muy buenas imágenes mediante coil separados y colocados ortogonalmente entre sí (Sauk y cols 1984).

3.3-El emisor-receptor de radiofrecuencia.

El emisor consta de un generador de pulsos de radio, un programador de secuencias de pulsos y un amplificador de radiofrecuencia (Petersen y cols 1985c).

El receptor se ocupa de amplificar la señal proveniente de la sonda entre 500 y 1000 veces, ya que la magnitud original es de unos pocos microvoltios (Sherzinger y Hendee 1985).

3.4-Adquisición de datos y análisis de los mismos.

Después de recogida por el receptor, la señal pasa a un convertidor analógico digital y se procesa en un computador (Petersen y cols 1985c).

Los ordenadores de los espectrómetros de RMN suelen poseer un programa de Transformada de Fourier, que emplea el algoritmo diseñado por Cooley y Tukey (1965) conocido como "Fast Fourier Transform", basado en el enfoque matemático desarrollado por J. Fourier (1768-1830), para el análisis de fenómenos de naturaleza sinusoidal.

La señal obtenida en un experimento de RMN es, en efecto, una senoide amortiguada exponencialmente ("Free Induction Decay" o "FID"). Esta señal, cuya amplitud varía con el tiempo, se resume en una función de distribución de frecuencias cuyo análisis permite obtener una envolvente de área proporcional al valor inicial de la FID (Hendee y Morgan 1984) y, por lo tanto, proporcional también a la concentración en el medio analizado de la sustancia origen de la respuesta (Muller y cols 1985b) (Fig. I.11).

Una vez transformada, la señal puede registrarse sobre papel.

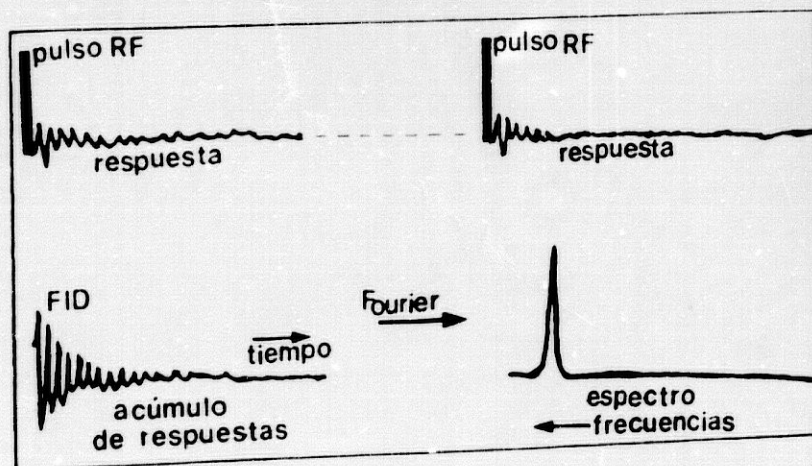


Fig. I.11- En el análisis de un espectro de RMN por Transformada de Fourier, las señales se representan en función del tiempo y se convierten en un espectro representativo de los componentes de frecuencia de la señal temporal.

3.5-Localización espacial en RMN.

En IRM es imprescindible la disponibilidad de un sistema de codificación espacial que permita atribuir a cada señal su lugar en un plano o volumen para, de esta manera, poder construir las imágenes anatómicas (Bernard y cols 1988). Esto se consigue habitualmente con las bobinas de gradiente, que consisten en electroimanes que modifican de una forma lineal el campo B_0 en las tres dimensiones del espacio (Bradley y cols 1983).

En ERM la localización espacial de los espectros se hizo inicialmente de dos maneras. La primera consistió en perfilar el campo B_0 para limitar la zona de la muestra que, sometida a un campo magnético homogéneo, responde a la excitación del campo B_1 , en valores de frecuencia apropiados. Esta técnica, desarrollada por Damadian para IRM en 1972 bajo el nombre de FONAR, fue retomada posteriormente para ERM con el nombre de TOPICAL MAGNETIC RESONANCE (Gordon y Hanley 1980).

La segunda tuvo como fundamento el uso de un coil de superficie (Ackerman y cols 1980) que, colocado sobre la zona a estudiar, muestrea un área cuya profundidad depende del radio de la bobina (r), del tiempo de repetición de la secuencia de pulsos (TR) y de la duración del pulso (Tp). Derivado de ella es el método DRESS (Depth-Resolved Surface Coil Spectra) que une al uso de los coils de superficie un gradiente en el B_0 para seleccionar el plano de excitación (Bottomley y cols 1984a).

Los métodos descritos presentan algunas desventajas, que abarcan desde una pobre definición de volumen hasta un largo tiempo de adquisición en los datos. La técnica actualmente propuesta es la ISIS (Image-Selected in vivo Spectroscopy) (Jue y cols 1988; Ordidge y cols 1986), en la cual el volumen seleccionado se localiza utilizando la frecuencia y gradiente

determinados por la imagen y puede moverse a voluntad en cualquier dimensión.

4-EFECTOS BIOLÓGICOS.

Los riesgos potenciales de la RMN se dividen en tres categorías: los causados por el campo magnético estático de fuerza moderada, los producidos por campos magnéticos pequeños rápidamente cambiantes (cambios de gradiente) y los derivados del campo magnético de radiofrecuencia (Budinger 1979).

4.1- Campo magnético estático (B_0).

Presenta riesgos agudos y otros subagudos. Entre los primeros hay que reseñar los provenientes de materiales ferromagnéticos, tales como escalpelos, tijeras y otros objetos, que pueden ser atraídos por el imán y convertirse en auténticos proyectiles volantes. Para evitar tales efectos, se ha recomendado la instalación de un detector de metales en la entrada de la habitación donde se encuentre instalado el sistema RMN (Petersen y cols 1985a). Los implantes quirúrgicos de pequeños metales pueden desplazarse de su posición con riesgo de hemorragia y pueden, por otro lado, ser causa de artefactos en la imagen (Existen, en este sentido, estudios sobre las propiedades magnéticas de los distintos clips quirúrgicos (New y cols 1983; Persson y Stahlberg 1986)).

En animales de experimentación se ha comprobado la aparición de potenciales de flujo, en grandes vasos, proporcionales a la velocidad de la sangre. Este fenómeno se refleja, por ejemplo, en el electrocardiograma mediante un aumento de la amplitud de la onda T, que comienza a detectarse a 0,3 Tesla. El citado efecto, instantáneo, resulta inmediatamente reversible tras la desconexión del imán, no deja anormalidad residual en el E.C.G. (Gaffey y Tenforde 1981), no se ha visto asociado a otras alteraciones fisiológicas (frecuencia cardíaca, arritmias) y no se ha descrito en el hombre con la aplicación clínica de la IRM (Mansfield y Morris 1982). No obstante, no existen informes en humanos para campos magnéticos elevados. En el mono tití, sometido a fuerzas de campo de 7 y 10 T, no ha podido comprobarse la producción de arritmias (Battocletti y cols 1981).

En cuanto a los riesgos subagudos, se han publicado informes sobre las acciones que los campos magnéticos standard pueden producir en términos de mutación genética, cambios en la velocidad de crecimiento y otros (Barnothy 1969). No obstante, los citados efectos no se ha comprobado, de forma fidedigna, que se produzcan en mamíferos (Gili 1988b). Así, un estudio estadístico realizado en 792 trabajadores expuestos a campos magnéticos estáticos comprendidos entre 0,5 y 2 T, no mostró mayor incidencia en 19 tipos de enfermedades (Budinger y cols 1984b).

Los trabajos acerca de una posible influencia de los campos magnéticos estáticos sobre el Sistema Nervioso han sido negativos (Dársonval 1983). Se puede estimar en 24 T el campo necesario para disminuir aproximadamente al 90% de su valor normal la velocidad de transmisión nerviosa, lo cual deja un importante margen de seguridad a la RNM (Bernard y cols 1988). Las recomendaciones de los distintos organismos internacionales para la limitación de campo en la clínica

humana vienen recogidas en la tabla I.2.

TABLA I.2- RECOMENDACIONES PARA LA LIMITACION DE CAMPO DE DIFERENTES ORGANISMOS INTERNACIONALES: 1- Reino Unido (National Radiological Protection Board 1981) 2- Bureau of Radiological Health de Estados Unidos (Food and drug Administration 1982) 3- Alemania (Bundesgesundheitsamt 1984). La base sobre la que se fundamentan estas recomendaciones ha sido publicada (Saunders y Smith 1984). (*) SAR: Specific absorption rate: cantidad de energía por unidad de tiempo (o poder) depositada por unidad de peso.

CAMPO	REINO UNIDO(NRPS 1981)	USA(FDA 1982)	ALEMANIA OC. (BGA 1984)
ESTATICO	2,5 T	2 T	2 T
VARIABLE	20 T/s	3 T/s	3MicroAm/cm ²
RADIOFREC.	Aumento de la tª corporal media no superior a 12 C.	SAR(*) = 0,4 W/Kgr (Cuerpo total)	SAR(*) = 1 W/Kgr (Cuerpo total)

4.2-Campo magnético variable (de gradiente).

Algunos efectos producidos por campos magnéticos variables son conocidos como fosfenos magnéticos (Budinger 1981). Se trata de impresiones visuales atribuidas a un movimiento de torsión que altera la forma de los bastones de la retina (Budinger y cols 1984a). No hay evidencia de que estos efectos sean irreversibles, a pesar de lo cual se considera conveniente la utilización de dosímetros por parte del personal que trabaje en las cercanías de un imán para la realización, al menos, de estudios prospectivos de riesgo (Petersen y cols 1985a).

Las limitaciones generales de los campos magnéticos variables se recogen en la tabla I.2.

4.3-Campo de radiofrecuencia.

Los campos de radiofrecuencia pueden interactuar tanto con los tejidos como con cuerpos extraños, situados en ellos (implantes metálicos en los pacientes). El principal resultado de este tipo de interacción es la aparición de calor (Davis y cols 1981), en cuantía proporcional a la frecuencia de la energía de radiofrecuencia y al grado de ionización del entorno bioquímico (Led y Petersen 1978). El calor originado se produce como consecuencia de corrientes eléctricas inducidas por el campo magnético variable o por el campo de RF.

En diversas situaciones clínicas, incluida la utilización de campos magnéticos elevados, la producción de calor no se ha visto asociada con incrementos de temperatura superiores a 1°C (Bottomley y Edelstein 1981). Solo se ha descrito un caso de calentamiento entre dos prótesis de cadera estudiadas *in vitro* en una solución salina conductora (Davis y cols 1981). En general, los pacientes con implantes metálicos pueden explorarse sin riesgos de consideración (Medulin y cols 1984). De hecho, los campos magnéticos se utilizan cada vez con mayores frecuencias sin que se hayan dado a conocer efectos perjudiciales, hasta ahora.

Un apartado especial merecen los pacientes portadores de marcapasos y las embarazadas. En el primer caso, tanto los campos magnéticos de RF como los variables pueden provocar el desplazamiento del hilo conductor induciendo asincronías de funcionamiento (Paulicek y cols 1983). El límite que no deben sobrepasar estos enfermos está en 5 gauss y debe marcarse con una línea fuera de la habitación del imán. En cuanto a las embarazadas, se recomienda esperar hasta después del parto, a menos que se plantee un problema urgente entre TAC y RMN.

Las limitaciones generales del campo de radiofrecuencia se recogen en la tabla I.2.

4.4-Contrastes paramagnéticos.

Las sustancias paramagnéticas, utilizadas en IRM como contraste por su capacidad de modificar el entorno magnético local, deben considerarse como medicamentos exógenos con posibles efectos secundarios (Bernard y cols 1988).

El único que actualmente está siendo ensayado en la clínica es el Gadolinium-DTPA. Especialmente útil en riñón, se distribuye y elimina de un modo similar al Tc99-DTPA (Iaina y cols 1988). Ha mostrado su valor en modelos experimentales para medición de flujo (Strich y cols 1985) y función renal (London y cols 1983). La aparente tolerancia del citado contraste en el hombre se encuentra pendiente, no obstante, de confirmación.

5-CONTRIBUCION DE LOS METODOS DIAGNOSTICOS ACTUALES A LA EXPLORACION FUNCIONAL Y AL CONOCIMIENTO DE LA FISIOPATOLOGIA RENAL.

La exploración funcional del riñón tiene por objeto conocer su capacidad de trabajo y en qué modo y cuantía éste se aparta de la normalidad en situaciones de enfermedad.

Los métodos clásicos de exploración funcional se han basado, muchas veces, en hechos clínicos empíricamente interpretados, olvidando o desconociendo la multiplicidad de funciones que ejerce el riñón. La insuficiencia renal (IR)

puede afectar globalmente a todas estas funciones o, parcialmente, sólo a algunas de ellas. En grados avanzados de IR la afectación funcional suele ser global, pero en el comienzo de las diferentes enfermedades renales la IR que les acompaña tiene carácter particular, existiendo una verdadera jerarquía en la conservación o afectación de las mismas, lo que permite establecer un perfil propio en diversas entidades nosológicas (Del Rio Pérez 1980). Del amplio conjunto de pruebas de función renal existente destacamos a continuación algunas de ellas.

5.1-Técnicas de laboratorio (Caralps Riera 1990).

a)Exploración de la Función Glomerular.

Para el estudio de la función glomerular se han utilizado, clásicamente, el aclaramiento de inulina o el de creatinina. La primera es una sustancia exógena que se elimina por el glomérulo sin ser reabsorbida ni excretada por los túbulos. Su excreción en orina es indicativa de la tasa de filtrado glomerular. En la actualidad su uso se limita a estudios experimentales. El mismo significado tiene el aclaramiento de creatinina, una sustancia endógena que, por tanto, no necesita ser administrada para llevar a cabo su estudio. Es la de uso preferente en la clínica.

b)Determinación del Flujo Sanguíneo Renal.

Se utiliza fundamentalmente para ello el "aclaramiento" del ácido para-amino-hipúrico que, a concentraciones plasmáticas bajas, es eliminado totalmente a la orina en un solo paso por el riñón.

c) Exploración de la Función Tubular.

c₁-Pruebas de concentración y dilución, de las cuales interesan más las de concentración, por su mayor sensibilidad. Consisten en la privación de agua y el control posterior del peso específico de orina.

c₂-Prueba de eliminación de la sulfofenolftaleína, colorante que se elimina a nivel tubular, y que se utiliza, por ello, para el análisis cuantitativo de la función tubular. Su empleo actual se ha reducido considerablemente.

c₃-Estudio de la capacidad de acidificación de la orina, que estudia los efectos sobre la orina de infusiones intravenosas de cloruro amónico.

d) Otras investigaciones:

Determinaciones de albúmina, análisis del sedimento (hematias, leucocitos, cilindros), estudios de pH, electrolitos, urea y análisis bacteriológicos diversos.

5.2-Técnicas Isotópicas de Scannig (TIS) (Fraile y Setoain 1988).

La medicina nuclear proporciona información anatómica, así como datos que reflejan el flujo sanguíneo, la funcionalidad de las nefronas y el drenaje urinario. Entre las ventajas que aportan las técnicas nucleares hay que señalar la rapidez, seguridad y mínimo riesgo de radiación que comportan.

La gammagrafía renal o imagen estática del riñón obtenida por radiofármacos informa sobre alteraciones morfológicas renales, pero, sobre todo, valora la masa funcional mediante cuantificación de la fracción de la dosis

que capta cada riñón y su confrontación con un grupo normal de referencia (Fig I.12).

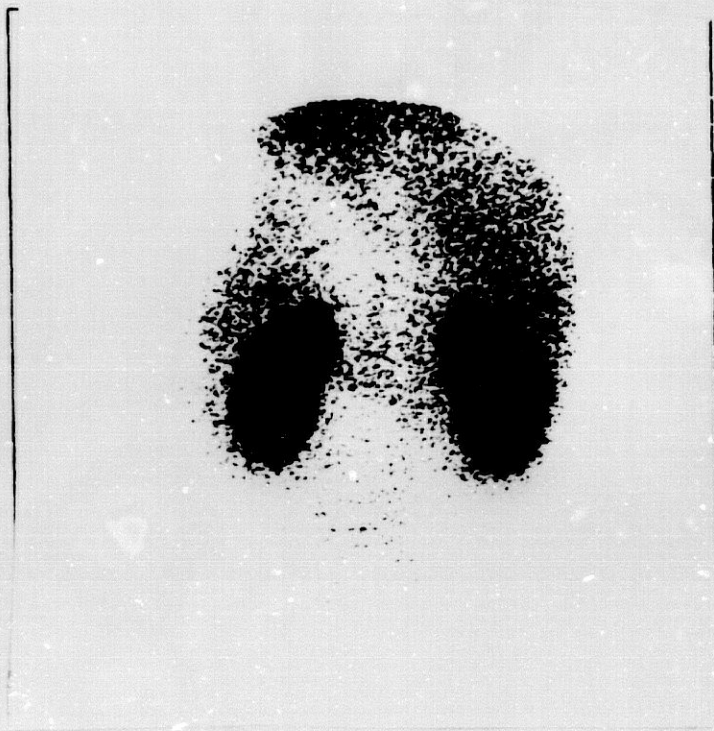
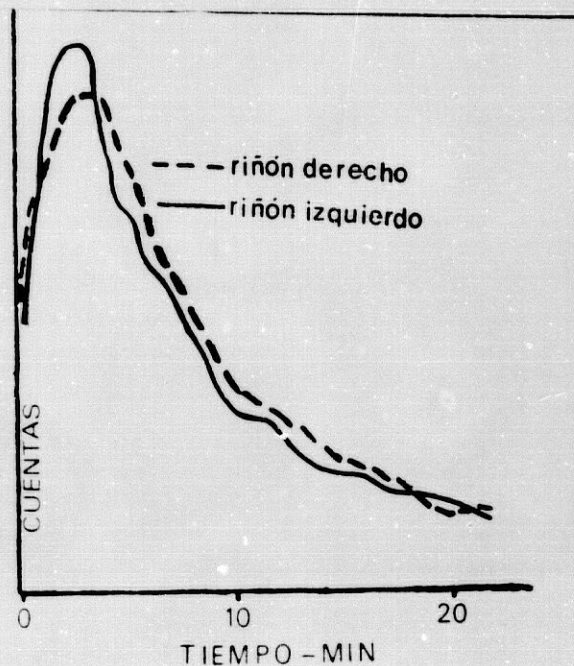


Fig. I.12- Gammagrafía renal: Se aprecia la morfología y la captación isotópica renal.

El renograma isotópico (Fig. I.13) es un estudio bastante preciso de la función renal global y por separado de cada riñón, que informa también de las posibles alteraciones de la perfusión renal o de problemas obstructivos en la vía excretora. Consta de tres fases: la primera de llegada rápida del radiotrazador al riñón, la segunda de incorporación y tránsito intrarrenal del trazador y la tercera de excreción y eliminación.

Fig. I.13- Renograma isotópico normal (Radioactividad renal en cuentas por minuto). La 1ª fase es de ascenso rápido (llegada al riñón), la 2ª de ascenso más lento (concentración) con un pico de máxima actividad, y la 3ª es de descenso (eliminación).



5.3-Radiología convencional, angiografía, US y TAC.

Estudios recientes han demostrado que la valoración del patrón nefrográfico en la UIV fracasa en el intento de identificar las causas individuales de fallo renal (Keeton y Pillay 1986).

La angiografía puede ser un método valorable para eliminar las causas renal o venosa como etiologías del fallo renal (Fig I.14).

Entre los métodos de imagen, se considera que la ecografía debe ser prioritariamente utilizada para estudiar los riñones no funcionantes o pobremente funcionantes. El tamaño y configuración renal quedan muy bien definidos ecográficamente (Fig. I. 15).

Fig. I.14- Arteriografía renal de riñón izquierdo humano tumoral. Se aprecia un polo superior sano, mientras que los tercios medio e inferior están sustituidos por una masa hipocaptante con vasos anárquicos neoformados.

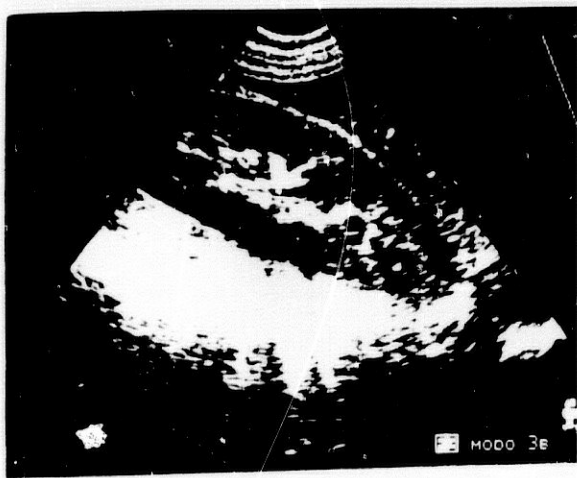


Fig. I.15- Ecografía renal en un adulto normal. Corte longitudinal. se aprecia el parénquima renal moderadamente ecogénico bien delimitado del seno renal, mucho más ecogénico (brillante).

El TAC puede usarse cuando las limitaciones técnicas, como gas en el intestino o la interposición ósea, impiden una exploración ecográfica adecuada. En el curso del examen por TAC, la administración de contraste permite una aproximación al conocimiento de la funcionalidad renal. Además, la visualización simultánea de ambos riñones facilita su comparación (Putman y Ravin 1988) (Fig. I.16).

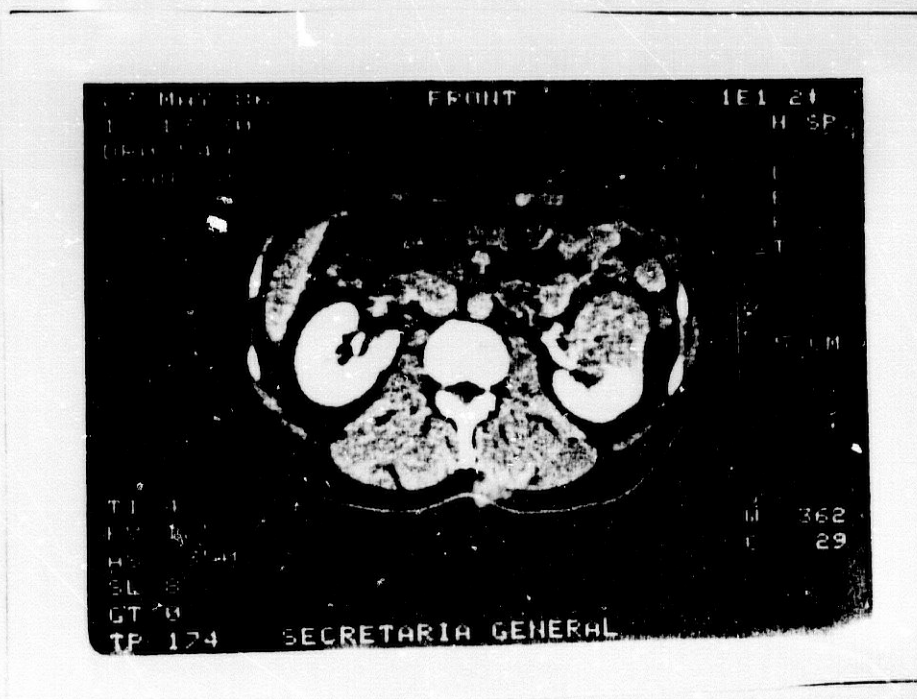


Fig. I.16- TAC. Corte axial del abdomen tras la administración de contraste. Se aprecia un riñón derecho normal, mientras que en el izquierdo existe una masa hipocaptante.

5.4- IRM y ERM.

La situación de los riñones en una zona poco influenciada por los movimientos respiratorios y la presencia de grasa peri y pararenal que los delimita, permiten a la IRM una perfecta visualización de su anatomía sin necesidad de contraste (Gómez González y cols 1990).

Así como en TAC, o en radiología convencional, el único parámetro a valorar es el coeficiente de atenuación de los rayos X (Hendee 1983), y en ecografía la absorción y reflexión tisular de las ondas sónicas (Wells 1982), en IRM tenemos tres parámetros básicos: Densidad de Protones (D), Tiempo de Relajación Longitudinal (T_1) y tiempo de Relajación Transversal (T_2).

La técnica más usada en la clínica es la de spin-eco (Crooks y cols 1983) que permite obtener imágenes potenciadas en T_1 o en T_2 (Orthendahl y cols 1984). Como los tiempos de relajación son proporcionales al contenido acuoso tisular (Cameron y cols 1984) y la intensidad de la señal depende, aparte de la densidad de protones, de los tiempos de relajación, ésta será más intensa (color blanco) cuanto más largo sea el T_2 (Directamente proporcional) o más corto sea el T_1 (Inversamente proporcional) (Kjos y cols 1985). Por esta razón, el riñón, con mayor contenido acuoso a nivel medular, se comporta, en IRM, del siguiente modo (Terrier y cols 1987):

- Imágenes potenciadas en T_1 (Fig I.17):
- *Medular hipointensa (T_1 largo)
- *Córtex intenso (T_1 más corto)



Fig. I.17- Imagen de riñón de conejo potenciada en T_1 . Corte axial. La medular es hipointensa con respecto al córtex. La médula externa tiene una intensidad intermedia.

- Imágenes potenciadas en T_2 (Fig. I.18):
- *Medular muy intensa (T_2 largo)
- *Córtex hipointenso (T_2 más corto)

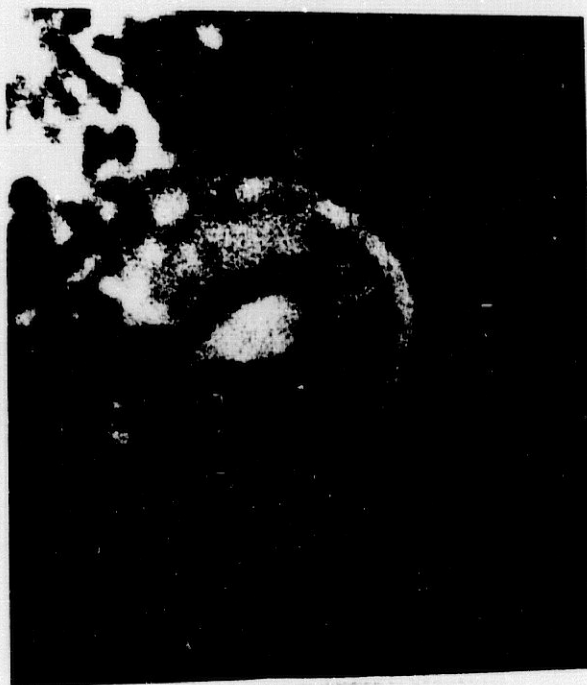


Fig. I.18- Imagen potenciada en T_2 de riñón de conejo. Corte axial. La médula es hiperintensa con respecto al córtex. La médula externa tiene intensidad intermedia.

En el animal, las imágenes potenciadas en T_2 son las que proporcionan mayor contraste corticomedular. En el hombre, en cambio, son las imágenes potenciadas en T_1 las que proporcionan mayor información, debido a que las diferencias en el T_2 cortical y medular son menores (Capdevila y Sanz Marín 1988).

Por lo que a la ERM se refiere el desarrollo de imanes superconductores de sonda ancha ha permitido la obtención de espectros de ^{31}P *in vivo* y la detección de niveles de metabolitos fosforados que pueden monitorizarse durante estudios fisiopatológicos (Gadian 1982). El ^{23}Na es muy sensible a la resonancia magnética y como se encuentra abundantemente distribuido en la economía se ha utilizado, con profusión, en estudios ERM. Su uso en espectroscopia sería, sin embargo, ineficaz sin la posibilidad de alterar con agentes exógenos su "chemical shift" del pool extracelular, mientras se mantiene invariable el pool intracelular (Wolf y Balaban 1990).

El ^1H es aún más sensible y abundante. Su utilidad y la complejidad de los espectros que genera han conferido al ^1H el mayor potencial, aún por explotar, en las posibles aplicaciones clínicas de la espectroscopia de resonancia magnética (Bottomley 1989).

El ^{35}Cl se ha utilizado a nivel experimental para estudios de cuantificación del espacio extracelular (Gupta y cols 1989).

El ^{19}F , en combinación con el indicador cálcico fluorado intracelular 5 FBAPTA, se ha utilizado para medir el calcio libre intracelular en el riñón normóxico e isquémico (Metcalf y cols 1985).

El ^{87}Rb ha demostrado ser un buen indicador del contenido neto de K^+ intracelular y se utiliza con este propósito a causa de la baja sensibilidad de la ^{39}K RMN (Endre y cols 1989a).

El ^{13}C ha tenido pocas aplicaciones en el riñón. Estudia un amplio rango de desplazamientos químicos (sobre 300 p.p.m.) y proporciona señales estrechas. Ofrece la posibilidad de monitorizar sustratos exógenos enriquecidos con ^{13}C (Gadian 1982).

6-FENOMENOS ISQUEMICOS EN LA FISIOPATOLOGIA RENAL.

6.1-Importancia de la isquemia en la fisiopatología renal.

El fenómeno isquémico juega un papel importante en la fisiopatología de múltiples afecciones renales, a saber:

1-En el fallo renal agudo, junto a la obstrucción y rotura tubular, suele producirse una vasoconstricción de las arteriolas aferentes glomerulares, lo que conlleva a una disminución del flujo renal del orden del 25-50% (Myers y Moran 1986). En el fallo renal crónico el déficit circulatorio, más o menos acusado, suele ser sostenido (Moran y Myers 1985).

2-En la hipertensión de causa vasculorrenal, el mecanismo patofisiológico común es la caída de la presión de perfusión renal y, por tanto, de la cuantía del filtrado glomerular (Novick y cols 1987; Webb y Talner 1979).

3-En el trasplante renal, uno de los factores que limitan la viabilidad del órgano es el inevitable periodo de isquemia existente entre la muerte del donante y el momento del implante (Sumpio y cols 1984).

4-Se han descrito, por último, en la patología renal alteraciones isquémicas localizadas (la necrosis cortical aguda, la necrosis papilar y el infarto lobar, entre otras), todas ellas debidas a alteraciones isquémicas en localizaciones intrarrenales concretas (Goergen y cols 1981; Hare y Poynter 1974; Poynter y Hare 1974).

6.2-Contribución de los métodos diagnósticos actuales al conocimiento y detección de los fenómenos isquémicos renales.

La determinación del grado de isquemia renal en situaciones concretas de enfermedad, por métodos no invasivos, constituye un procedimiento de gran utilidad clínica (Ruiz Santiago y cols 1989). Hasta ahora la aproximación sistemática al diagnóstico radiológico de las enfermedades del parénquima renal se ha basado en la observación del impacto que éstas producen sobre el tamaño y contorno renal, la uni o bilateralidad del proceso y en elementos urorradiológicos secundarios tales como morfología papilar y calicular, espesor parenquimatoso, nefrograma, calcificación, valores de atenuación en TAC, ecogenicidad en ultrasonidos (US) y otros (Davidson 1985; Chapman y Nakielmy 1984). Por otro lado, la mayor parte de esta información se obtiene tras la administración de medios de contraste radiológicos (UIV, TAC contrastado, arteriografía, arteriografía por sustracción digital (ASD)), o bien de trazadores radiactivos (TIS) (Bertolez y Pedrosa 1986).

¿Qué nos aportan, podemos preguntarnos ahora, los métodos diagnósticos actuales en el conocimiento de la fisiopatología y funcionalidad renal?

1-El fallo renal agudo se clasifica según su patogénesis en tres categorías: prerrenal, intrarrenal y postrenal (Pimentel 1986).

a) El fallo prerrenal es el resultado de una perfusión disminuida. El diagnóstico debe ser clínico, ya que si se requiere una evaluación radiológica la administración de contraste puede ser nefrotóxica por su escasa eliminación (Davidson 1985).

b) El fallo postrenal resulta de la obstrucción al flujo de orina, con aumento retrógrado de la presión intraluminal y disminución del flujo plasmático glomerular. En esta situación la sensibilidad diagnóstica del US se aproxima al 100% salvo en tres situaciones (Talner y cols 1981):

b₁) En la obstrucción precoz sin dilatación de la vía excretora.

b₂) Cuando existe un cálculo que oscurece la visualización del hilio renal.

b₃) En la obstrucción crónica asociada a fallo renal agudo donde no existe pielocaliectasia a causa de la baja producción urinaria.

La IRM puede detectar la hidronefrosis, pero no está claro que ofrezca ventajas sobre los US (Mconk y Hricak 1984). No obstante, la hidronefrosis no obstructiva puede producir falsos positivos de obstrucción con los US, lo que disminuye la especificidad de éstos. Con IRM se ha comunicado

que en caso de hidronefrosis obstructiva existe una pérdida de la diferenciación corticomedular que no se produce en el tipo no obstructivo. La IRM resulta, por ello, más sensible que el TAC en la detección de esta patología (Hricak y Willians 1984). Esto es muy importante ya que es posible la reversibilidad del fallo renal agudo asociado a uropatía obstructiva no dilatada mediante nefrostomía percutánea aunque el TAC o los US no detecten anomalía (Naidich y cols 1986). El renograma isotópico con diuréticos también puede ser útil en el esclarecimiento del dilema hidronefrosis obstructiva/no obstructiva.

c) En el fallo parenquimatoso renal de tipo agudo existe generalmente una afectación bilateral con riñones grandes y de contorno liso, al contrario que en el fallo crónico que se asocia a riñones pequeños (Davidson 1985).

La iconografía actual (UIV, US, TAC, IRM) es poco específica en cuanto al diagnóstico etiológico, requiriéndose de la biopsia con aguja para un diagnóstico preciso, especialmente en el fallo agudo potencialmente reversible (Pimentel 1986). Muchos autores piensan, hoy, que la RMN puede jugar un importante papel en la enfermedad médica renal (Hricak y cols 1983; Young y cols 1982). Estas posibilidades residen en la medición de los tiempos de relajación y del contraste corticomedular (Sanz Marín y Gili Planas 1984). La pérdida del contraste corticomedular es un elemento sensible, pero no específico, de enfermedad médica renal, siendo más fiable el cálculo de los tiempos de relajación. De hecho, la presencia de un buen contraste corticomedular no excluye una función renal deteriorada (Terrier y cols 1986).

En modelos animales de fallo renal agudo por ligadura del pedículo vascular renal de la rata se ha demostrado una fase inicial de acortamiento de los tiempos de relajación en

el córtex renal debida a la ausencia de flujo sanguíneo. Este efecto, que podría ser diagnóstico, es contrarrestado en pocas horas por el desarrollo de edema isquémico. Concluyen los autores que , actualmente, el diagnóstico exacto de la isquemia renal requiere el uso de contrastes paramagnéticos (Terrier y cols 1987).

2-En la hipertensión renovascular, el flujo sanguíneo renal, reducido, produce una disminución de la masa renal debido a atrofia tubular (Bookstein y cols 1972). Con el desarrollo de técnicas quirúrgicas para la corrección de las causas renovasculares existe gran interés en su diagnóstico. La ASD debe usarse como procedimiento de elección para el examen selectivo de pacientes seleccionados por hipertensión renovascular (Smith 1982). En las estenosis susceptibles de curación quirúrgica la determinación selectiva de reninas en la vena renal resulta predictiva en un 90% (Dsouza 1978). No existe actualmente ninguna técnica que sustituya a estos procedimientos invasivos.

En modelos experimentales animales se ha investigado la capacidad de la IRM para detectar alteraciones provocadas por la isquemia renal inducidas mediante estenosis de la arteria renal. Se ha comunicado una disminución del T₁ medular y un adelgazamiento de la banda medular externa (Mitchell y cols 1988), pero estos resultados son difícilmente extrapolables al hombre, cuyo riñón es distinto al del animal en múltiples aspectos (McAffe y Subramanian 1983).

3-La isquemia renal está comúnmente asociada a la nefrectomía en cadáveres y al almacenamiento en frío del riñón para trasplante (Goldszer 1983). Aunque la viabilidad renal es difícil de cuantificar, se reconoce que es inversamente proporcional a la intensidad del insulto isquémico.

La estabilidad de la membrana y matriz mitocondrial medido por microscopía electrónica (Trump 1976), así como el ensayo de fosfato de adenina intracelular (Humes y Weinberg 1983), se correlacionan con la integridad de las vías metabólicas y pueden predecir la viabilidad renal (Feinberg 1982). Sin embargo, ambos procedimientos no resultan útiles en la práctica clínica (Nunanly 1983) y en la actualidad no existe método no invasivo alguno para la valoración de la competencia metabólica del riñón a trasplantar (Jacobsen y Pegg 1981). Tampoco existe un método preciso para el análisis de las complicaciones postrasplante. La presencia de buen contraste corticomedular en IRM no excluye, en efecto, el deterioro de la función renal (Terrier y cols 1986).

Varios autores coinciden en que el sistema US Doppler es muy útil en la detección del rechazo renal y constituye el método de screening ideal para los pacientes trasplantados (Baumgartner y cols 1986). Desafortunadamente, la similitud de imágenes obtenida en situaciones de rechazo, necrosis tubular y otro tipo de disfunciones (Needleman y Kurtz 1987), limitan su valor. Así, un US-Doppler anormal constituye una indicación absoluta para biopsia renal.

Por otra parte, en pacientes sometidos a trasplante renal, además de la distinción entre las distintas causas de disfunción, sería muy importante un diagnóstico precoz de rechazo, previo a la evidencia clínica, lo que incrementaría la eficacia terapéutica (Halasz 1986). Hoy no existe método válido para este diagnóstico precoz. La IRM no es la respuesta, pero quizás la ERM pueda proporcionar este tipo de información.

4-Uno de los retos de la IRM reside en la distinción entre las distintas masas renales (Moonk y Hricak 1984). Damadian fue el primero en sugerir que los tiempos de relajación están prolongados en los tumores malignos

(Damadian 1971). En general, aunque no siempre, esta afirmación es correcta. Estudios posteriores han reconocido unos méritos similares al TAC y a la IRM en el diagnóstico y estadiaje de los tumores renales (Fein y cols 1987). No obstante, en lesiones menores de 3 cms el TAC se ha mostrado más sensible (Hricak y cols 1988), por lo que la IRM no se recomienda como la primera modalidad diagnóstica en la búsqueda de neoplasias renales. En la valoración del quiste renal complejo, hemorrágico o infectado, la posibilidad de informar sobre la composición del fluido basada en la intensidad de la señal y los tiempos de relajación proporciona, en cambio, alguna ventaja a la IRM sobre el TAC o los US (Moon y Hricak 1984).

6.3-Aportaciones de la ERM al conocimiento de los fenómenos isquémicos renales.

Al igual que en otros órganos, el desarrollo de la espectroscopia renal por RMN se ha producido utilizando como elemento de estudio el sistema ^{31}P -RMN (Fig. I.19). El estudio mediante ^1H -RMN constituye un procedimiento aún sin explotar, en el que la mayoría de los cambios patológicos detectables se encuentran pendientes de realización (Aisen y Chenevert 1989).

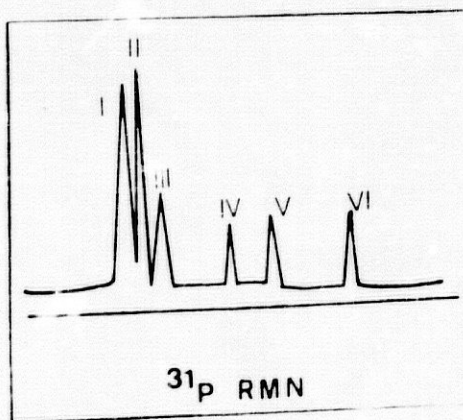


Fig. I.19- Representación esquemática de un espectro de ^{31}P . I- Azúcar II- Fósforo inorgánico (Pi) III-Glicerofosforilcolina (GPC) IV- ATP γ + ADP B V- ATP α + ADP α VI- ATP β .

En el análisis ^{31}P -RMN los cambios bioquímicos asociados a la isquemia renal, en diferentes situaciones de fallo renal, ajustan con la siguiente descripción:

a) En modelos experimentales de fallo prerrenal, provocados por deshidratación en el conejo, el estudio con ^{31}P -RMN demuestra que la concentración de ATP no se altera significativamente, pero que se produce un incremento considerable de un pico que resuena en la región fosfodiéster (Shapiro y cols 1989), probablemente debido al aumento de los fosfodiesteres renales relacionados con los cambios de osmolaridad inducidos por esta perturbación fisiológica (Sagnasco y Balaban 1986). La glicerofosforilcolina (GPC) es el principal fosfodiéster renal (Wirthenson y cols 1987) y su elevación se ha demostrado en el tejido renal extraído de ratas sometidas a deshidratación (Shimassek y cols 1959). La GPC forma parte junto a la betaina del grupo de las trimetilaminas, y éstas a su vez junto a los polioles (inositol y sorbitol) y aminoácidos del grupo de sustancias denominadas OSMOLITOS, término utilizado para describir solutos orgánicos activos osmóticamente, presentes en gran concentración en la médula renal interna (Beck y cols 1984). Los osmolitos contrarrestan los efectos de elevadas concentraciones de urea y sales inorgánicas que conducirían, de otro modo, a la interrupción de múltiples procesos enzimáticos (Yancey y cols 1982).

La ^1H -RMN ofrece la posibilidad de estudiar de modo independiente estos osmolitos. Un trabajo reciente en ratas indica que las trimetilaminas y los polioles aumentan durante la deshidratación y como quiera que la complejidad de las interacciones es elevada es probable que intervengan en su regulación factores distintos a la simple osmolaridad (Gullans y cols 1988).

b) El diagnóstico de fallo postrenal no plantea problemas a los US o al renograma con diuréticos. No obstante, en modelos animales de obstrucción ureteral estudiados mediante ^{31}P -RMN y gammagrafía con Tc-DMSA se ha comprobado que no existe una estrecha relación entre viabilidad funcional y viabilidad celular, ya que una marcada disminución de la función tubular renal, medida por gammagrafía, no se correlaciona con un sustancial decremento del ATP, medido por ^{31}P -RMN (Vigneron y cols 1988). La anomalía detectada en espectro de ^{31}P es el crecimiento de un pico en la región fosfodiéster, que no se acompaña de un incremento de estos compuestos en las mediciones hechas en los extractos tisulares y sí de una elevación del Fósforo Inorgánico (Pi) (Shapiro y Chan 1987b). La correlación, pues, entre el tamaño del pi / la concentración de Pi hace pensar que éste último sea el responsable de los cambios espectrales, atribuyéndose su posición anómala en el espectro al bajo pH de la orina (Shapiro y cols 1989). No está aún claro si el incremento de Pi se debe a un exceso en su producción o al acúmulo originado por el éstasis urinario (Shulman y cols 1984). En cualquier caso, su reversibilidad tras la desaparición de la causa etiopatogénica que lo modifica si parece ligada a la reabsorción del mismo por el segmento distal de la nefrona (Mizgala y Qamme 1985).

La aparente ausencia de correlación existente entre función renal y viabilidad celular plantea un serio problema a la hora de considerar la corrección quirúrgica de la uropatía obstructiva. Teóricamente, la demostración de la integridad funcional de las células tubulares renales (Guillenwater y cols 1975) en condiciones de flujo sanguíneo renal disminuido debe estar asociada con ciertos cambios metabólicos que, detectados por espectroscopia RMN, pueden ser decisivos para sugerir la corrección quirúrgica de la obstrucción.

c) En el fallo parenquimatoso de tipo isquémico la ^{31}P -RMN evidencia una disminución del ATP y un incremento del Pi (Stubbs y cols 1984), mientras que en el fallo de causa nefrotóxica no se producen alteraciones espectrales, lo que indica, en este último caso, un conjunto de cambios no asociados a la depleción del ATP (Chan y cols 1982b).

Estudios del comportamiento iónico en la isquemia renal mediante espectroscopia de ^{23}Na , ^{87}Rb y ^{19}F han demostrado un incremento del Ca^{++} y del Na^+ intracelular, así como un decremento del K^+ (^{87}Rb) provocados por el insulto isquémico (Allis y cols 1989; Gupta y cols 1989). En cambio, la posibilidad de medir lactato y aminoácidos en la isquemia renal, objetivo fundamental de esta Tesis, se encuentra aún por realizar.

d) No hemos encontrado estudios sobre espectroscopia en la hipertensión renovascular.

e) En el trasplante renal las alteraciones isquémicas estudiadas por espectroscopia son similares a las producidas en el fallo renal parenquimatoso de origen isquémico.

f) La espectroscopia de RMN puede detectar la existencia de diferentes estados metabólicos entre tejido tumoral y tejido normal. Estudios preliminares en modelos animales mediante ^{31}P -RMN han demostrado la aparición de espectros distintos, que se modifican en horas tras la radioterapia y/o quimioterapia (Evanochko y cols 1984a; Griffiths y cols 1981; Ng y cols 1982). Se ha sugerido, de este modo, la posibilidad de caracterizar el estado metabólico tumoral y predecir, por otra parte, la respuesta terapéutica. En efecto, Ross ha comprobado, en hipernefomas humanos la aparición de un pico de Pi que se modifica tras el tratamiento (Ross y cols 1984) y en situaciones de hipoxia se ha comprobado también que los tumores conservan mejor el

ATP que e tejido normal a causa de una mayor actividad glucolítica, confirmándose así observaciones previas (Aisenberg 1971).

Los estudios con ¹H-RMN son menos abundantes. En cultivos celulares tumorales se ha comunicado un aumento de la glicerofosforilcolina (Agris y Campbell 1982) y de glutamina (Navon y cols 1983) con la diferenciación celular. Se ha descrito también una menor rigidez mural de las células tumorales (Mountford y cols 1982), así como un incremento de la taurina en los extractos de tejidos neoplásicos. Pero, quizá, de mayor importancia es la observación de lactato, cuyos niveles proporcionan un método no invasivo para medir el estado glucolítico de estas células tanto *in vivo* como *in vitro* (Evanochko y cols 1984b).

En términos generales, puede decirse en relación con todo esto que las posibilidades diagnósticas de la espectroscopia en las alteraciones isquémicas localizadas dependen, en gran medida, del desarrollo de técnicas de localización espacial.

6.4- Modelos animales de fallo renal isquémico por oclusión arterial.

En humanos se han descrito tres patrones de fallo renal agudo mediado hemodinámicamente:

1- El patrón A o abreviado, que consta de una fase de decremento de las funciones orgánicas tras el insulto isquémico y de una recuperación rápida sin fase intermedia de mantenimiento (Myers y cols 1984). Generalmente ocurre tras insultos isquémicos aislados después de cirugía cardiaca o de aorta abdominal (Moran y Myers 1985).

En ratas, este patrón se ha descrito tras 45' de clampaje de la arteria renal de animales uninefrectomizados. Aunque los hallazgos hemodinámicos están bien descritos no hemos encontrado referencias sobre las alteraciones bioquímicas subyacentes (Yagil y cols 1988).

2- El patrón B o evidente, que consiste en un abrupto decremento de la filtración glomerular seguido, previamente a la recuperación, por una fase de mantenimiento en que la proporción de filtración glomerular permanece profundamente deprimida durante días o semanas (Myers y cols 1980). Generalmente este patrón ocurre cuando el insulto isquémico precipitante se complica con una insuficiencia circulatoria prolongada.

En ratas, el citado patrón se ha descrito tras 60' de clampaje de la arteria renal y de sus hallazgos bioquímicos tampoco hemos hallado referencias (Finn 1980).

3-El patrón C o prolongado, que consiste en un fallo renal de mayor severidad, generalmente irreversible (Moran y Myers 1985), que suele ocurrir cuando el insulto isquémico se complica con episodios repetidos de hipotensión que interfieren la recuperación circulatoria.

En ratas, el tiempo de isquemia necesario para producir un fallo renal irreversible es distinto para diversos autores. Mientras unos lo fijan en 60' de clampaje, otros lo hacen en 90' (Sumpio y cols 1984). La determinación de este posible límite se encuentra fuera de nuestros objetivos, aunque puede ser un reto interesante para futuras investigaciones.

7-POSIBILIDADES DE LA 1H-RMN EN EL DIAGNOSTICO DE LA ISQUEMIA RENAL.

7.1-Hallazgos bioquímicos en la isquemia renal.

La isquemia en el riñón, al igual que en otros tejidos, produce una acusada disminución de los niveles tisulares totales de nucleótidos de adenina (TAN) y del ATP (Woods y Krebs 1973). Ahora bien, la relación existente entre la citada disminución, el mantenimiento de la función renal y su recuperación posterior tras el insulto isquémico no es bien conocida. La capacidad del riñón para resintetizar ATP tras la isquemia correlaciona bien, según algunos autores, con la viabilidad orgánica (Bore y cols 1979), idea que se ha reforzado al demostrarse un beneficio claro perfundiendo el riñón con infusiones de $MgCl_2$ -ATP (Chaudry y cols 1981). Sin embargo, estudios posteriores han puesto de manifiesto que perfusiones aisladas de ATP y de otros nucleótidos de adenina sin $MgCl_2$ no son útiles en la recuperación del insulto isquémico (Siegel y cols 1980). Ello, unido al hecho de que el riñón puede resistir, aparentemente, bajos niveles de TAN y ATP sin reducción apreciable de su función (Shapiro y cols 1987c) y que la reducción de dichos niveles, mediante mecanismos no isquémicos como la infusión de glicerol y fructosa, no se acompañaba de disfunción orgánica (Arnold y cols 1985), han contribuido a cuestionar el papel de los niveles tisulares de ATP en la recuperación isquémica. El potencial de fosforilación $ATP/ADP \times P_i$ parece reflejar más exactamente el estado energético tisular. Aunque, desafortunadamente, la única técnica capaz de monitorizarlos *in vivo*, la ^{31}P -RMN, es incapaz de valorar adecuadamente las bajas concentraciones de ADP (Stubbs y cols 1984).

En conclusión, la disminución de ATP parece no ser la causa inmediata de muerte celular, aunque algunos autores no excluyen que el ATP pueda ser utilizado como marcador de los disturbios metabólicos isquémicos (Ratcliffe y cols 1989). Así, en un modelo experimental de shock hemorrágico los cambios bioquímicos inducidos fueron principalmente disminución del ATP y acidosis tisular y sólo los animales que sufrieron estos cambios hicieron un fallo renal asociado (Ratcliffe y cols 1986). Por otra parte, en modelos de hipoxia pura se ha conseguido una depleción de ATP que parece correlacionar bien con el volumen de células lesionadas, sin que pudiese demostrarse acidosis tisular (Ratcliffe y cols 1988). Esto podría estar relacionado con la ausencia de incremento en la formación de amonio en riñones perfundidos a pH ácido en ausencia de sustrato (Bogusky y Dietrich 1989) y podría indicar la existencia de vías metabólicas distintas, con diferentes niveles de metabolitos, para los distintos modelos de fallo renal, de acuerdo con la conservación o no de un flujo sanguíneo adecuado y aporte de nutrientes sistémicos.

En principio, el fallo renal de tipo isquémico se inicia por un inadecuado aporte de O_2 . La susceptibilidad al insulto isquémico varía entre distintos segmentos de la nefrona probablemente por las diferencias normales existentes en el metabolismo energético en diferentes partes de la misma (Guder y cols 1986). Así, el metabolismo oxidativo suple casi todas las necesidades energéticas de los túbulos proximales, mientras que los túbulos distales dependen significativamente de la glucólisis (Cohen y Kaunin 1981). De aquí que el túbulo proximal sea más susceptible al insulto isquémico, especialmente su segmento distal (S_3) (Venkatachalan y cols 1978). Ligeras disminuciones de la perfusión pueden producir, por ello, lesiones isquémicas en áreas potencialmente susceptibles (Brezis y cols 1984), incluso en condiciones de máxima oxigenación (Balaban y Sylvia 1981).

En el shock hemorrágico, el ATP disminuye, precozmente, a la cuarta parte de su valor normal, lo que indica que la isquemia parcial puede deplecionar al riñón de los nucleótidos de elevada energía (Chaudry y cols 1974). La presión sanguínea a la que se produce dicha disminución es muy variable aunque, en general, suele ser drástica. La vasoconstricción generalizada que acompaña al shock (elemento crítico para comprender el fallo), requiere, para su comprobación, mediciones *in vivo* del flujo sanguíneo y de la extracción de O_2 . Ello, aunque posible, es de difícil realización. La RMN puede, en cambio, advertir sobre el desarrollo del fenómeno vasoconstrictor (Thulborn y cols 1981). Efectivamente, la caída del ATP conlleva una elevación de los nucleótidos y nucleósidos de menor energía. De ellos, la adenosina, fácilmente detectable, es un conocido vasoconstrictor que puede incrementar la resistencia vascular en el fallo renal isquémico (Miller y cols 1978).

Consecuencia del insulto isquémico y el inadecuado aporte de O_2 , la necrosis celular se hace difusa en pocas horas de modo irreversible (Brandt y cols 1951). La naturaleza del locus intracelular responsable de este proceso, así como la base bioquímica de la distinta sensibilidad a la isquemia de diferentes partes del sistema tubular son desconocidos. Se cree que el proceso inicial que conduce a la destrucción celular es un incremento de la permeabilidad de la membrana (Shires y cols 1972) a la que contribuyen ciertos radicales libres tanto en el periodo isquémico como en la reperfusión (Schrier y cols 1984; Bayati y cols 1990), aunque hay algún trabajo que pone en duda el papel de la reperfusión (Gamelin y Zager 1988). Así, la entrada de Ca^{++} activa las fosfolipasas que degradan la bicapa lipídica de las membranas celulares incrementando su permeabilidad hasta la disrupción (Finkelstein y cols 1985). (Los subproductos lipídicos de esta degradación potencian el deterioro de la membrana (Humes y cols 1989)). Por otra

parte el Ca^{2+} intracelular altera la respiración mitocondrial disminuyendo la producción y deplecionando los depósitos de ATP (Mc Dougal 1988).

Finalmente, desde hace tiempo se sabe que, en la isquemia, tras dos minutos de clampaje del pedículo renal, se produce un incremento pronunciado de lactato y de glutamato y una disminución menos acentuada de glutamina y aspartato (Hems y Brosnan 1970), metabolitos que pueden ser fácilmente identificables por RMN. El incremento, en particular, de los niveles tisulares de glutamato contrasta con los cambios metabólicos subsiguientes a situaciones de acidosis respiratoria y metabólica con persistencia del flujo renal, en las que se ha comunicado una disminución de tales metabolitos (Kovacevic y Mc Givan 1983).

En otros modelos de fallo renal agudo como el nefrotóxico los cambios bioquímicos son distintos y su significado incierto. Unos resultan indicativos del insulto inicial, mientras que otros pueden hacer referencia, sencillamente, al daño celular precoz (Brenner y Rector 1981).

7.2- Méritos relativos de la Espectroscopia ^1H -RMN "versus" la ^{31}P -RMN.

En RMN el ^1H es el núcleo más sensible y el que produce la mejor relación señal/ruido (aparte del tritio) en un momento dado (Gadian 1982). En la tabla I.3 se ofrece, a este respecto, la sensibilidad de algunos núcleos utilizados en espectroscopia en relación con la del protón.

TABLA I.3- SENSIBILIDAD DE DISTINTOS NÚCLEOS UTILIZADOS EN ESPECTROSCOPIA CON RESPECTO AL PROTON.

Núcleo	sensibilidad para un	sensibilidad para un
	mismo nº de núcleos	mismo volumen de tejido
^1H	100	100
^{13}C	1,6	0,02
^{19}F	83	0,006
^{23}Na	9,3	0,1
^{31}P	6,6	0,1

Con respecto al ^{31}P (el núcleo más usado en la actualidad) la relación señal-ruido es 15 veces mayor y la reducción en el tiempo de adquisición de señal es de 227 veces (Bottommley y cols 1985). Los espectros ^1H -RMN pueden detectar, por ello, metabolitos importantes de la ruta glucolítica, ciclo del citrato y reacciones anexas tales como la glucosa, lactato, glutamato, glutamina, alanina, aspartato y otros (Aisen y Chenevert 1989).

Estas resonancias han sido detectadas en cerebro de animales (Cerdán y cols 1985), en corazón (Urgubil y cols 1984) y músculo (Williams y cols 1985) fundamentalmente. El riñón ha sido, en cambio, un órgano escasamente estudiado con esta técnica (Weiner 1986b).

Entre los inconvenientes de la ^1H -RMN hay que destacar en primer lugar la elevada concentración del pico del agua (55 M) que si bien hace posible realizar estudios de imagen, dificulta la observación de metabolitos en niveles de concentración propios de los sistemas vivos ($\leq 5\text{mM}$) (Fig. I.20) (Gadian 1982). Por esta razón, los estudios en muestras biológicas se realizan frecuentemente utilizando D_2O como

disolvente en lugar de H_2O . Recientemente, se han desarrollado métodos que eliminan la señal acuosa por saturación (Behar y cols 1983; Brooks y cols 1984; Clore y cols 1983; Hore 1984). Bajo ciertas circunstancias, estos métodos son tan efectivos que hacen innecesario el reemplazamiento de H_2O por D_2O (Hore 1983).

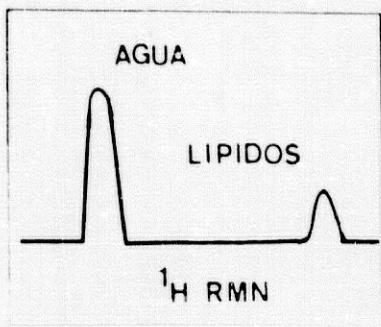


Fig. I.20- Dada la mayor abundancia del agua y de los lípidos en los tejidos corporales, un espectro 1H RMN revela con frecuencia dos picos en los que se hallan sumergidos metabolitos mucho menos abundantes.

Un segundo problema viene dado por la complejidad de los espectros debida a la ubicuidad de los átomos de hidrógeno dentro de las moléculas biológicas. Ello comporta la superposición de las señales de múltiples componentes y dificulta su interpretación (Fig. I.21) (Gadian 1982). Por esta razón, los experimentos RMN deben estar respaldados por procedimientos adicionales de identificación.

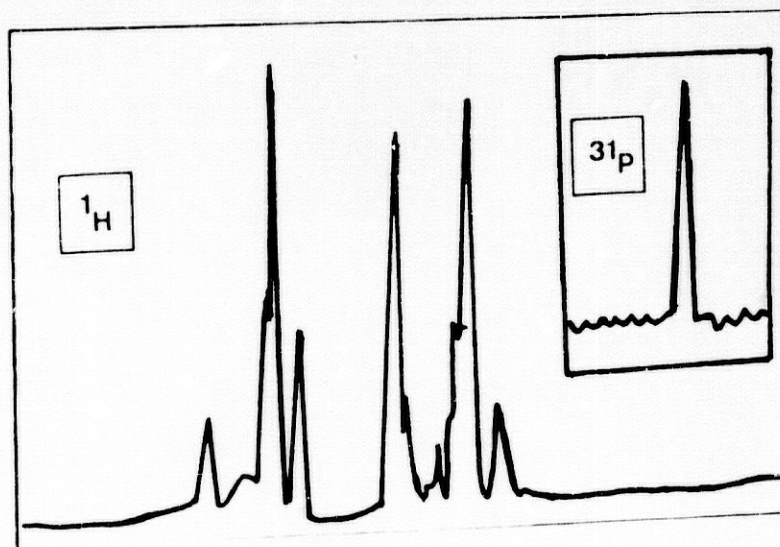


Fig. I.21- Representación esquemática de los espectros de la glucosa-5-fosfato en protones y en ^{31}P (recuadro). Comparese la complejidad del espectro de protones con respecto al de ^{31}P .

La superposición más problemática se produce en el desplazamiento químico de los lípidos y del lactato (Behar y cols 1983; Urgubil y cols 1984). En algunos órganos, la citada superposición es acusada. En otros, como por ejemplo el cerebro y el tejido muscular el problema es pequeño (Bottomley y cols 1985), ya que la señal lipídica es reducida (Matson y Weiner 1988), probablemente por la escasa motilidad de los lípidos de las membranas celulares, lo que conlleva un gran acortamiento del T_2 (Bottomley y cols 1984b).

En la actualidad disponemos de técnicas para la observación de metabolitos sin la interferencia de señales acuosas y lipídicas (Graaf y cols 1988).

7.3- Situación actual de la espectroscopia ^1H -RMN en el estudio de los fenómenos de isquemia y fallo renal.

El estudio de los niveles de aminoácidos y de lactato mediante ^1H -RMN en el fallo renal agudo aún no ha sido publicado. Los trabajos en riñón con esta técnica son reducidos en número (Bagnasco y cols 1986; Berkowitz y cols 1988; Endre y Kuchel 1985; Gullans y cols 1989; Wolf y Balaban 1987a) y, por lo general, consisten en análisis incompletos, básicamente centrados en el estudio de los osmolitos renales (Trimetilaminas y Polioles), sustancias que se incrementan con la deshidratación (Gullans y cols 1988) y probablemente también se modifiquen con la isquemia.

Los anteriores compuestos, fácilmente detectables con ^1H -RMN, pueden convertirse en verdaderos marcadores de los cambios metabólicos consecutivos a la isquemia renal si su determinación se realiza de una manera más rápida y eficaz que la de ATP mediante ^{31}P -RMN. De esta manera, si a la ^1H -RMN se une la información anatómica aportada por la IRM, junto con el desarrollo de técnicas de localización espacial, quizás estemos iniciando el camino de las aplicaciones clínicas de la espectroscopia RMN.

Como por otra parte, el estudio de los núcleos más interesantes en espectroscopia (^1H , ^{13}C , ^{31}P) no es excluyente y la información que proporciona uno es perfectamente compatible con la que suministra, simultáneamente, otro (Styles y cols 1979), no debe descartarse que la complementariedad que muestran los distintos tipos de espectroscopia derive, antes o después, en un avance clínico importante.

8- RESUMEN.

Actualmente, mientras la Imagen por Resonancia Magnética (IRM) ha tenido una amplia difusión clínica, la Espectroscopia por Resonancia Magnética (ERM) continúa siendo una técnica de investigación en la que la mayor parte de los estudios de espectroscopia *in vivo* han consistido en la utilización de la ^{31}P -RMN para la detección de fosfatos de alta energía.

Dada la gran abundancia de hidrógeno en las estructuras celulares de los seres vivos parece evidente que el estudio de metabolitos hidrogenados mediante ^1H -RMN constituye un amplio campo de investigación con importantes derivaciones clínicas por evaluar.

Aunque existen publicaciones sobre espectroscopia ^1H -RMN *in vivo* de cerebro humano, en el riñón sólo se han comunicado algunos resultados experimentales obtenidos en animales con un análisis insuficiente de los espectros. La mayoría de los cambios metabólicos consecutivos a procesos patológicos renales, susceptibles de análisis por ^1H -RMN, se encuentran en fase de identificación.

Nos ha parecido interesante, por lo tanto, iniciar una línea de investigación basada en la obtención y análisis de espectros ^1H -RMN en extractos tisulares de riñón de rata, tanto en normoxia como en diferentes situaciones de isquemia y ello, no sólo porque de la información obtenida se pueda conseguir un mejor conocimiento del funcionalismo renal, sino porque el análisis espectral ^1H -RMN sobre extractos tisulares puede hacer posible una mejor comprensión de futuras experiencias *in vivo* en donde la combinación ERM-IRM puede rendir óptimos resultados.

II- OBJETIVOS.

II-OBJETIVOS.

La posibilidad de obtener información metabólica renal *in situ*, en condiciones experimentales que simulan determinados estados de enfermedad, mediante Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (ERM) y la sensibilidad que, a tal fin, ofrecen los núcleos de hidrógeno constituyen los pilares sobre los que asienta el presente trabajo de investigación cuyos objetivos más importantes se pueden resumir así:

1- Revisión de las aplicaciones de la ERM en el estudio del riñón en circunstancias normales y patológicas.

2- Detección, mediante ^1H RMN, de los cambios bioquímicos esenciales inducidos por la isquemia aplicada sobre el tejido renal.

3- Identificación, en los extractos tisulares renales, de los metabolitos responsables de los citados cambios.

4- Comparación de los hallazgos suministrados por la ^1H RMN con los obtenidos mediante espectroscopia de otros núcleos, en condiciones experimentales similares, y definición consecuente de las posibilidades de la espectroscopia de protones en la caracterización bioquímica de estados de enfermedad bien determinados.

5- Apertura de nuevas vías para el estudio de la patología renal y, por extensión, de otros órganos.

III- MATERIAL Y METODOS.

1- MATERIAL.

1.1- ESPECIE ENSAYADA.

Los experimentos se han realizado en ratas de raza Wistar, de peso comprendido entre 200 y 300 gramos, alimentadas con dieta standard que fueron suministradas por el servicio de animales de la Universidad de Granada.

1.2- INSTRUMENTACION Y TECNICAS UTILIZADAS.

El espectrómetro de RMN utilizado pertenece a los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada. Es un espectrómetro Bruker AM-300 dotado de un imán superconductor de 7 Tesla, que induce frecuencias de resonancia de los núcleos protónicos del orden de 300 MHz. El tubo de recepción de muestras para el análisis espectroscópico tiene 5 mm de calibre. El equipo trabaja preferentemente con muestras disueltas en solventes deuterados.

Hemos utilizado, así mismo, un sistema HPLC perteneciente al servicio de Análisis Clínicos de la Ciudad Sanitaria Virgen de las Nieves, consistente en un cromatógrafo Beckman 342, formado por un módulo programador de gradientes Altex 420 que actúa sobre dos bombas dosificadoras Altex 112, capaces de mantener flujos entre 0,01 y 10 ml/min y una columna cromatográfica Beckman Ultrasphere ODS RP-18 de 250 x 4 mm.

Como liofilizador se utilizó el sistema existente en el Departamento de Fisiología Animal del Centro Experimental del Zaidín. Es de la marca FTS Systems Inc, distribuido por la casa Giralt.

Las pesadas se realizaron en balanza Mettler H35 AR.

Para la medida de pH se utilizó un pH-metro de la marca Orion, provisto de un agitador magnético Selecta.

La homogeneización tisular se realizó en primer lugar fragmentando la pieza congelada con un martillo hermético de acero inoxidable. Posteriormente, una vez mezclado el tejido con los distintos reactivos, se procedió a su homogeneización en un homogeneizador eléctrico de la marca Braun.

Las centrifugaciones en frío a gran velocidad se realizaron con centrifugas refrigeradas Beckman L8-70 y Beckman TJ-6.

Se utilizó un espectrofotómetro para la determinación de proteínas de la marca Beckman, Modelo 34. El espectrofotómetro para la determinación enzimática del lactato es un Beckman DU-70.

El baño de alcohol y el desgasificador ultrasónico empleados fueron de la marca Selecta.

Las pipetas utilizadas pertenecieron a las marcas Eppendorf, B-D Life Sciences y Pasteur CEB.

En la técnica del congelado instantáneo se empleó un contenedor de Nitrógeno líquido de la marca Champigny y termos auxiliares para el transporte de las muestras. Las pinzas de "Freeze Clamping" fueron de acero inoxidable y conformación reniforme al objeto de conseguir la mejor adaptación posible al riñón.

1.3-PRODUCTOS.

El fosfato sódico, el carbonato sódico, el tartrato sódico, el acetato sódico, el hidróxido sódico, el hidróxido potásico, el sulfato de cobre, el ácido clorhídrico y el fenol fueron suministrados por Merk (Darmstad, Alemania).

El ácido bórico, el 2-mercaptoetanol, el SDS (Dodecil sulfato sódico), el ácido cisteico, la LDH, el NAD, el lactato y los aminoácidos (Ala, Ile, Leu, Val, Lis, Glu, Gln, Arg, Asp, Asn, Ser y Gly) empleados fueron obtenidos de la marca Sigma Chem. Co. St. Louis (USA).

El hidrato de hidrazina procedió de la firma BDH Chem LTD (Poole, Inglaterra).

El metanol, el tetrahidrofurano, el o-ptalaldehido se obtuvieron de la firma Scharlau (FIOSA, Barcelona, España).

El agua destilada fue de la marca Vitulia (Barcelona)

La Ketamina se obtuvo de Parke-Davis (Barcelona)

La heparina procedió de los laboratorios Leo (Madrid).

2- METODOS.

2.1- PROCEDIMIENTO QUIRURGICO.

Las ratas se anestesiaron con Ketamina intraperitoneal (10 mg por cada 100 gr de peso). A los dos-cuatro minutos se realizó una laparotomía media y el riñón izquierdo se expuso rápidamente. Una vez desbridado de sus adherencias se sometió a congelación instantánea por aplastamiento mediante una pinza de acero inoxidable previamente sumergida en nitrógeno líquido. El pedículo renal se clampó simultáneamente para evitar pérdidas hemáticas y el riñón derecho se expuso a continuación para ser extraído por un procedimiento similar.

Para el estudio de los niveles metabólicos en normoxia hemos utilizado, sistemáticamente, el riñón izquierdo. Para la producción de isquemia a diferentes tiempos (2', 45', 60') hemos utilizado generalmente el riñón derecho mediante clampaje del pedículo renal. En las ocasiones en que usamos ambos riñones para el estudio de la isquemia, el riñón izquierdo fue sometido a un tiempo de clampaje menor que el derecho, fundamentalmente 2 minutos al riñón izquierdo y 45 o 60 minutos al riñón derecho. En todos los casos, tras la extirpación del riñón izquierdo se obtuvo una muestra sanguínea por punción directa de la aorta abdominal. Con niveles de pH inferiores a 7,38 la muestra se desechó automáticamente.

Para la producción de la acidosis respiratoria en el animal hemos utilizado una bolsa hermética, de cuello elástico de unos 50 cc de volumen, en la que se introdujo la cabeza de la rata durante siete minutos. Transcurrido dicho tiempo el riñón izquierdo se sometió a congelación y se obtuvo una muestra de sangre de la aorta abdominal para gasometría y estudio del contenido aminoácido.

2.2- TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

Hemos ensayado dos métodos de preparación del extracto tisular: uno, más clásico, el extracto en ácido perclórico y el segundo, posiblemente más fisiológico, en que el tejido se mezcló exclusivamente con tampón fosfato a pH 7,4.

A) EXTRACTO PERCLORICO.

Se ha realizado una variante del método descrito por Lowry y Passonneau (1972). En síntesis esta variante consiste en lo siguiente: el tejido congelado a la temperatura del nitrógeno líquido se fragmenta mediante un martillo hermético de acero inoxidable. La "torta" resultante, bañada en nitrógeno líquido, se tritura después en un mortero de cerámica y se vierte, con posterioridad, en un tubo con 3 volúmenes de ácido perclórico 3 M congelado. El tubo se transfiere, finalmente, a un baño de alcohol a la temperatura de -10°C y se agita durante 5'-15' hasta que el ácido penetra completamente el tejido.

Cuando se estuvo seguro de que no quedaba tejido congelado, se añadió 1 ml de H_2O por cada 0,3 ml de HClO_4 y la muestra se sometió a agitación a 4°C durante 5'-10', centrifugando posteriormente a 10.000 revoluciones durante 10'. El sobrenadante obtenido se neutralizó, por último, con una mezcla conteniendo 2 N de KOH y 0,4 M de ClK, en una proporción de 0,3 ml por ml de extracto, dejando la solución tamponada a pH 7,4.

B) EXTRACTOS EN TAMPON FOSFATO.

Hemos empleado una variante del método empleado por Dwyer y cols (1987) para el análisis de aminoácidos, en la siguiente forma:

El tejido renal congelado a la temperatura del nitrógeno líquido se fragmenta mediante un martillo hermético de acero inoxidable, tras lo cual los fragmentos obtenidos se mezclan con diez volúmenes de tampón fosfato 0,05 M a pH 7,4 y a la temperatura de 4°C y se homogenizan después mediante 15 pases en un homogenizador eléctrico.

El homogenizado tisular se centrifuga posteriormente a 30.000 rpm durante 30' y el sobrenadante se desproteiniza por filtración a través de membranas de celulosa (Millipore UFPI-LGC 24, 10.000 MW).

C) PLASMA DE LAS RATAS ACIDOTICAS Y NORMOXICAS.

El plasma de las ratas sometidas a asfixia se obtuvo por centrifugación a 3.000 rpm durante 10 minutos y se estudió exclusivamente con HPLC para la determinación de aminoácidos y el cálculo de su relación con el contenido aminoacídico tisular.

2.3- ESTUDIO MEDIANTE HPLC.

En HPLC se han estudiado todas las muestras de tejido renal extraídas en tampón fosfato y el plasma de las ratas acidóticas y de aquellas en que obtuvimos el riñón normóxico. Como para su estudio en resonancia las muestras fueron previamente liofilizadas, también estudiamos de nuevo alguna de las muestras tras este procedimiento, comprobando que las pérdidas en el contenido de aminoácidos tras la liofilización resultaron inferiores al 5% .

La muestra filtrada o el plasma se analizó por HPLC mediante la técnica puesta a punto en el servicio de Análisis Clínicos de la Ciudad Sanitaria Virgen de las Nieves (Cobo Martínez 1985), en la siguiente forma:

A) PREPARACION DE REACTIVOS.

a.1-Tampones.

Acetato 0,5 M pH: 5,9

Acetato sódico.....41 g

Agua destilada..... 1 l

Para usar en HPLC se diluye al 1:10 con agua y se ajusta su pH a 5,9.

Borato 0,4 M pH: 9,5

Acido bórico.....6,18 g

Agua destilada.....250 ml

El pH se ajusta a 9,5 con NaOH.

a.2-Reactivos de la derivación:

OPA

o-ptalaldehido.....0,05 g

Metanol para HPLC.....1,20 ml

Se disuelven por agitación suave. Después se añade:

Tampón borato 0,4 M pH:9,5.....11 ml

2-mercaptoetanol.....0,05 ml

La muestra resultante se conserva en la oscuridad a 2-8°C.

SDS(Dodecil sulfato sódico).

SDS..... 2 g
Tampón borato 0,4 M pH 9,5.....100 ml

Se disuelven completamente y se almacenan en la oscuridad.

a.3-Reactivos de trabajo.

TAMPON DE ELUCION A (bomba A)

Tampón acetato 0,05 M pH:5,9.....808 ml
Metanol para HPLC.....190 ml
Tetrahidrofurano para HPLC.....2,5 ml

La mezcla se pasa por un filtro de 0,4 μm , desgasificándose luego durante 15 minutos en un baño ultrasónico. Se utiliza a pH 6,1.

TAMPON DE ELUCION B (bomba B)

Tampón acetato 0,05 M pH:5,9.....200 ml
Metanol para HPLC.....800 ml

La mezcla se pasa por un filtro de 0,4 μm , desgasificándose posteriormente durante 15 minutos en un baño ultrasónico. Se utiliza a pH 7,1.

STANDARD INTERNO

Acido cisteico.....0,2 g
Agua destilada.....100 ml

B) PREPARACION DE LA MUESTRA.

Se toman 5 μ l de standard interno y se mezclan con 0,1 ml de muestra. A continuación se toman 50 μ l de la muestra así preparada y se le añaden 50 μ l de SDS y 100 μ l de OPA, tras lo cual se mantiene durante un minuto a 37 °C y se pincha en el cromatógrafo.

2.4- ESTUDIO MEDIANTE ^1H RMN.

En el espectrómetro hemos estudiado todos los extractos perclóricos y en tampón fosfato de tejido renal. En algunos casos, y sólo en los extractos en tampón fosfato (método B), una alícuota del homogenizado sin centrifugar o del sobrenadante sin desproteínizar se liofilizaron para ser estudiadas en resonancia y comprobar qué metabolitos significativos en el extracto continuaban siendo visibles en muestras más complejas, incluido el riñón completo.

Las muestras liofilizadas fueron hidratadas en 0,5 ml de D_2O y colocadas dentro de un tubo de RMN de 5 mm de calibre. El D_2O se usó para atenuar la señal protónica intensa del agua y conseguir una mejor resolución y cuantificación de los picos. El número de scans por muestra osciló entre 200 y 400 hasta conseguir una buena relación señal/ruido.

La técnica usada fue la de presaturación selectiva que, aunque no es, quizás, la más moderna, es especialmente útil cuando existe un sólo "tipo magnético" de señal de solvente. La técnica consiste en invertir selectivamente la magnetización del solvente y esperar, previa puesta a punto del procedimiento, el tiempo de magnetización cero del mismo tras su parcial relajamiento longitudinal. En ese momento se da el pulso de medida no selectivo para magnetizar los solutos y poder así realizar la experiencia.

El espectrómetro elabora sus datos mediante la Transformada de Fourier. La mayoría de los sistemas presentan graves problemas de digitalización cuando un pico supera a los restantes en un orden de magnitud de 1.000. Cuando la diferencia es mayor que 10.000 se hace imposible el tratamiento adecuado. De ahí la necesidad de eliminar la señal del agua (García-Granados 1987).

2.4-1 ASIGNACION DE RESONANCIAS.

El desplazamiento químico de los picos (δ) viene expresado por su frecuencia de resonancia (Hz). Como esta frecuencia es distinta según la potencia del imán en que se realiza la experiencia, para poder comparar fácilmente los resultados entre distintos sistemas, se expresa el desplazamiento en partes por millón (ppm) con respecto a un pico de referencia:

$$\delta = \frac{f_s - f_r}{f_r} \times 10^6$$

f_s -> Frecuencia del núcleo bajo estudio.

f_r -> Frecuencia del pico de referencia.

Nosotros no hemos usado standard interno, por lo que hemos elegido como pico de referencia el triplete de los protones metilo del lactato al que le hemos asignado un desplazamiento de 1,336 (Cerdán y cols 1985) (Fig III.1).

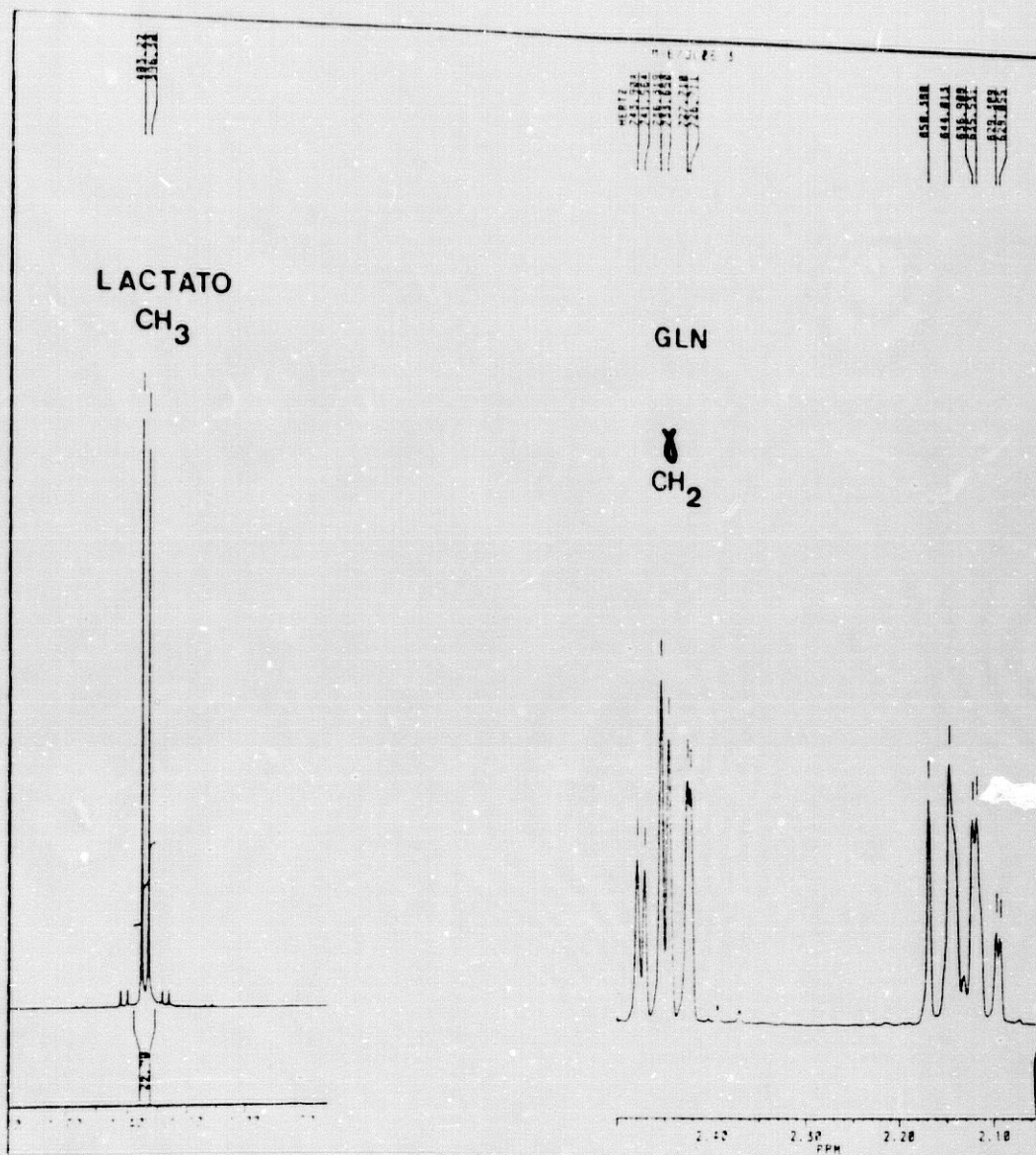


Fig. III.1- Al grupo metilo del lactato, cuya frecuencia de resonancia a 7 Tesla es de 300.000.400 Hz, le asignamos el desplazamiento químico de 1,336 ppm. Al próton gamma de la GLN se le aplica la fórmula descrita para calcular el desplazamiento químico (Al resultado hemos de sumarle el desplazamiento químico arbitrario del lactato):

$$\delta = \frac{300.000.375 - 300.000.400}{300.000.400} \times 10^6 + 1,336 = 2,452$$

Para la asignación a los distintos metabolitos renales de valores standard de resonancia hemos utilizado las referencias existentes en la literatura (Agris y Campbell 1982; Bagnasco y cols 1986; Cerdán y cols 1985; Endre y

Kuchel 1985; Evanochko y cols 1984b; Gullans y cols 1988; Quirk y cols 1989; Rothman y cols 1984). En el caso de los osmolitos renales (GPC, betaina, inositol), colina, piruvato, succinato, taurina y glicina hemos considerados suficientes los datos publicados. En el caso del lactato (utilizado en nuestros espectros como elemento de referencia) y de los principales aminoácidos (someramente estudiados en las publicaciones espectroscópicas renales) hemos sometido a verificación los datos publicados con el estudio de soluciones modelo.

Para identificar las resonancias individuales en las soluciones modelo nos hemos basado en el área espectral, parámetro indicativo del número de protones contribuyentes, y en la multiplicidad de la señal, elemento indicativo de los acoplamientos o interacciones magnéticas de un grupo bioquímico de protones equivalentes (por ejemplo, un grupo metilo(-CH₃)) con átomos vecinos que perturban el entorno electrónico multiplicando una señal que de otro modo sería única. En efecto, el grupo metilo del etanol (CH₃-CH₂-OH) acepta cuatro disposiciones magnéticas de los protones del grupo metileno (-CH₂-):

a-Dos ascendentes (↑↑).

b-Ascendente y descendente o viceversa (↑↓ ó ↓↑)

c-Dos descendentes (↓↓).

Este efecto magnético sobre el CH₃ divide su señal en un triplete cuya intensidad viene dada por la relación 1-2-1, debido a que la situación b es equivalente (Fig III.2).

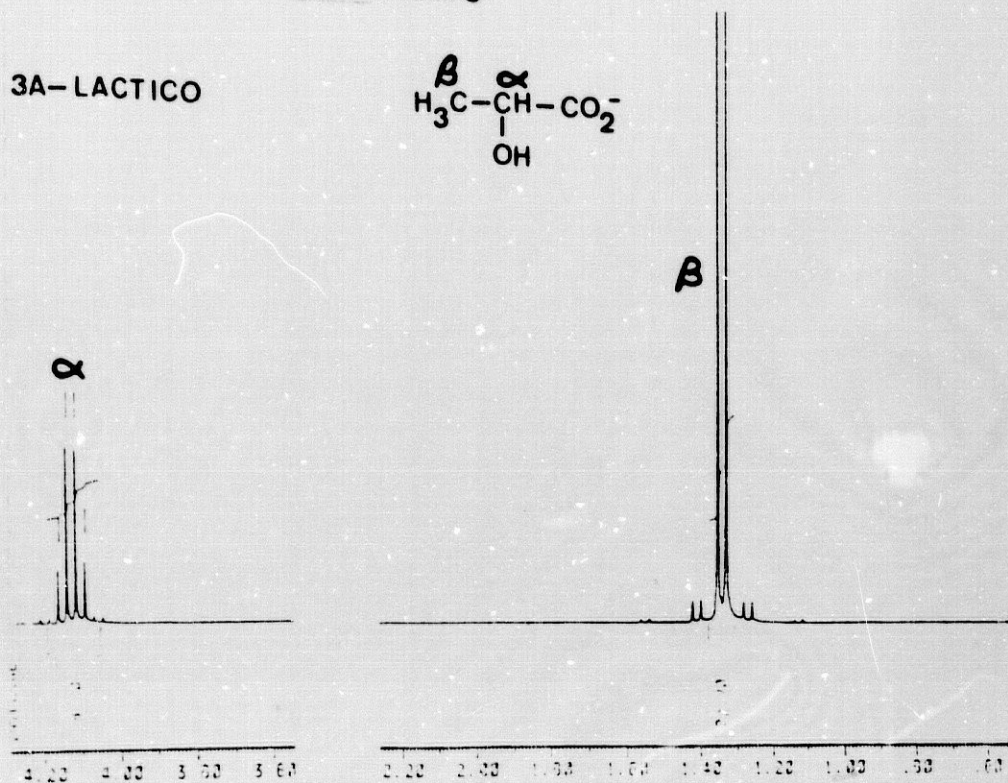
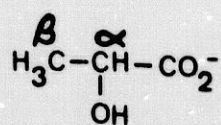
La fórmula que predice la multiplicidad en un espectro RMN es (Gadian 1982; Levine 1983):

$$N\text{º de Líneas} = 2NS + 1$$

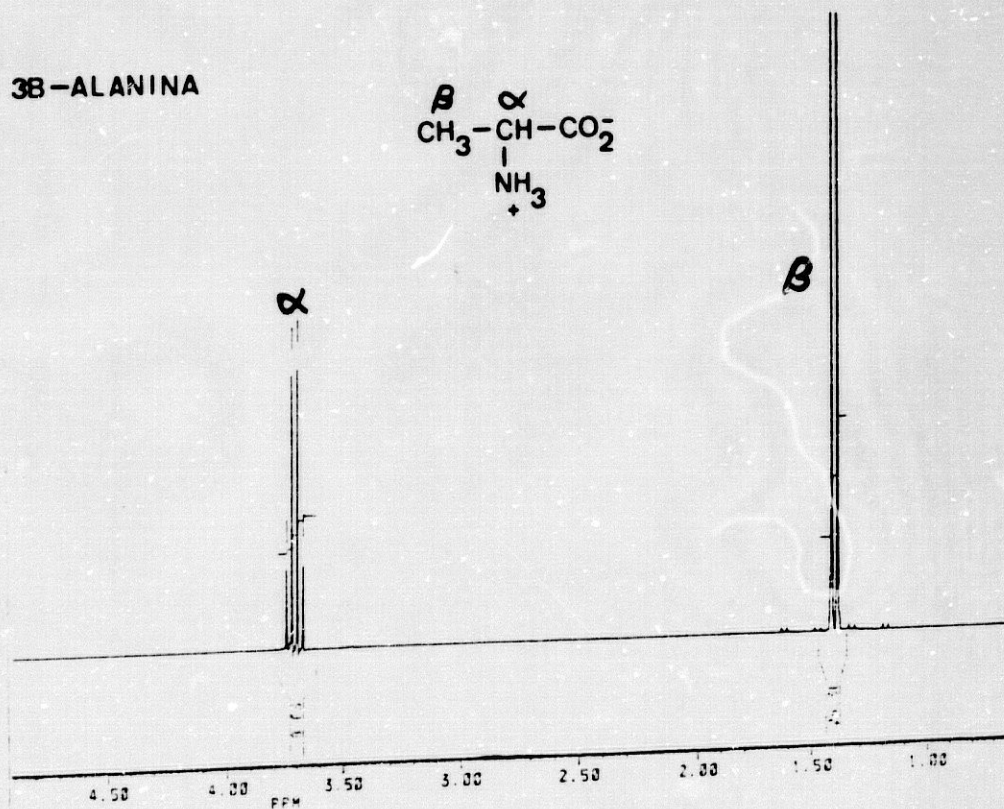
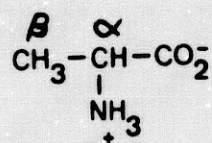
N- Nº de Átomos en relación.
S-Nº Cuántico de spin (½ para el protón).

FIG. III.3

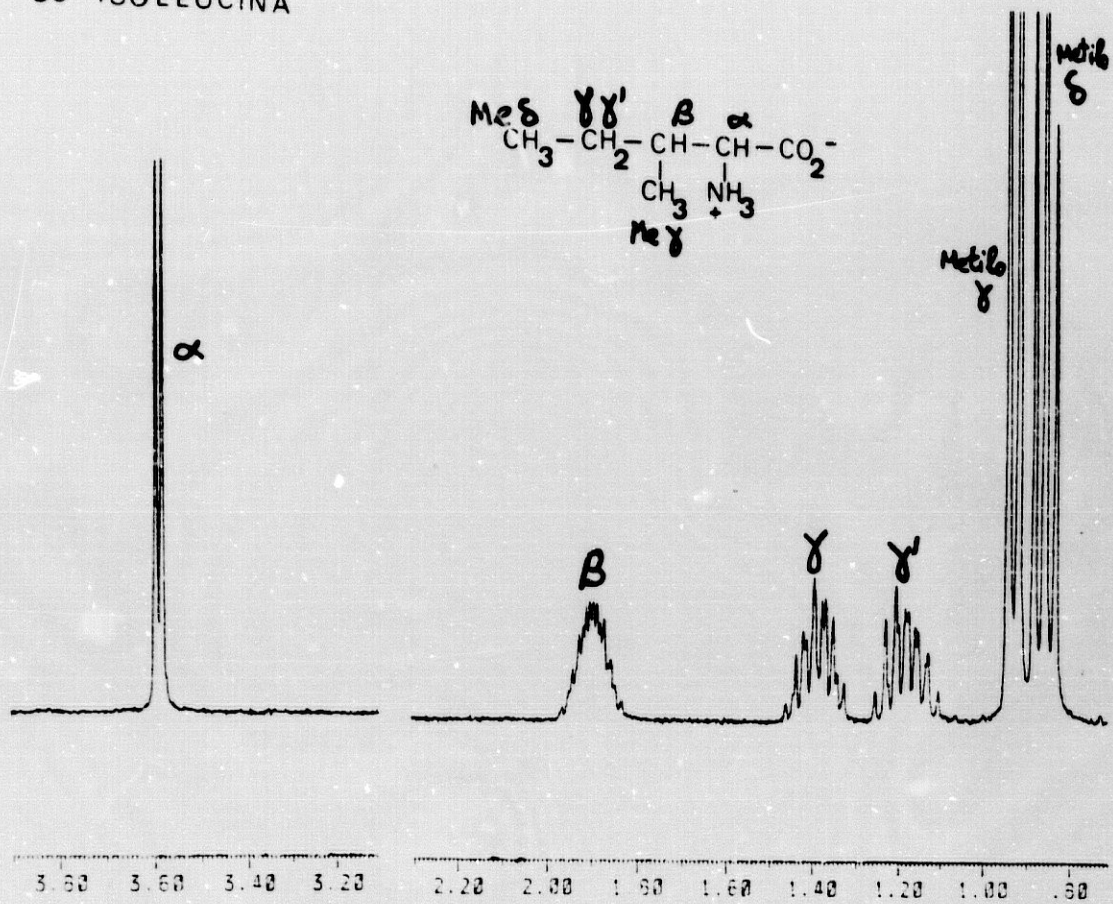
3A-LACTICO



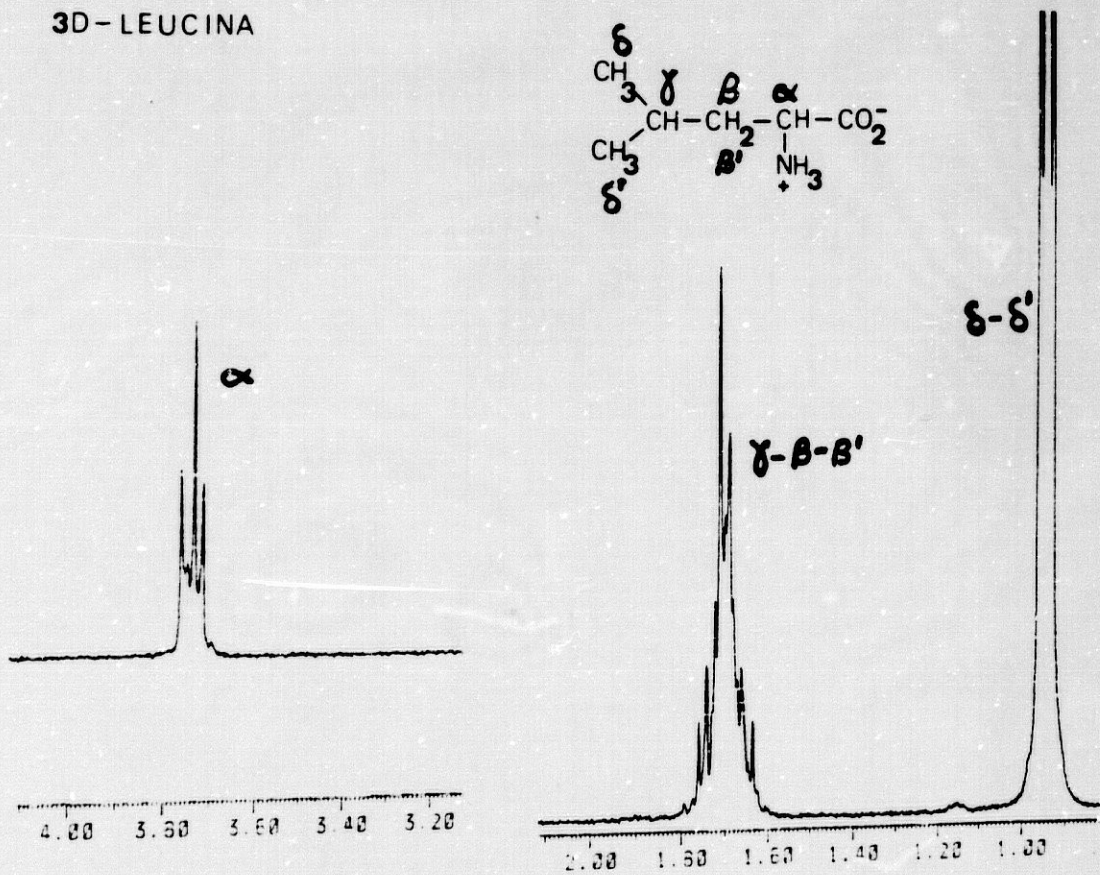
3B-ALANINA



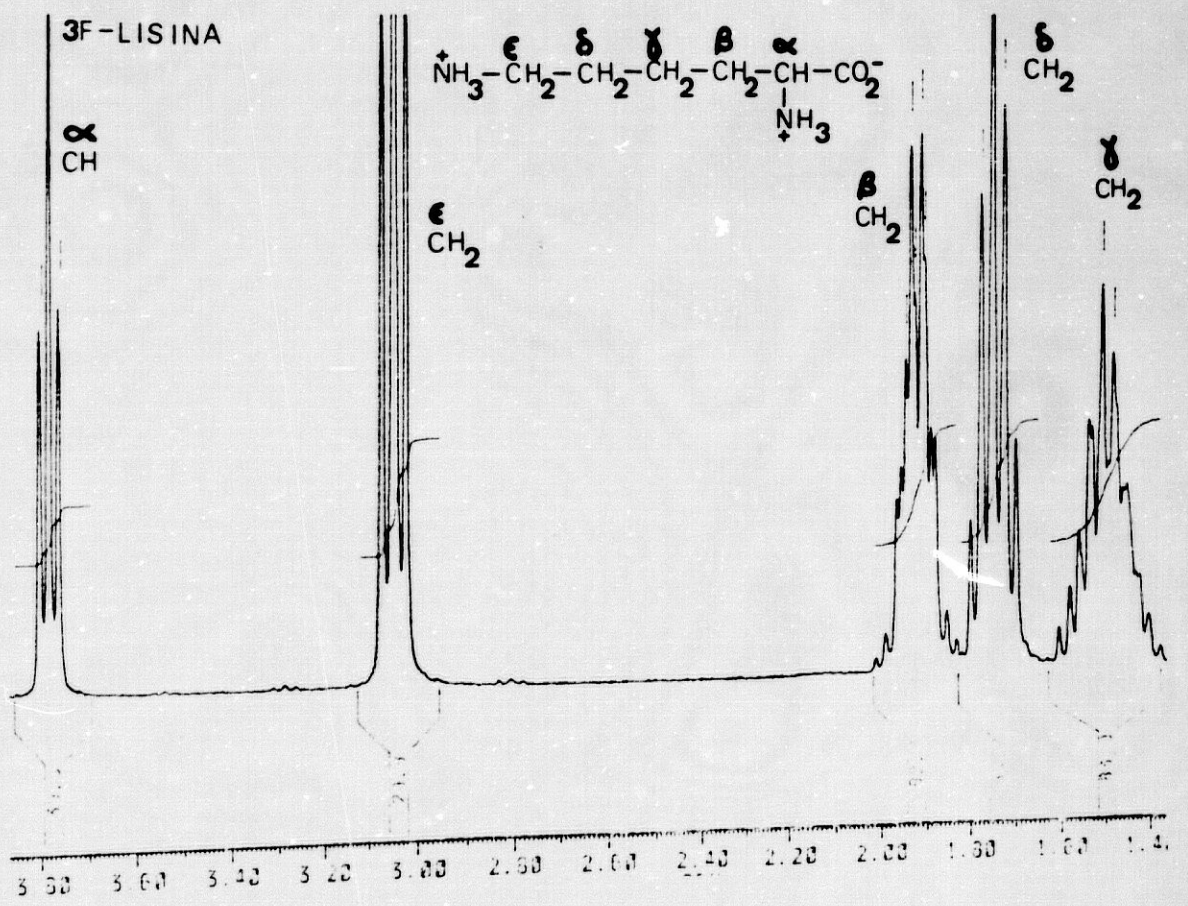
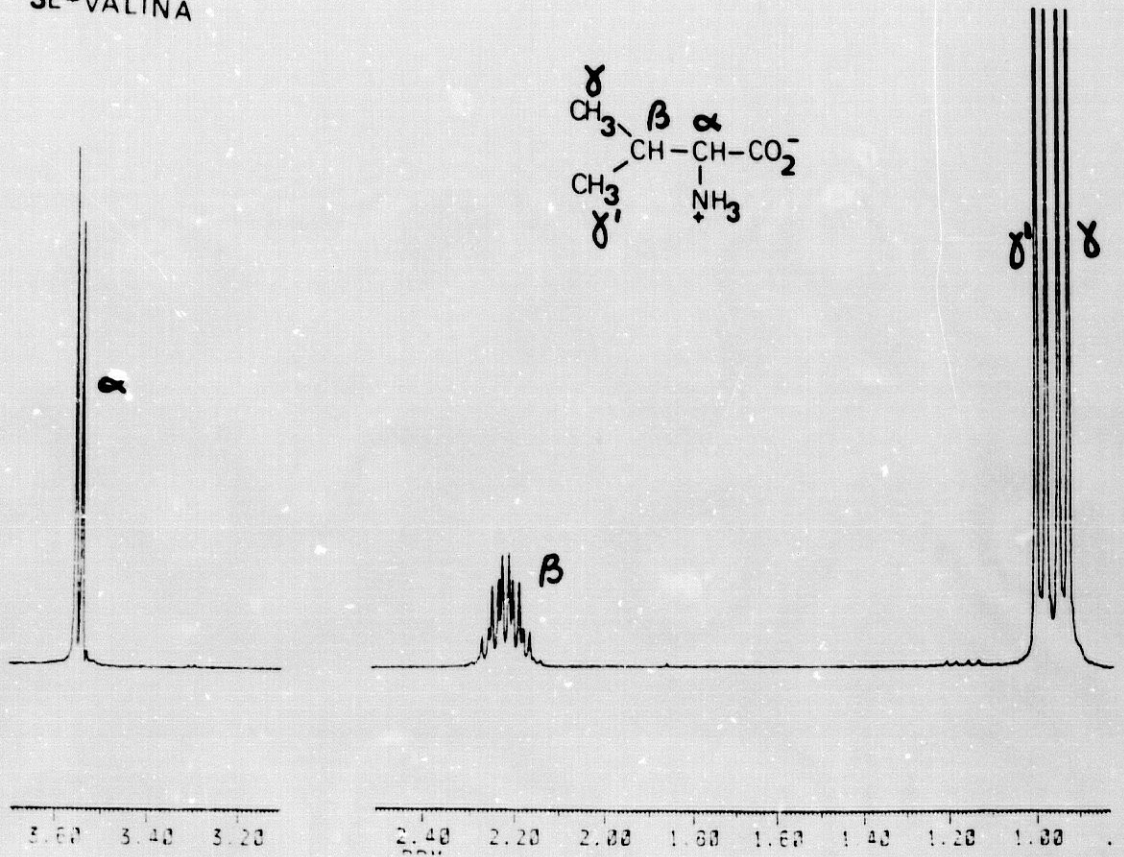
3C- ISOLEUCINA



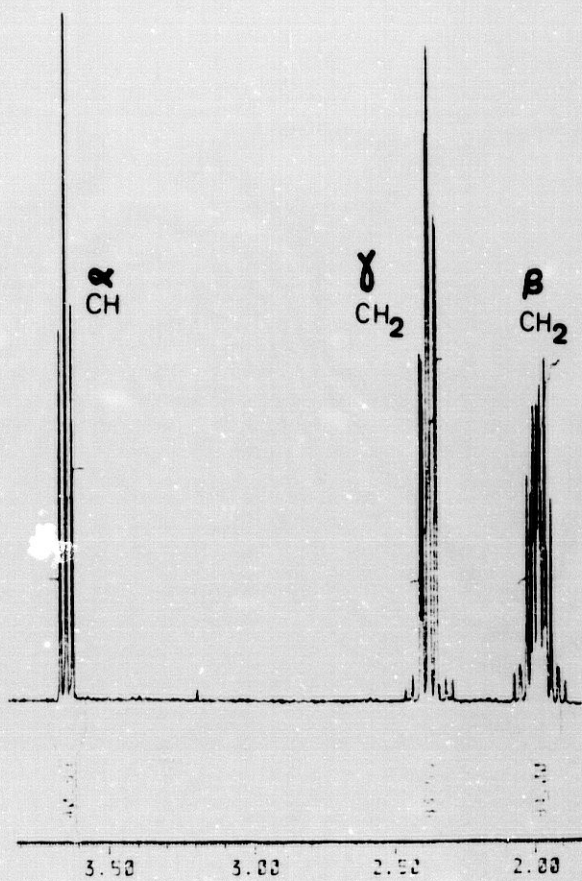
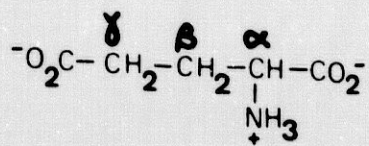
3D- LEUCINA



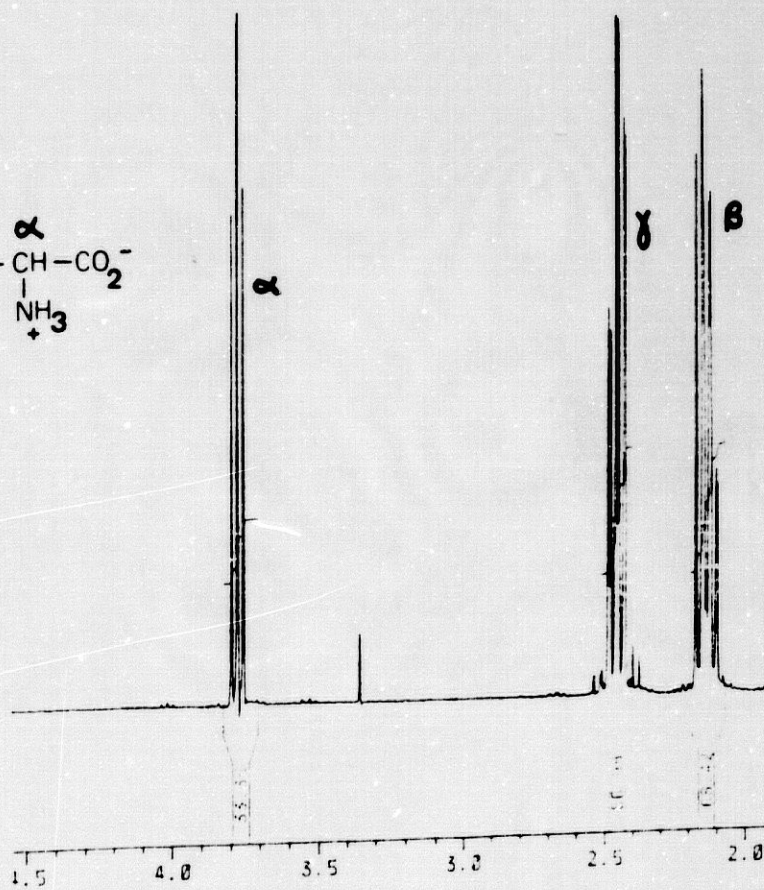
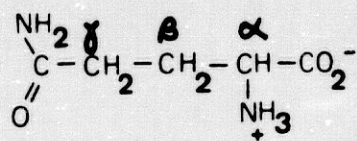
3E-VALINA



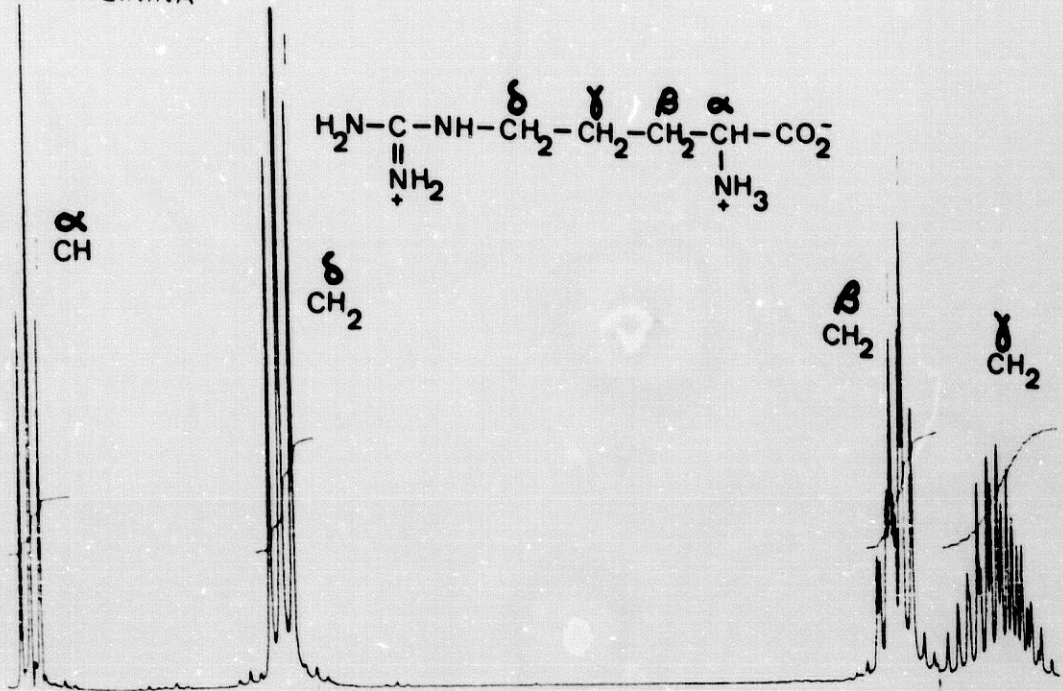
3G-GLUTAMICO



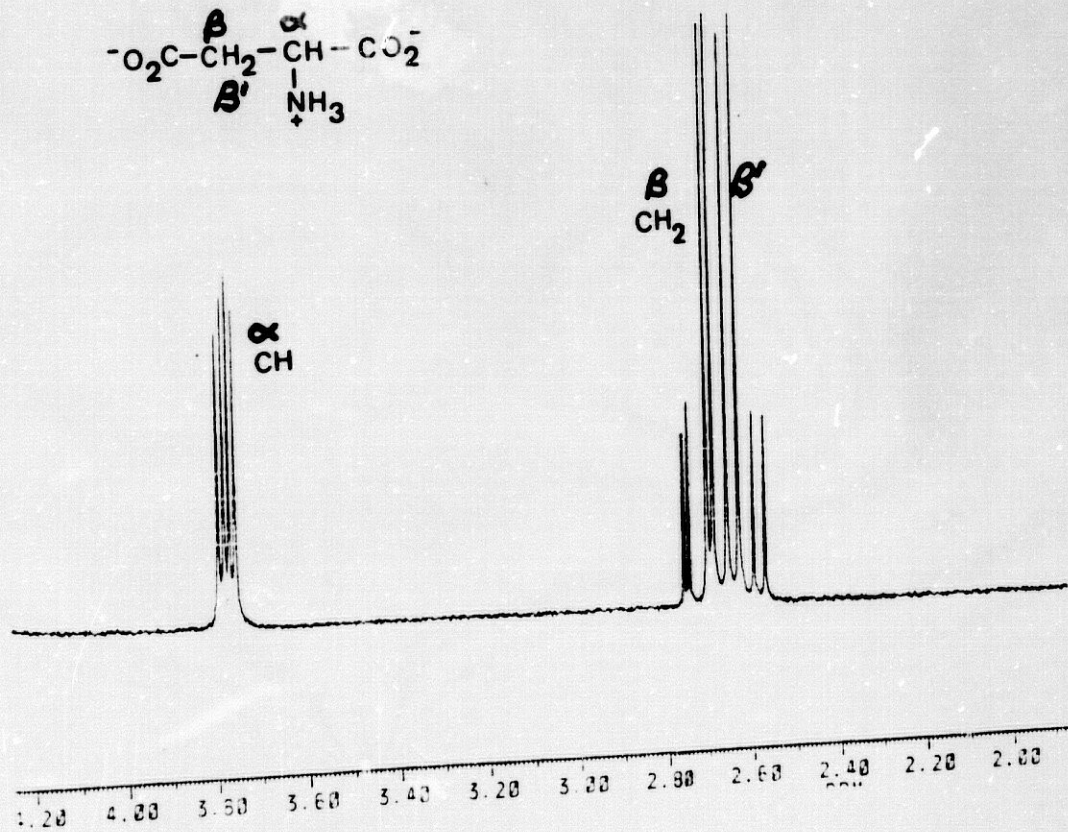
3H-GLUTAMINA



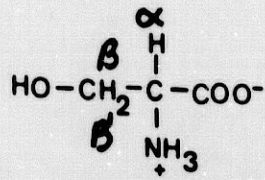
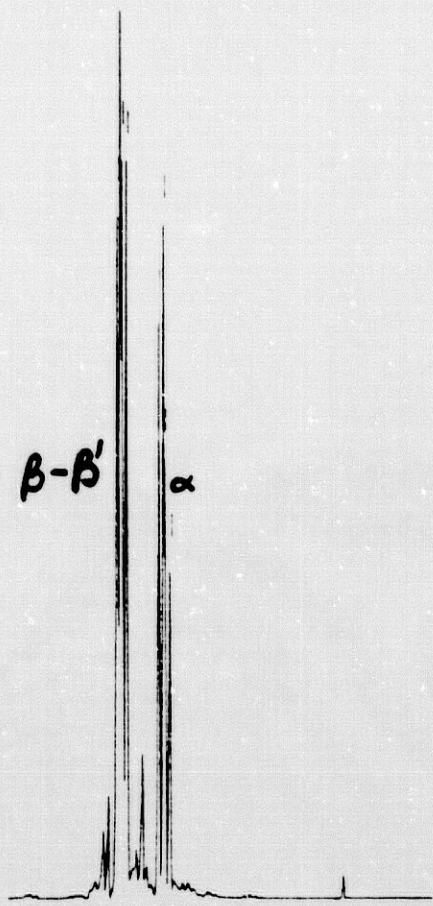
3I-ARGININA



3J-ASPARTICO

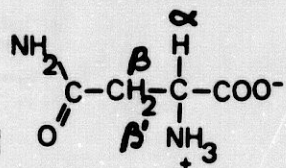
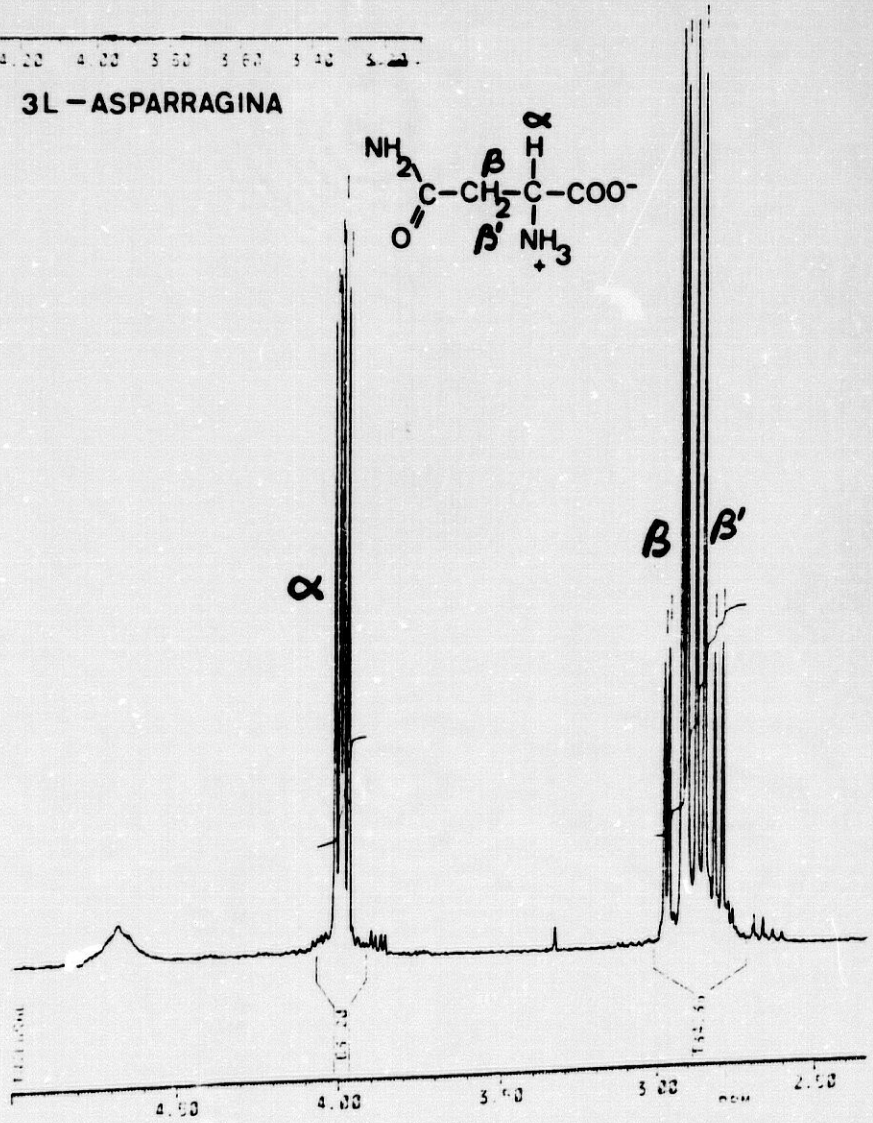


3K-SERINA



4.20 4.00 3.80 3.60 3.40 3.20

3L-ASPARRAGINA

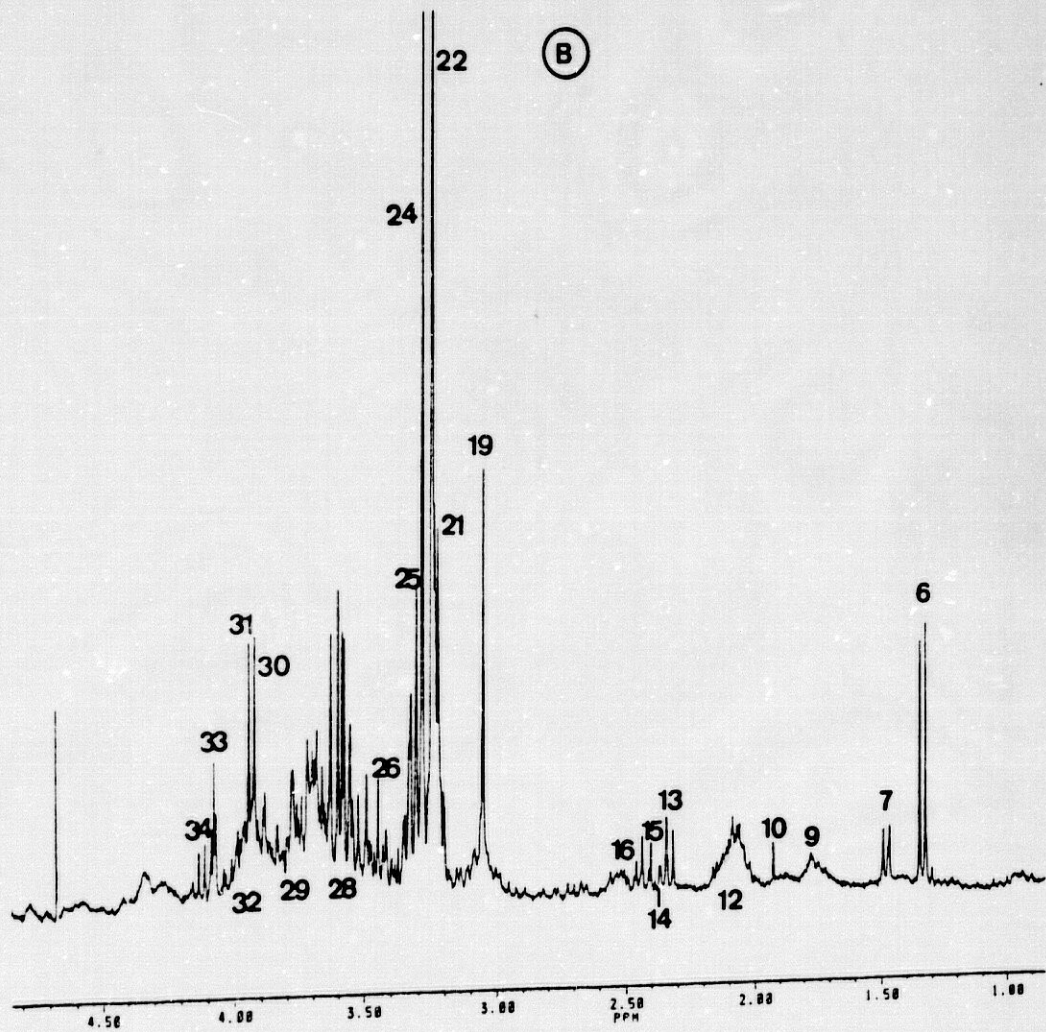
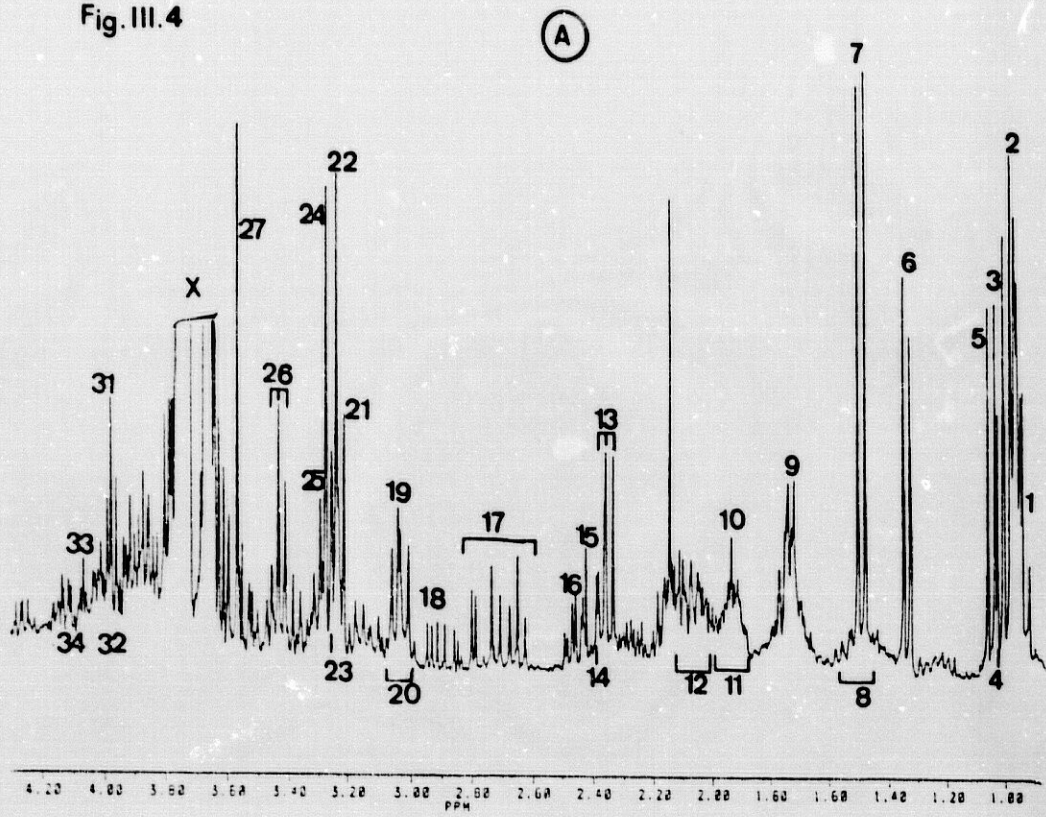


2.4.2 METABOLITOS IDENTIFICADOS EN LOS EXTRACTOS TISULARES (FIG III.4 A-E).

METABOLITO	DESPLAZAMIENTO(ppm)	MULTIPLICIDAD(a)	ASIGNACION
1-ILEU	0,91	t	H5 (δ)
2-LEU	C,95	d-d	H5-5' (δ - δ')
3-VAL	0,99	d	H4 (γ)
4-ILE	1	d	H4 (γ metilo)
5-VAL	1,04	d	H4' (γ')
6-LACT	1,336	d	CH ₃ (β)
7-ALA	1,48	d	CH ₃ (β)
8-LIS	1,46-1,49	m	H4 (γ)
9-LIS	1,66-1,78	m	H5 (δ)
-ARG	1,66-1,78	m	H4 (γ)
10-ACETATO	1,92	s	CH ₃
11-LIS-ARG	1,92	m	H3 (β)
12-GLU	2,05	m	H3 (β)
-GLN	2,12	m	H3 (β)
13-GLU	2,36	m	H4 (γ)
14-PIRUVATO	2,39	s	CH ₃
15-SUCCINATO	2,42	s	CH ₂
16-GLN	2,46	m	H4 (γ)
17-ASP	2,65-2,79	dd-dd	H3-3' (β - β')
18-ASN	2,89-2,93	dd-dd	H3-3' (β - β')
19-CREATINA	3,03	s	N-CH ₃
20-LIS	3,03	t	H6 (ϵ)
21-COLINA	3,20	s	N-(CH ₃) ₃
22-GPC	3,22	s	N-(CH ₃) ₃
23-ARG	3,24	t	H5 (δ)
24-BETAINA	3,25	s	N-(CH ₃) ₃
25-TAU	3,28	t	N-CH ₂
26-TAU	3,44	t	S-CH ₂
27-GLY	3,57	s	H2 (α)
28-INO	3,55-3,62	dd+dd	H1-3+H4-6
-GPC	3,63-3,67	t+t	(CH ₂) _n
29-ALA-LIS-GLU		-c-t-t	
-GLN-ARG	3,74-3,78	-t-t	H2 (α)
30-BETAINA	3,90	s	CH ₂
31-CREATINA	3,96	s	N-CH ₂
32-SER	3,99	dd+dd	H3-3' (β - β')
-ASN	4,00	c	H2 (α)
33-INO	4,07	dd	H2
34-LACTATO	4,11	c	H2 (α)
35-GLUCOSA	5,28	d	CH
36-ATP-ADP-AMP	6,16	s	H1'
37-TIR	6,9	d	H5 (δ)
38-TIR	7,2	d	H6 (ϵ)
39-PHE	7,3-7,44	m	Horto,meta,para
40-ADP	8,51	s	H8
41-ATP	8,53	s	H8

(a)- s-singlete d-doblete dd-doble doblete t-triplete c-cuadruplete m-multiplete
 La parte derecha de los espectros (Figs III.3 C y D) tienen una ampliación 16 veces mayor con respecto a la izquierda.

Fig. III.4



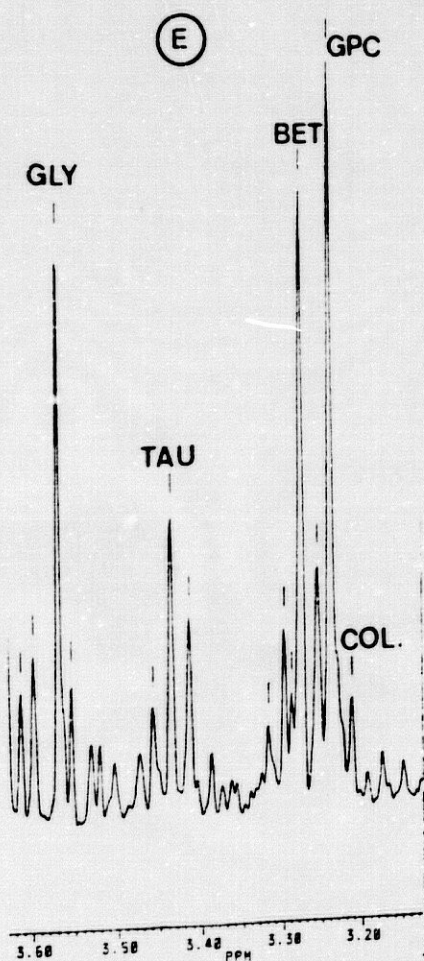
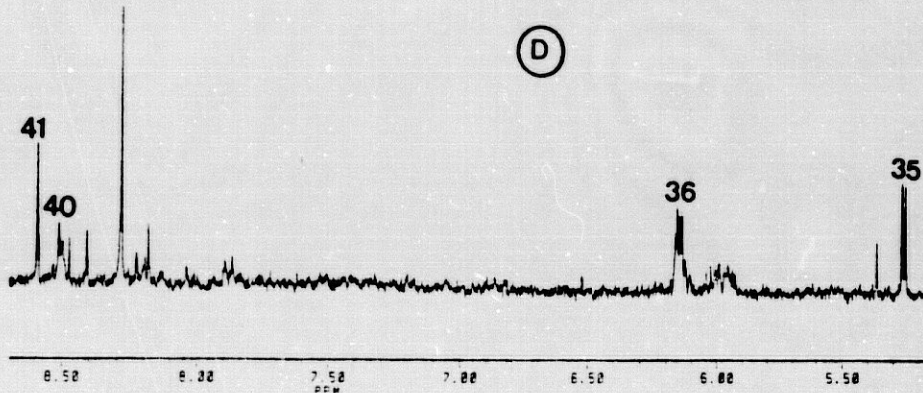
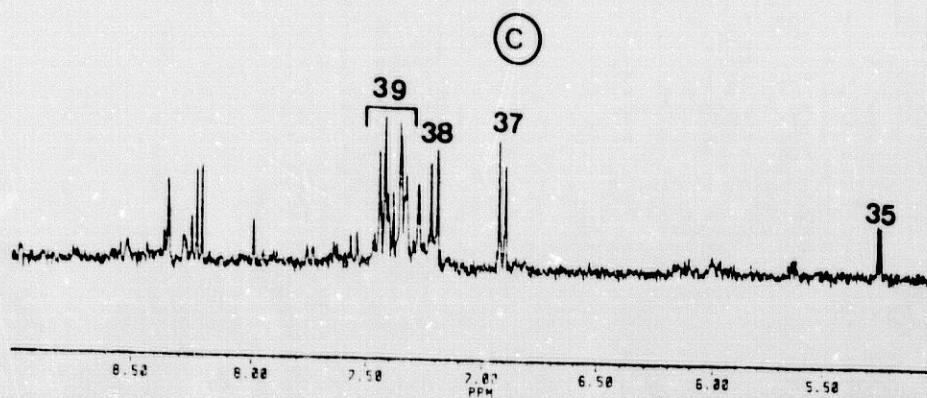


FIG. III.4:
A- PARTE IZQUIERDA DEL ESPECTRO ^1H RMN DE UN EXTRACTO EN TAMPON FOSFATO (X- área artefactada por azúcares de los filtros empleados).
B- IDEN DE UN EXTRACTO PERCLORICO.
C- PARTE DERECHA DE UN EXTRACTO EN FOSFATO.
D- PARTE DERECHA DE UN EXTRACTO PERCLORICO.
E- ANPLIACION DEL AREA COMPREDIDA ENTRE 3.2 Y 3.6 ppm.

2.4.3 METABOLITOS IDENTIFICADOS EN EL SOBRENADANTE DEL HOMOGEGINIZADO SIN FILTRAR (Fig III.5).

La identificación se llevó a cabo exclusivamente con los extractos en tampón fosfato, siendo visibles, prácticamente, la totalidad de los metabolitos identificados en el homogeinizado desproteinizado. Entre 3,6-3,78 ppm no se observan los picos de los azúcares provenientes de los filtros empleados en la desproteización. La parte derecha del espectro no es valorable y por eso no se representa. Los valores de resonancia asignados fueron los siguientes:

- 1-De 0,91 a 1,04 ppm: Isoleucina (Ile), Leucina (Leu) y Valina (Val).
- 2-A 1,336 ppm: Lactato.
- 3-A 1,48 ppm: Alanina (Ala).
- 4-Entre 1,66-1,78: Lisina (Lis).
- 5-A 1,93 ppm: Acetato.
- 6-A 2,36 ppm: Glutamato (GLU).
- 7-A 2,42 ppm: Succinato.
- 8-A 2,46 ppm: Glutamina (Gln).
- 9-A 3,03 ppm: Creatina (Cr).
- 10-A 3,22 ppm: Colina.
- 11-A 3,24 ppm: Glicerofosforilcolina (GPC).
- 12-A 3,27 ppm: Betaina.
- 13-A 3,44 ppm: Taurina.
- 14-A 3,57 ppm: Glicina (Gly).
- 15-A 4,07 ppm: Inositol (Ino).

2.4.4-METABOLITOS IDENTIFICABLES EN EL HOMOGEGINIZADO DE RIÑON COMPLETO (Fig III.6):

- 1-De 0,91 a 1,04 ppm: se observan las resonancias Ile, Leu y Val englobadas en un componente importante de los protones CH_3 lipídicos.
- 2-A 1,33 ppm: Los protones $-(\text{CH}_2)_n$ de los lípidos oscurecen prácticamente la totalidad de los protones del lactato.
- 3-A 1,49 ppm: Ala.
- 4-A 1,93 ppm: Acetato.
- 5-A 2,36 ppm: Glu.
- 6-A 3,03 ppm: Cr.
- 7-Entre 2,2 y 2,3 ppm: Colina+GPC+Betaina.
- 8-A 3,44 ppm: Taurina.
- 9-A 3,57 ppm: Gly+inositol.
- 10-A 4,07 ppm: Inositol (Ino).

Fig. III. 5

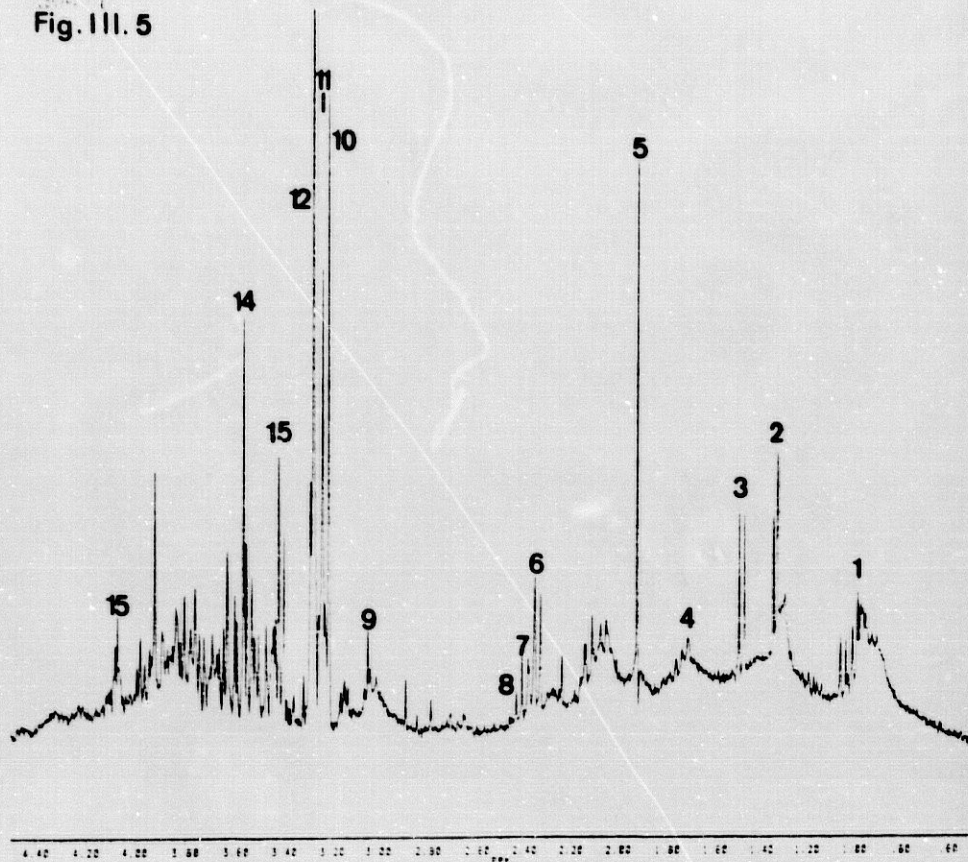
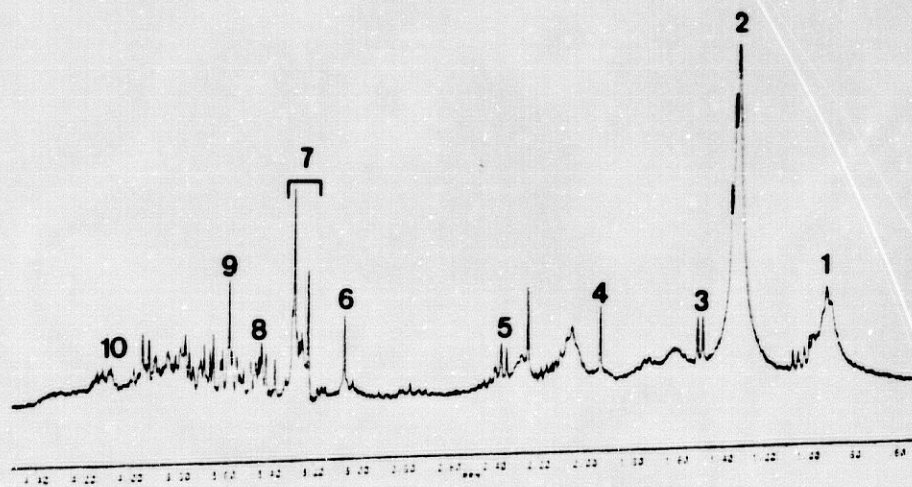


Fig. III. 6



2.4.5-CUANTIFICACION DE LOS ESPECTROS.

La cuantificación de los espectros se hizo del siguiente modo:

a) En los extractos perclóricos (método A) se comparó la intensidad por protón de una determinada resonancia con la intensidad del doblete de los protones metilo del lactato, a los que se les asignó el valor obtenido mediante ensayo enzimático (Gutmann y Wahlefeld 1974).

b) En los extractos en tampón fosfato (método B), se comparó la intensidad por protón de una determinada resonancia con la intensidad del doblete de los protones metilo de la alanina, a los que se les asignó el valor obtenido mediante HPLC.

Para determinar la intensidad de cada señal se utilizó la integral. En ocasiones, fundamentalmente en resonancias parcialmente solapadas, la medición del área con papel milimetrado también se consideró útil.

Para el lactato integramos el doblete de los tres protones metilo a 1,336 ppm; para la alanina usamos el doblete de los tres protones metilo a 1,483 ppm; para el glutámico el multiplete de los dos protones gamma a 2,38 ppm; para el piruvato el singlete del grupo CH_3 a 2,39 ppm y que aparece estrechamente unido al último pico componente de la resonancia del glutamato (cuando no se pudo integrar de modo independiente al glutamato, atribuimos un 50% de este último pico a cada uno de los dos componentes (Fig. III.6)) ; para el succinato integramos el singlete del grupo CH_2 que resuena a 2,42 ppm; para la glutamina el multiplete de los dos protones gamma a 2,46 ppm; para la colina, GPC y Betaina utilizamos el singlete de los nueve protones trimetilamina que resuenan a 3,20, 3,22 y 3,25 respectivamente; para la

taurina el triplete de los dos protones del grupo S-H₂ a 3,44 ppm; para la glicina el singlete de los dos protones H₂ a 3,57 ppm; para el inositol el doble doblete del protón H₂ a 4,08 ppm.

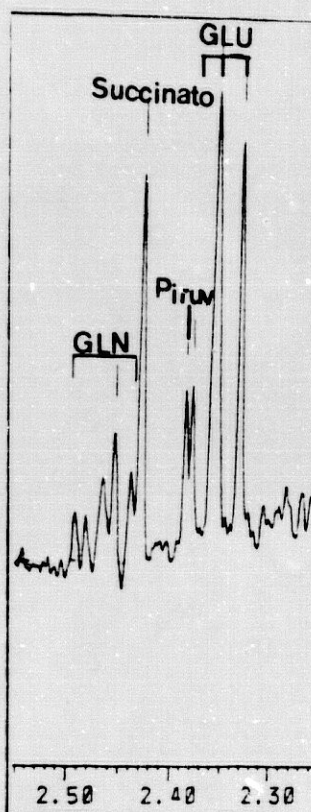


Fig III.7- Ampliación de la región comprendida entre 2,3 y 2,5 ppm. El singlete del piruvato está estrechamente unido al último pico del glutamato (ver texto).

2.5- MEDICION DEL CONTENIDO DE PROTEINAS EN LAS MUESTRAS.

Hemos utilizado el método descrito por Lowry y cols (1951) consistente en:

a) Preparación del primer reactivo:

En un tubo de 20 ml se ponen 12 ml de Carbonato Sódico, 50 μ l de tartrato sódico, 50 μ l de sulfato de cobre y se mezcla bien.

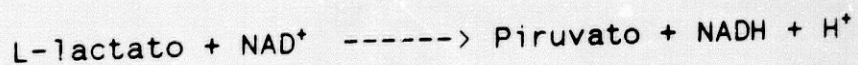
En un tubo de 10 ml se ponen 1,1 ml de agua destilada, 0,1 ml de ácido clorhídrico concentrado, 1,2 ml de reactivo de fenol y se mezcla bien.

c) Medición de proteínas:

La determinación se realizó utilizando albúmina bovina como standard. Tanto en los tubos problema como standard se pipetea 1 ml del primer reactivo, 0,2 ml de solución salina y 20 μ l de la muestra a estudiar. La mezcla resultante se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente. Pasados estos diez minutos ponemos 100 μ l del segundo reactivo en todos los tubos y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente. Terminada la incubación se pasa a la lectura en el espectrofotómetro a 510 nm, previo ajuste de la absorbancia a cero con los tubos blanco.

2.6-DETERMINACION ENZIMATICA DEL LACTATO:

El L-lactato se determina enzimáticamente oxidándolo mediante el enzima lactato deshidrogenasa (LDH) a pH 9,5, según ha descrito Gutmann y Wahlefeld (1974):



a) Reactivos:

Tampón hidrazina-glicocola 0,9:1M, pH 9,5
Solución extemporánea de NAD al 0,5%
Lactato deshidrogenasa (LDH) (E.C. 1.1.1.27)

b) Técnica:

Las cubetas se preparan con las siguientes cantidades de reactivos:

	<u>Muestra</u>	<u>Control</u>	<u>Blanco</u>
Tampón	1,50 ml	1,50 ml	1,50 ml
NAD ⁺	0,40 ml	0,40 ml	0,20 ml
Agua destilada	0,10 ml	0,60 ml	0,80 ml
Muestra	0,50 ml	-----	-----
LDH	0,02 ml	0,20 ml	-----

La determinación espectrofotométrica se realiza a 340 nm y temperatura ambiente anotando el incremento de Absorbancia (Densidad óptica) debido al consumo de lactato paralelo a la formación de NADH.

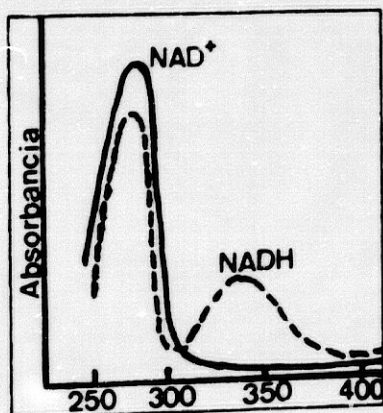


Fig. III.8- Propiedades de absorción del NAD⁺ y del NADH. La forma reducida del nucleótido de piridina tiene un máximo de absorción a 340 nm que no está presente en la forma oxidada.

2.7- TRATAMIENTO ESTADISTICO.

En los extractos en tampón fosfato cada dato de HPLC corresponde al estudio del extracto de un riñón individual (para RMN fue necesario mezclar los extractos de dos riñones para obtener la cantidad de muestra suficiente). En los extractos perclóricos cada dato corresponde también al obtenido del extracto de un solo riñón.

El análisis estadístico entre el grupo normóxico y los distintos grupos isquémicos se ha realizado mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía (Martín Andrés y Luna del Castillo 1989) en la forma siguiente:

a) En primer lugar comprobamos la igualdad de las varianzas mediante el test de Cochran, tras lo cual se procedió a realizar el ANOVA, que se consideró significativo si el error era menor del 5% ($\alpha < 0,05$).

b) Cuando identificamos diferencias entre los distintos grupos, realizamos comparaciones específicas de las distintas medias de diversos parámetros mediante el método de Tukey considerándose significativo todo valor de probabilidad inferior al 5% ($P < 0,05$).

El análisis estadístico entre el grupo normóxico y el acidótico se realizó con el test de la t de Student pareado, considerándose las diferencias significativas cuando $P < 0,05$ (Parker 1981).

IV—RESULTADOS .

IV-RESULTADOS.

1.- EVOLUCION DE LOS NIVELES TISULARES DE AMINOACIDOS Y DIVERSOS METABOLITOS DURANTE LA ISQUEMIA POR CLAMPAJE DEL PEDICULO RENAL.

1.1- VALORES DETERMINADOS MEDIANTE HPLC.

Hemos determinado a nivel renal diversos metabolitos en condiciones normóxicas y hemos estudiado las modificaciones inducidas en sus niveles tisulares mediante isquemia inducida por clampaje del pedículo renal. La cromatografía líquida de alta presión (HPLC) (tabla IV.1) nos ha permitido cuantificar gran número de aminoácidos, algunos de los cuales no habían sido reseñados previamente en la literatura renal. Estas determinaciones cromatográficas se han realizado exclusivamente en los extractos en tampón fosfato, método de extracción que ya ha sido empleado con eficacia en otros órganos, fundamentalmente el cerebro (Dwyer y cols 1987).

Los niveles de aminoácidos determinados mediante HPLC evolucionaron del siguiente modo con respecto a los niveles normóxicos (Gráfica IV.1):

- A los 2 minutos no se detectaron cambios significativos en la concentración de ningún aminoácido.

-A los 45 minutos de isquemia:

*Incrementan su valor:

Glu ---> 79% (P<0,01)

Ser ---> 74% (P<0,01)

*Descienden su valor:

Gln ---> 35% (P<0,05)

-A los 60 minutos de isquemia:

*Incrementan su valor:

Glu ---> 69% (P<0,01)

Ser ---> 90% (P<0,01)

*Descienden su valor:

Gln ---> 37% (P<0,05)

TABLA IV.1- EVOLUCION DE LOS AMINOACIDOS EN LA ISQUEMIA TISULAR RENAL POR CLAMPAJE DEL PEDICULO VASCULAR, DETERMINADOS MEDIANTE HPLC (extractos en tampón fosfato).

METABOLITOS	NORMOXIA	ISQUEMIA		
		2 MINUTOS	45 MINUTOS	60 MINUTOS
1-ASP (10)	1,91±0,17	1,71±0,32	1,38±0,13	1,97±0,29
2-GLU (10)	3,84±0,32	4,94±0,34	6,90±0,60*	6,52±0,28*
3-ASN (10)	2,00±0,21	1,78±0,23	2,17±0,25	2,19±0,19
4-SER (10)	1,95±0,19	2,04±0,26	3,26±0,23*	3,57±0,17*
5-GLN (10)	1,49±0,13	1,36±0,14	0,97±0,07‡	0,94±0,16‡
6-ARG (10)	1,15±0,20	1,14±0,29	1,15±0,04	1,11±0,11
7-ALA (10)	2,31±0,38	2,30±0,37	2,86±0,18	3,01±0,23
8-TIR (7)	0,37±0,09	0,37±0,10	0,14±0,03	0,10±0,02
9-TRP (8)	0,12±0,02	0,23±0,05	0,12±0,01	0,12±0,01
10-MET (7)	0,29±0,14	0,76±0,30	0,74±0,09	0,59±0,12
11-VAL (9)	0,63±0,23	0,91±0,29	1,32±0,15	1,47±0,21
12-PHE(10)	1,09±0,32	1,53±0,27	1,39±0,16	1,54±0,20
13-ILE(10)	0,50±0,14	0,79±0,17	0,73±0,10	0,73±0,11
14-LEU(10)	1,46±0,20	1,15±0,13	1,28±0,19	1,74±0,22
15-LIS(10)	0,69±0,16	1,03±0,23	0,67±0,07	0,82±0,11

-Los valores corresponden en cada grupo a la media de (n) datos individuales ± error standard de la media y vienen expresados en µmol/gr de tejido húmedo.

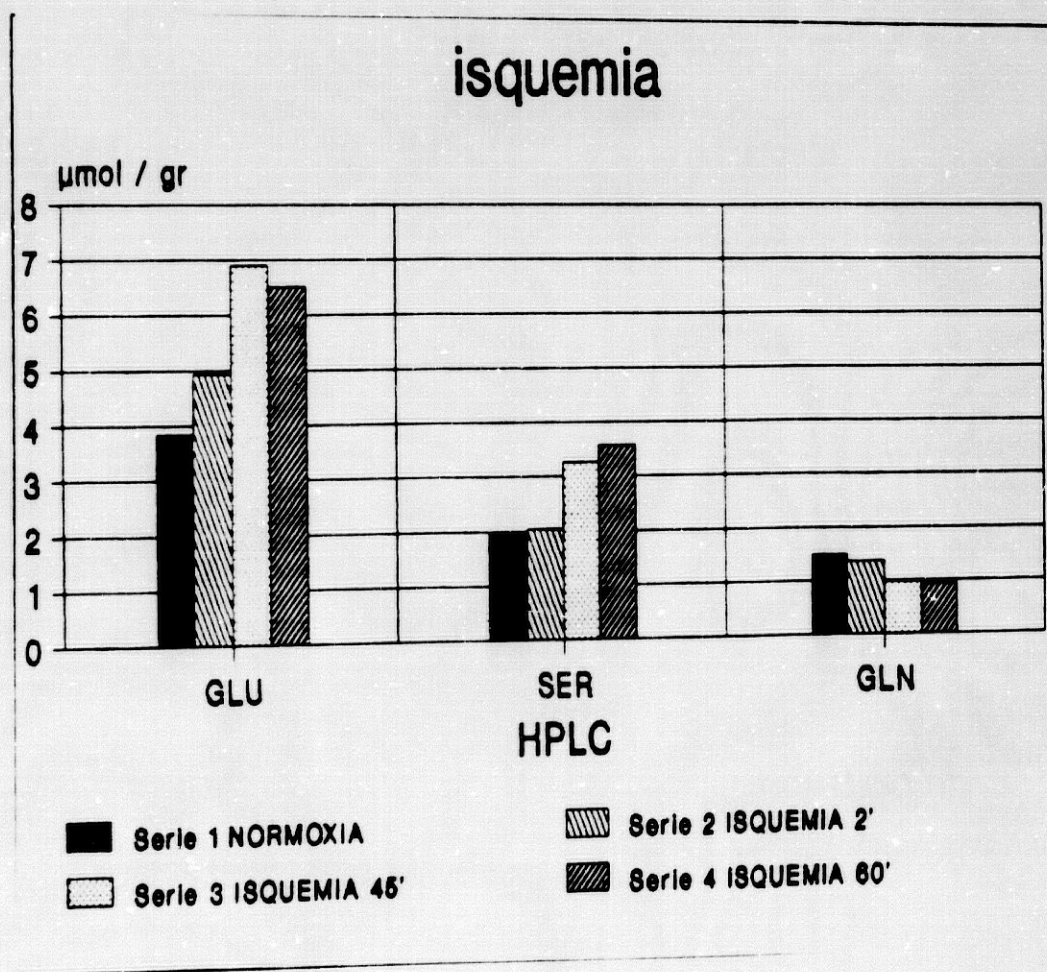
-Diferencias significativas con respecto a los niveles normóxicos:

* P < 0,01 ‡ P < 0,05.

La evolución entre los distintos tiempos de isquemia fue, por otra parte, la siguiente (Gráfica IV.1):

a) La elevación de los niveles de Glu fue máxima a los 45 min. y se estabilizó a los 60 min., mientras que la Ser mantuvo su incremento, aunque no de forma significativa.

b) La glutamina descende sus valores a los 45 min., manteniéndolos bajos de modo significativo a los 60 min.



GRAFICA IV-1.- AMINOACIDOS DETERMINADOS MEDIANTE HPLC Y QUE HAN MODIFICADO SUS VALORES POR EFECTO DE LA ISQUEMIA.

Cuando calculamos la concentración de aminoácidos por contenido de proteínas del extracto (no representado) no hubo variaciones apreciables con respecto a los valores por peso de tejido representados en la tabla IV.1, ya que el contenido de proteínas de los extractos tisulares en normoxia y en las distintas condiciones de isquemia no mostró diferencias estadísticamente significativas:

- Normoxia: $1,14 \pm 0,05$ mgr / c.c.
- Isquemia 2': $1,09 \pm 0,07$ mgr / c.c.
- Isquemia 45': $1,01 \pm 0,10$ mgr / c.c.
- Isquemia 60': $1,06 \pm 0,01$ mgr / c.c.

1.2- VALORES DETERMINADOS MEDIANTE ^1H RMN EN EXTRACTOS EN TAMPON FOSFATO.

La ^1H RMN de los extractos en tampón fosfato nos permitió cotejar con fiabilidad algunos aminoácidos estudiados mediante HPLC. Otros, aunque observables, fueron de difícil cuantificación por su solapamiento con señales protónicas de similar desplazamiento químico. Aunque existen métodos que permiten cuantificar los picos solapados, como el procedimiento de la suma de la altura de las señales (Cerdan y cols 1985), o del corte y pesado de las señales del espectro representado en papel (Quirk 1989), que permiten la cuantificación prácticamente completa de complejos espectros protónicos, nosotros, que hemos enfocado este trabajo desde una perspectiva clínica, sólo hemos recurrido a un método similar, mediante la medición del área con papel milimetrado, en contadas ocasiones, únicamente si eran evidentes modificaciones de consideración.

En la tabla IV.2 se recogen los metabolitos fácilmente cuantificados en el espectro protónico:

TABLA IV.2- EVOLUCION DE LOS METABOLITOS DETERMINADOS MEDIANTE ¹H RMN EN LA ISQUEMIA TISULAR RENAL (extractos en tampón fosfato).

METABOLITOS	NORMOXIA	ISQUEMIA		
		2 MINUTOS	45 MINUTOS	60 MINUTOS
1-GLUTAMICO	3,10±0,15	3,81±0,39	5,06±0,24*	5,18±0,27*
2-GLUTAMINA	1,40±0,07	1,24±0,10	1,09±0,10	1,17±0,13
3-GLICINA	2,38±0,18	4,00±0,55‡	4,34±0,42*	4,44±0,25*
4-ALANINA	2,30±0,20	2,47±0,26	2,95±0,18	3,20±0,45
5-COLINA	0,27±0,08	0,57±0,14	0,86±0,18‡	0,86±0,04*
6-GPC	1,14±0,17	1,32±0,23	1,01±0,17	0,90±0,15
7-BETAINA	0,79±0,17	1,20±0,18	1,25±0,11	1,26±0,05
8-INOSITOL	2,21±0,16	2,72±0,46	5,09±0,16*	4,49±0,12*
9-TAU	3,62±0,37	4,79±0,80	5,76±0,64	5,45±0,11
10-PIRUVATO	0,29±0,12	0,24±0,02	0,34±0,03	0,31±0,01
11-CREATINA	0,75±0,04	0,75±0,14	0,81±0,10	0,82±0,05
12-LACTATO	1,97±0,16	2,70±0,24‡	4,56±0,12*	4,55±0,19*

-Los valores corresponden a la media de cinco experimentos individuales ± error standard y vienen expresados en µmol/gr de tejido húmedo.

-Diferencias significativas con respecto a los niveles normóxicos:

* P < 0,01 ‡ P < 0,05

En la figura IV.1 (A-D) se representan los espectros en normoxia y en los distintos tiempos de isquemia.

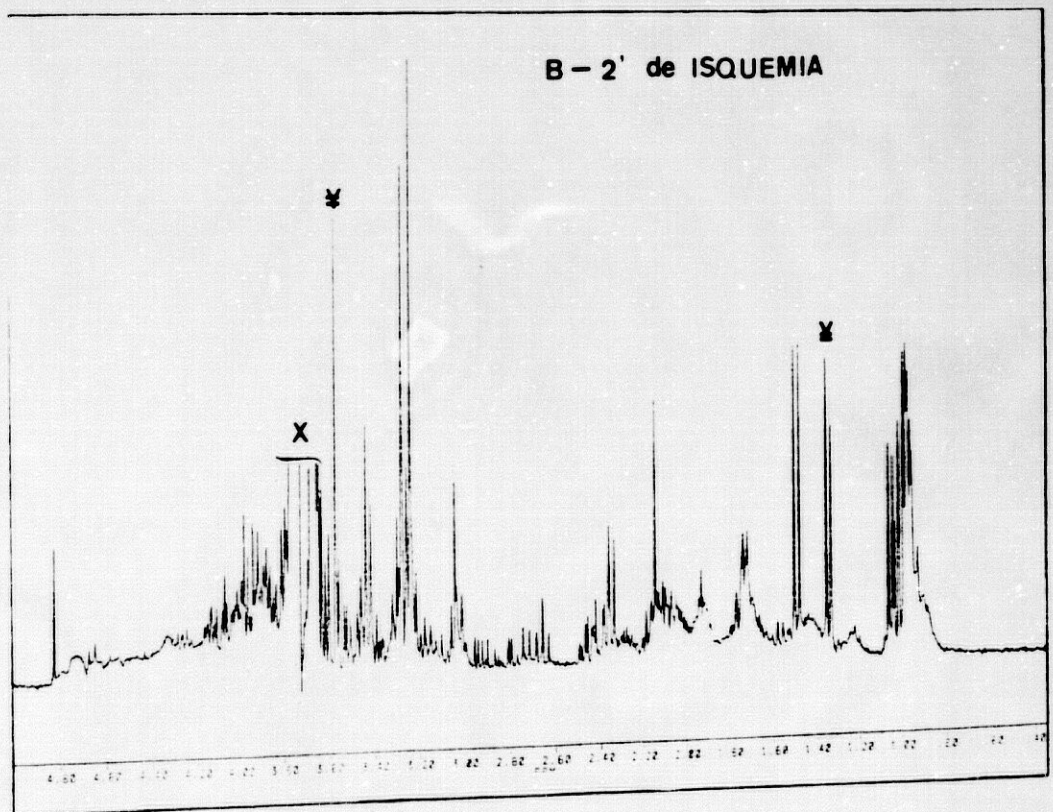
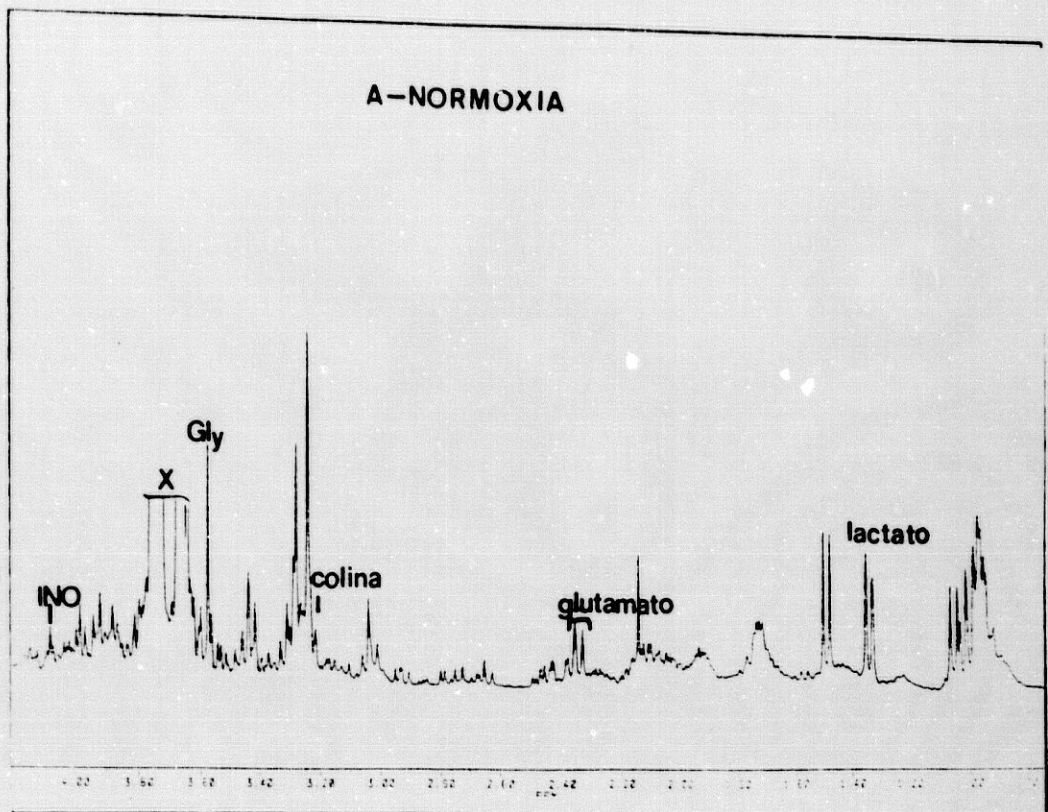
Fig. IV.1 A-D (Pgs 95-96):

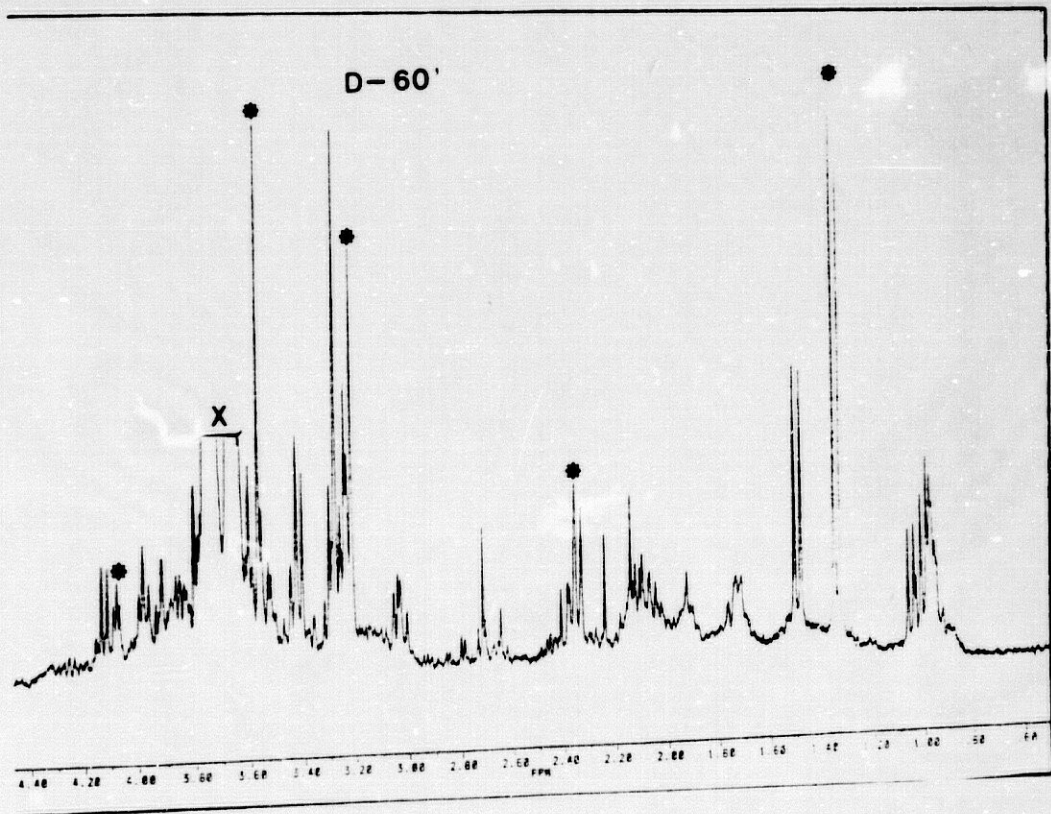
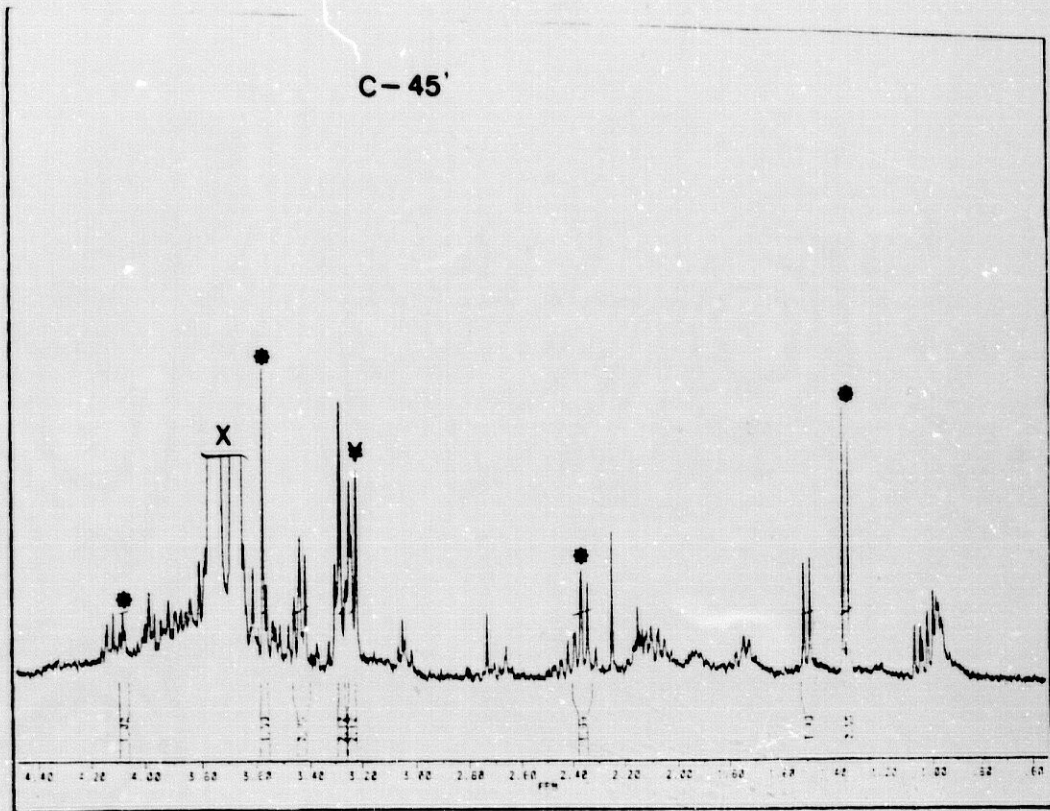
A- Espectro en extracto de riñón de rata normóxica. Se señalan aquellos metabolitos que han modificado sus niveles de modo significativo. "X" Area artefactada por azúcares de los filtros empleados.

B- Espectro de riñón con 2 minutos de isquemia. se señalan las modificaciones significativas.

C- Idem, con 45 minutos de isquemia.

D- Idem, con 60 minutos de isquemia.





-Los valores determinados mediante ¹H RMN en extractos en tampón fosfato evolucionaron del siguiente modo con respecto a los niveles en normoxia:

-A los 2' de isquemia:

*Incrementan su valor:

Gly ---> 68% (P<0,05)

Lactato ---> 37% (P<0,05)

-A los 45' de isquemia:

*Incrementan su valor:

Glu ---> 63% (P<0,01)

Gly ---> 82% (P<0,01)

Ino ---> 130% (P<0,01)

Lactato ---> 131% (P<0,01)

-A los 60' de isquemia:

*Incrementan su valor:

Glu ---> 67% (P<0,01)

Gly ---> 86% (P<0,01)

Ino ---> 103% (P<0,01)

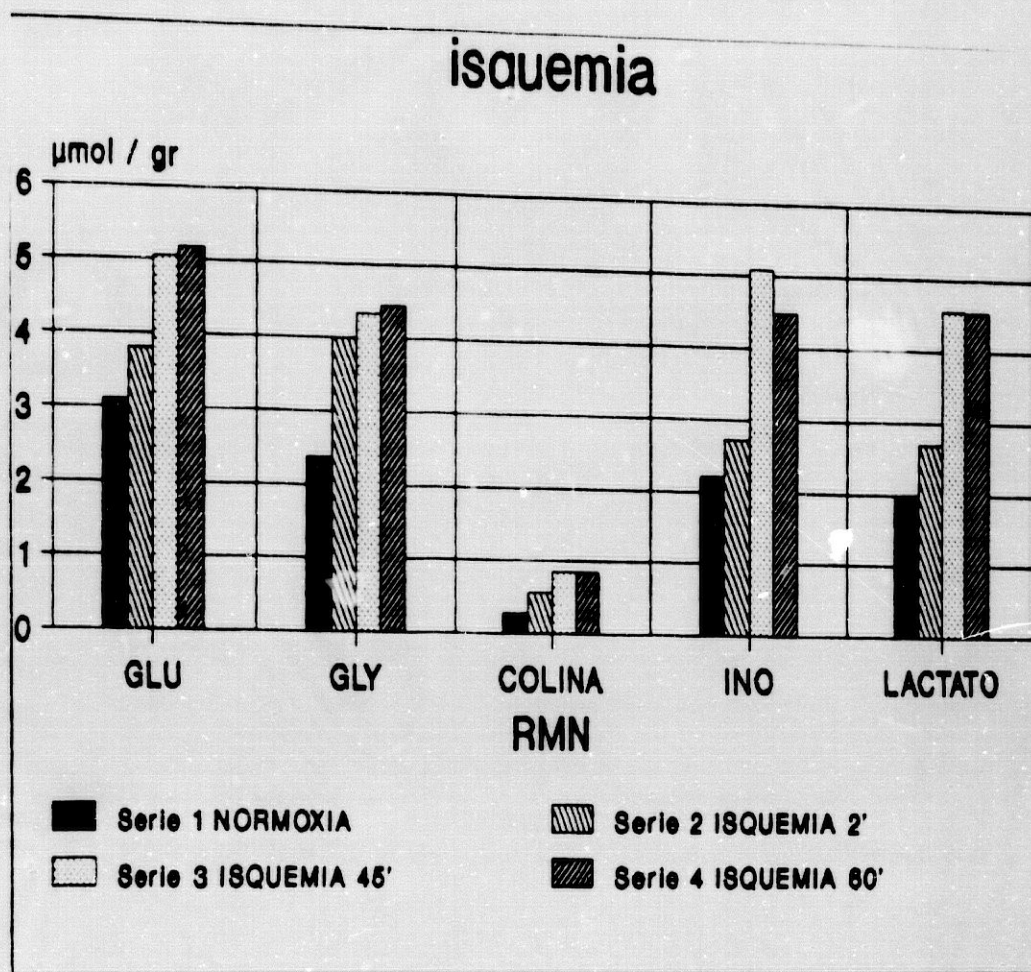
Lactato ---> 130% (P<0,01)

La evolución entre los distintos tiempos de isquemia fue, asimismo, la siguiente (Gráfica IV.2):

a) La Gly y el lactato incrementan sus valores a los dos minutos y mantienen este ascenso a los 45' y 60'.

b) El Glu y la colina incrementan a los 45' y mantiene los valores a los 60'.

c) El Inositol incrementa sus valores a los 45' y tiende al descenso a los 60', pero con niveles significativamente superiores a los niveles normóxicos.



GRAFICA IV.2- METABOLITOS DETERMINADOS MEDIANTE ¹H RMN EN EXTRACTOS EN TAMPON FOSFATO Y QUE HAN MODIFICADO SUS VALORES POR EFECTO DE LA ISQUEMIA.

1.3- VALORES DETERMINADOS POR ¹H RMN EN LOS EXTRACTOS PERCLORICOS DE TEJIDO RENAL.

Los extractos en ácido perclórico son un método clásico empleado en la determinación de múltiples metabolitos tisulares, incluidos los energéticos, por su capacidad de destruir de un modo eficaz y precoz la actividad enzimática evitando la degradación de los elementos bioquímicos acumulados.

En la tabla IV.3 se recogen los metabolitos cuantificados mediante $^1\text{H RMN}$ en extractos perclóricos de tejido renal.

TABLA IV.3- EVOLUCION DE LOS METABOLITOS DETERMINADOS MEDIANTE $^1\text{H RMN}$ EN LA ISQUEMIA RENAL INDUCIDA POR CLAMPAJE DEL PEDICULO RENAL (extractos perclóricos).

METABOLITOS	NORMOXIA	ISQUEMIA		
		2 MINUTOS	45 MINUTOS	60 MINUTOS
1-GLUTAMICO	1,57±0,13	2,15±0,20	3,78±0,07*	3,15±0,13*
2-ALANINA	0,75±0,04	0,84±0,07	0,95±0,16	0,94±0,02
3-COLINA	0,38±0,11	0,40±0,03	0,75±0,05*	0,93±0,08*
4-GPC	2,01±0,23	2,20±0,17	2,46±0,24	2,25±0,18
5-BETAINA	1,26±0,09	1,16±0,13	1,52±0,18	1,15±0,13
6-INOSITOL	3,14±0,16	4,04±0,16*	5,47±0,18*	4,61±0,14*
7-TAURINA	1,69±0,08	1,96±0,14	2,26±0,21	1,80±0,21
8-SUCCINATO	0,40±0,04	1,01±0,10*	1,55±0,11*	1,43±0,09*
9-PIRUVATO	0,17±0,02	0,16±0,01	0,29±0,01	0,23±0,01
10-CREATINA	1,36±0,25	1,25±0,29	1,10±0,16	1,12±0,04
11-LACTATO	1,51±0,16	2,05±0,06	5,38±0,44*	5,13±0,31*

-Los valores corresponden a la media \pm error standard de cinco datos individuales (salvo colina, Tau y Cr que corresponden a cuatro) y vienen expresados en $\mu\text{mol/gr}$ de tejido húmedo.

-Diferencias significativas con respecto a los niveles normóxicos:

* P < 0,01 † P < 0,05

-La Gln y la Gly no se han cuantificado por estar sobre una línea base muy alterada.

Al contrastar estos resultados con los obtenidos en los extractos fosfato, encontramos niveles inferiores en el contenido de algunos aminoácidos, pero niveles superiores en el contenido de osmolitos, lo que debe reflejar que la actividad de diversas enzimas, proteasas entre ellas, no se detiene en los extractos fosfato, a pesar de las precauciones de trabajar en cámara fría y proceder al inmediato filtrado de las muestras.

En la figura IV.2 (A-D) se representan los espectros del riñón normóxico y en distintos tiempos de isquemia.

Los valores determinados mediante ^1H RMN en los extractos perclóricos de tejido renal evolucionan del siguiente modo con respecto a los niveles normóxicos (Gráfica IV. 3):

-A los 2 minutos de isquemia:

*Incrementan sus valores:

Inositol ---> 28% ($P < 0,01$)

Succinato ---> 152% ($P < 0,01$)

-A los 45 minutos de isquemia:

*Incrementan sus valores:

Glu ---> 140% ($P < 0,01$)

Colina ---> 97% ($P < 0,01$)

Inositol ---> 74% ($P < 0,01$)

Succinato ---> 287% ($P < 0,01$)

Lactato ---> 256% ($P < 0,01$)

-A los 60 minutos de isquemia:

*Incrementan sus valores:

Glu ---> 100% ($P < 0,01$)

Colina ---> 144% ($P < 0,01$)

Inositol ---> 46% ($P < 0,01$)

Succinato ---> 257% ($P < 0,01$)

Lactato ---> 239% ($P < 0,01$)

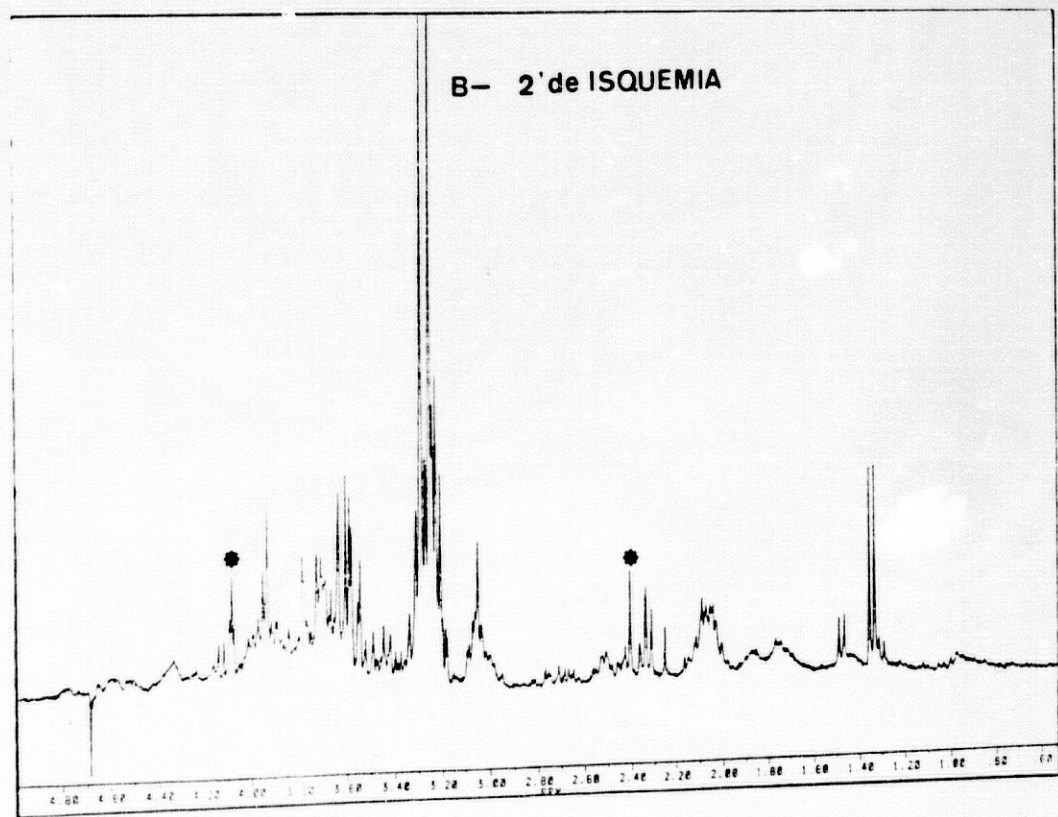
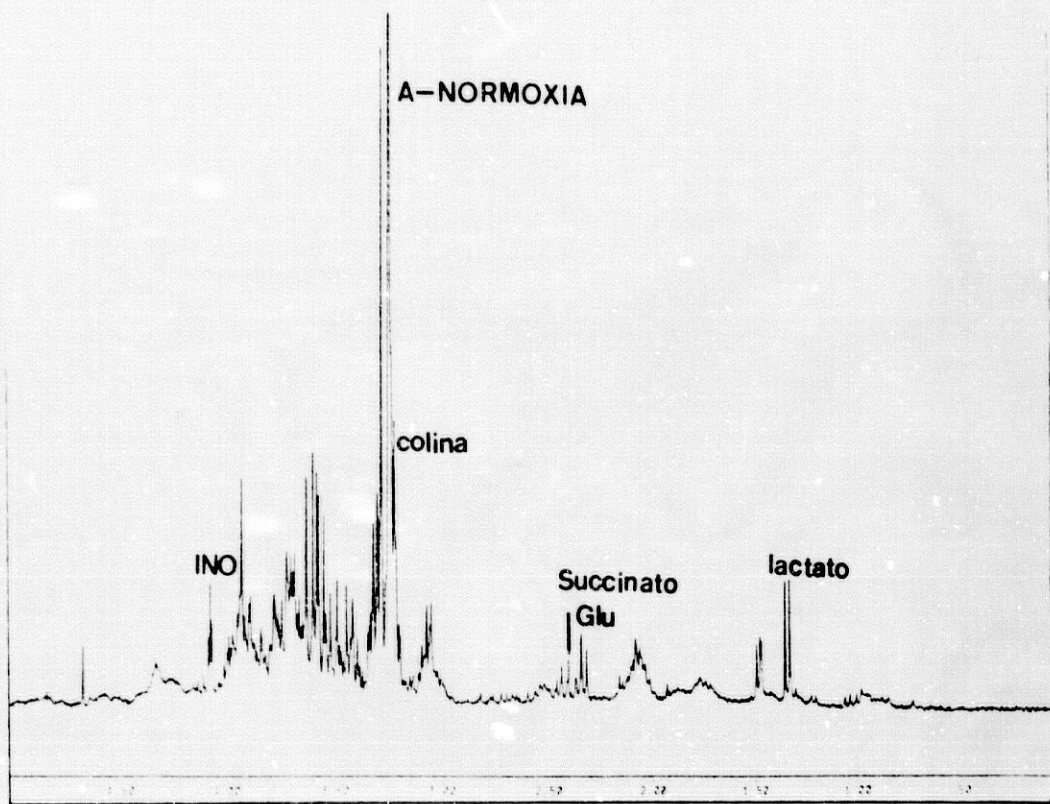
Fig. IV.2 A-D (Pgs 101-102):

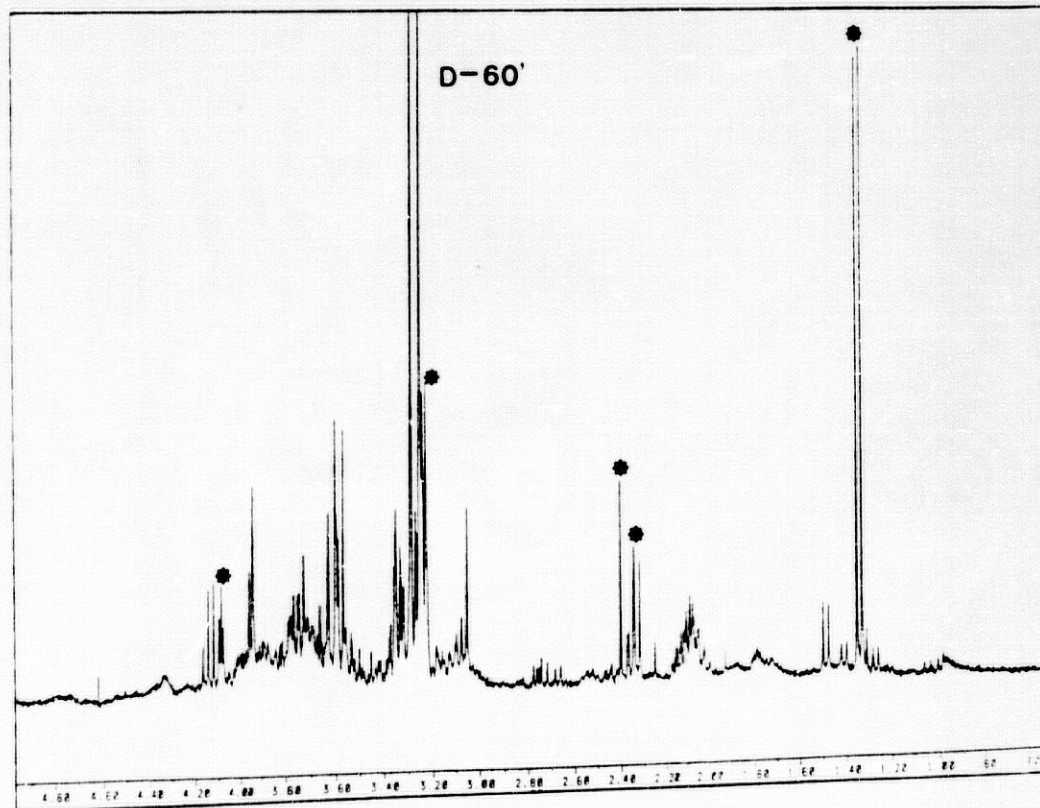
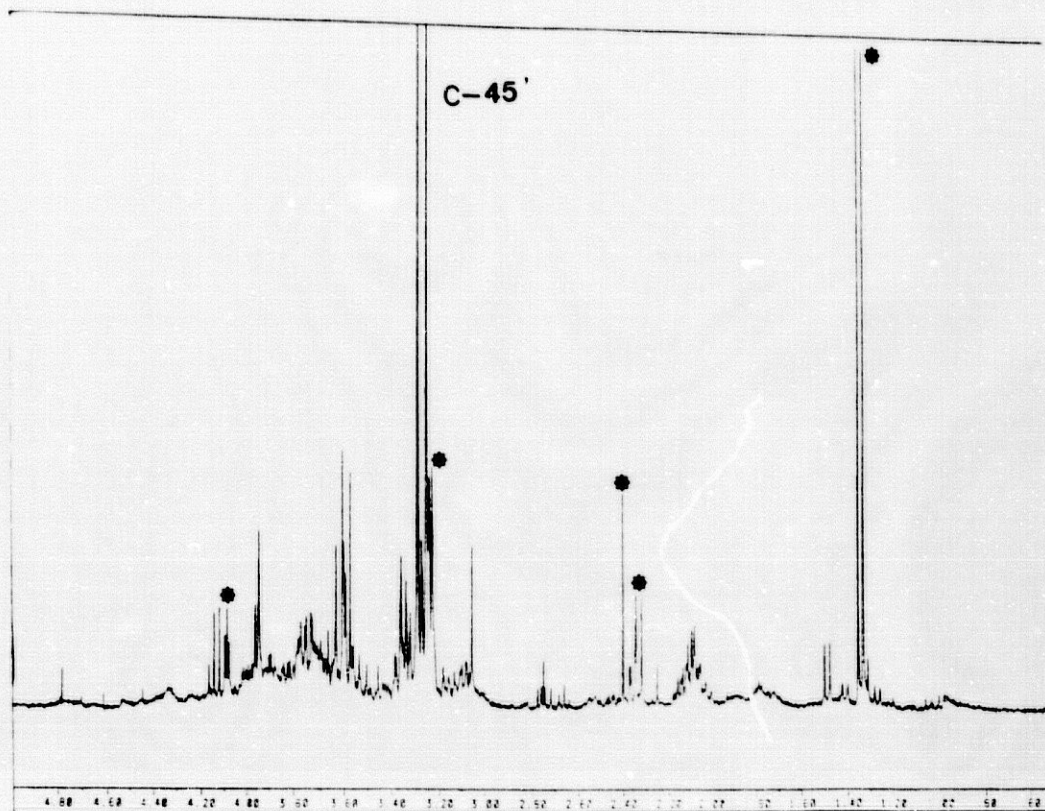
A- Espectro ^1H RMN de extracto perclórico de riñón de rata normóxica. Se señalan aquellos metabolitos que han incrementado sus niveles de modo significativo.

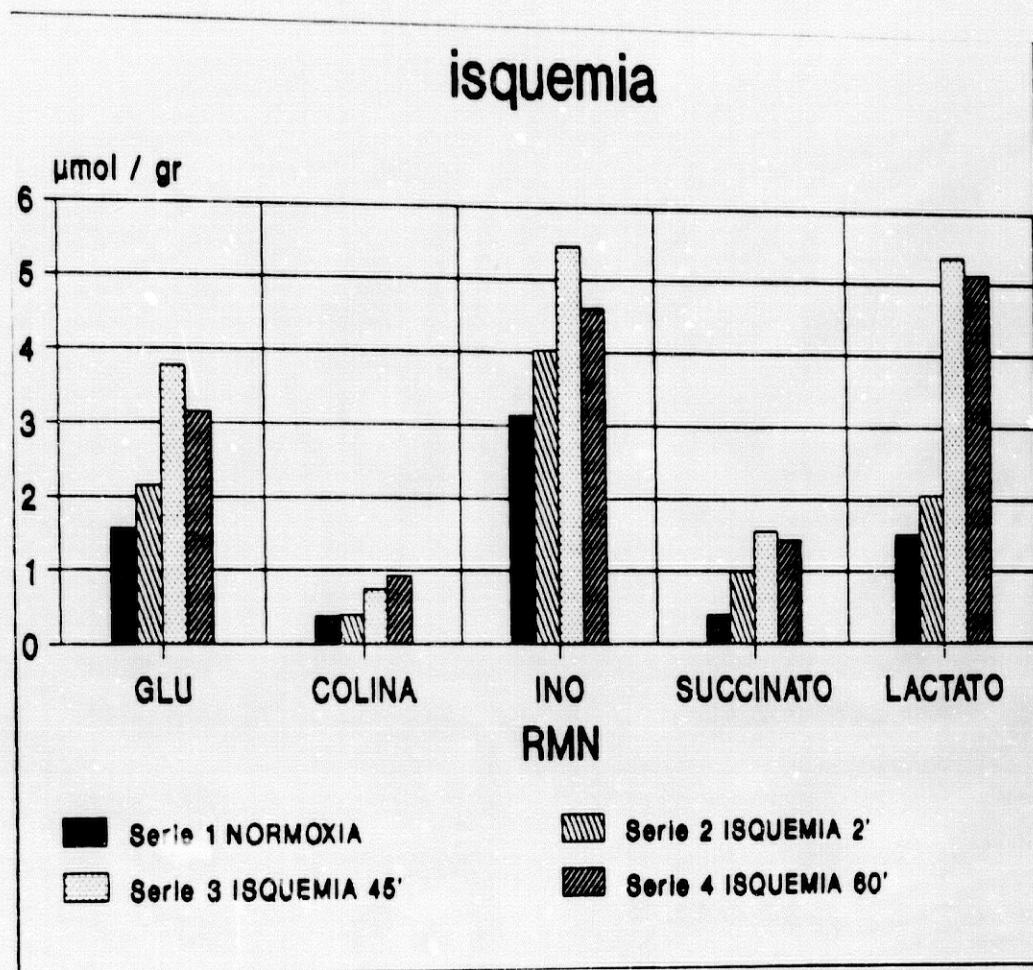
B- Espectro a los 2 minutos de isquemia. Se señalan las modificaciones significativas.

C- Idem, a los 45 minutos de isquemia.

d- Idem, a los 60 minutos de isquemia.







GRAFICA IV.3- METABOLITOS DETERMINADOS MEDIANTE ¹H RMN EN EXTRACTOS PERCLORICOS DE TEJIDO RENAL Y QUE HAN MODIFICADO SUS VALORES POR EFECTO DE LA ISQUEMIA.

La evolución entre los distintos tiempos de isquemia es la siguiente (Gráfica IV. 3):

a) El Glu alcanza su nivel máximo a los 45' y tiende a descender a los 60' (P<0,05).

b) La colina, el succinato y el lactato alcanzan unos niveles máximos y estadísticamente similares a los 45'-60'.

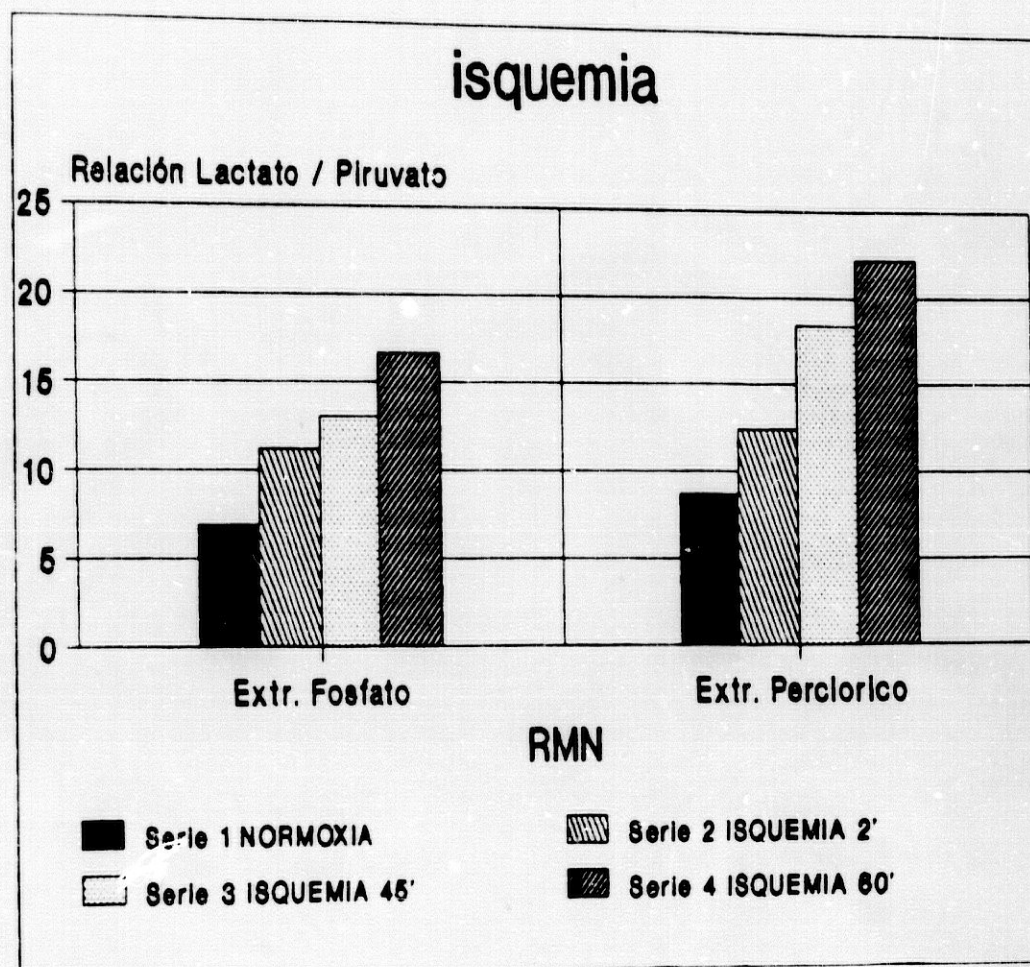
c) El inositol alcanza su nivel máximo a los 45' y tiende a descender a los 60' ($P < 0,05$).

Fue interesante observar el incremento progresivo con la isquemia de la relación lactato/piruvato (Tabla IV.4). Esta relación ha sido utilizada en estudios previos como indicador fiable de la adecuada oxigenación del riñón (Hems y Brosnan 1970). Expresa el estado de oxidoreducción intracelular, siendo inversamente proporcional al cociente $NAD^+/NADH$ (Lemieux y cols 1980), cuyo descenso en la isquemia se provoca no sólo por la privación de O_2 , sino por la oxidación de los subproductos de las membranas celulares, fundamentalmente ácidos grasos, cuyo incremento en la isquemia se ha demostrado de un modo fehaciente (Humes y cols 1989).

TABLA IV.4- Evolución de la relación Lactato/piruvato durante la isquemia.
Diferencias significativas con respecto a los niveles normóxicos: * : $P < 0,01$ # : $P < 0,05$.

	NORMOXIA	ISQ-2 min	ISQ-45 min	ISQ-60 min
EXTRACTOS-FOSFATO:	$6,89 \pm 0,68$	$11,26 \pm 0,4^*$	$13,06 \pm 0,6^*$	$16,71 \pm 1,8^*$
EXTRACTOS-PERCLOR.:	$8,71 \pm 0,64$	$12,42 \pm 0,9$	$18,40 \pm 0,8^*$	$22,20 \pm 2,1^*$

La evolución de la relación lactato/piruvato fue una progresión ascendente en ambos métodos de extracción (Gráfica IV. 4), aunque los valores encontrados a los 45 y 60 minutos no fueron diferentes desde el punto de vista estadístico, lo que puede significar una estabilización en dicho incremento.



GRAFICA IV.4- REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA EVOLUCION CON LA ISQUEMIA DEL COCIENTE LACTATO / PIRUVATO CON LOS DOS METODOS DE EXTRACCION UTILIZADOS.

2.-VALORACION DE LOS METABOLITOS RENALES TRAS LA HIPOXIA Y LA ACIDOSIS INDUCIDA MEDIANTE 7'DE ASFIXIA.

Como el contenido en proteínas de los extractos de riñón normóxico ($1,14 \pm 0,05$ mgr/cc) fue significativamente distinto al contenido de proteínas de los extractos en riñón acidótico ($0,78 \pm 0,04$ mgr/cc) hemos considerado adecuado ofrecer los valores obtenidos tanto por gramo de tejido como por

contenido de proteínas (Tabla IV. 5). Este hecho se ha descrito también en ratas deshidratadas que han perdido peso corporal (Gullans y cols 1988). Nosotros no hemos podido determinar la causa exacta de este hallazgo o su posible relación con el stress al que ha sido sometida la rata.

2.1- VALORES DETERMINADOS MEDIANTE HPLC.

TABLA IV. 5- VALORES DE LOS AMINOACIDOS DETERMINADOS POR HPLC EN RATAS NORMOXICAS E HIPOXICAS (ACIDOSIS).

METABOLITOS	$\mu\text{mol/gr}$ de tej. húmedo		nmol/mgr de proteína	
	NORMOXIA	ACIDOSIS	NORMOXIA	ACIDOSIS
1-ASP (10)	1,91 \pm 0,17	0,57 \pm 0,20#	167 \pm 14	73 \pm 25*
2-GLU (10)	3,84 \pm 0,32	2,74 \pm 0,25¥	336 \pm 28	351 \pm 32
3-ASN (10)	2,00 \pm 0,21	2,18 \pm 0,30	175 \pm 18	279 \pm 38¥
4-SER (10)	1,87 \pm 0,16	2,52 \pm 0,42	164 \pm 14	323 \pm 53¥
5-GLN (10)	1,49 \pm 0,13	0,66 \pm 0,08#	130 \pm 11	84 \pm 10*
6-ARG (10)	1,15 \pm 0,20	0,99 \pm 0,12	100 \pm 17	26 \pm 15
7-ALA (10)	2,31 \pm 0,38	2,85 \pm 0,43	202 \pm 33	288 \pm 55
8-TIR (7)	0,37 \pm 0,09	1,10 \pm 0,25æ	32 \pm 07	141 \pm 32#
9-TRP (8)	0,12 \pm 0,02	0,42 \pm 0,14	10 \pm 01	53 \pm 17¥
10-MET (7)	0,29 \pm 0,14	0,43 \pm 0,09	25 \pm 12	55 \pm 11
11-VAL (9)	0,49 \pm 0,18	0,41 \pm 0,21	42 \pm 15	52 \pm 26
12-PHE (10)	1,09 \pm 0,32	0,39 \pm 0,06¥	95 \pm 28	50 \pm 07
13-ILE (10)	0,50 \pm 0,14	0,75 \pm 0,32	43 \pm 12	96 \pm 41
14-LEU (10)	1,46 \pm 0,20	0,56 \pm 0,19*	129 \pm 17	71 \pm 24
15-LIS (10)	0,69 \pm 0,16	1,08 \pm 0,34	60 \pm 14	138 \pm 43

-Los valores corresponden a la media de (n) datos individuales \pm error standard de la media.

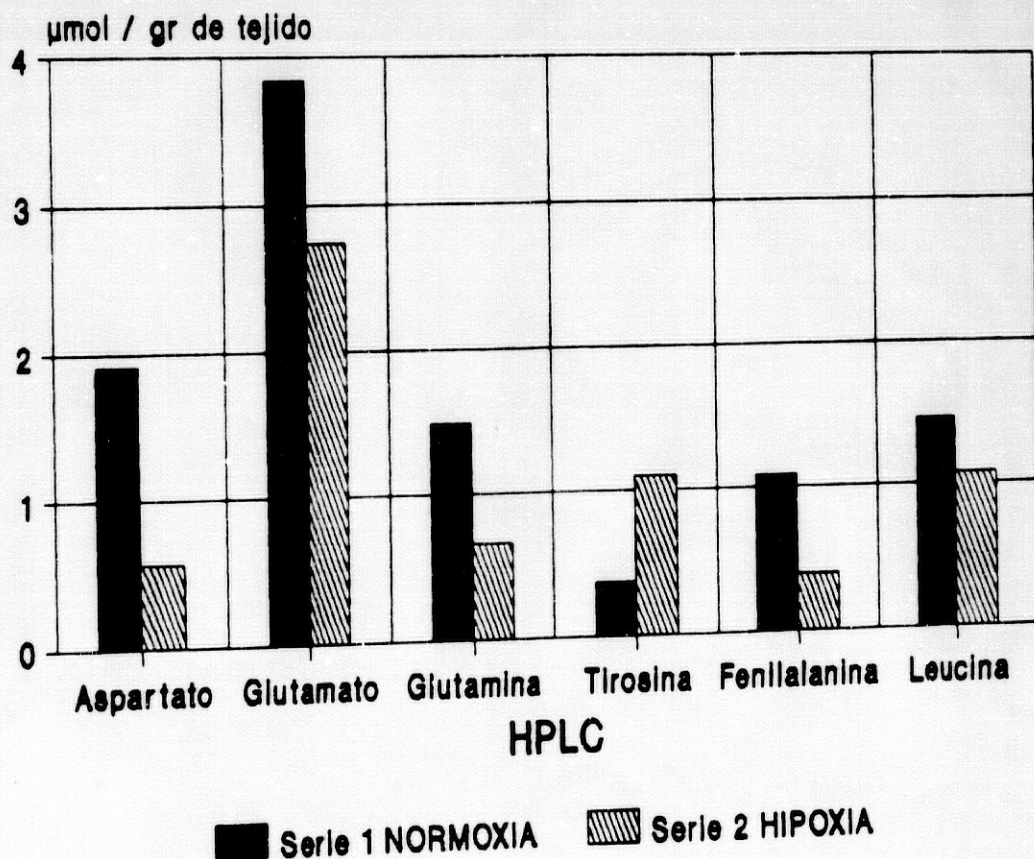
-Diferencias significativas con respecto a los valores normóxicos:

P < 0,001 * P < 0,01 æ P < 0,02 ¥ P < 0,05.

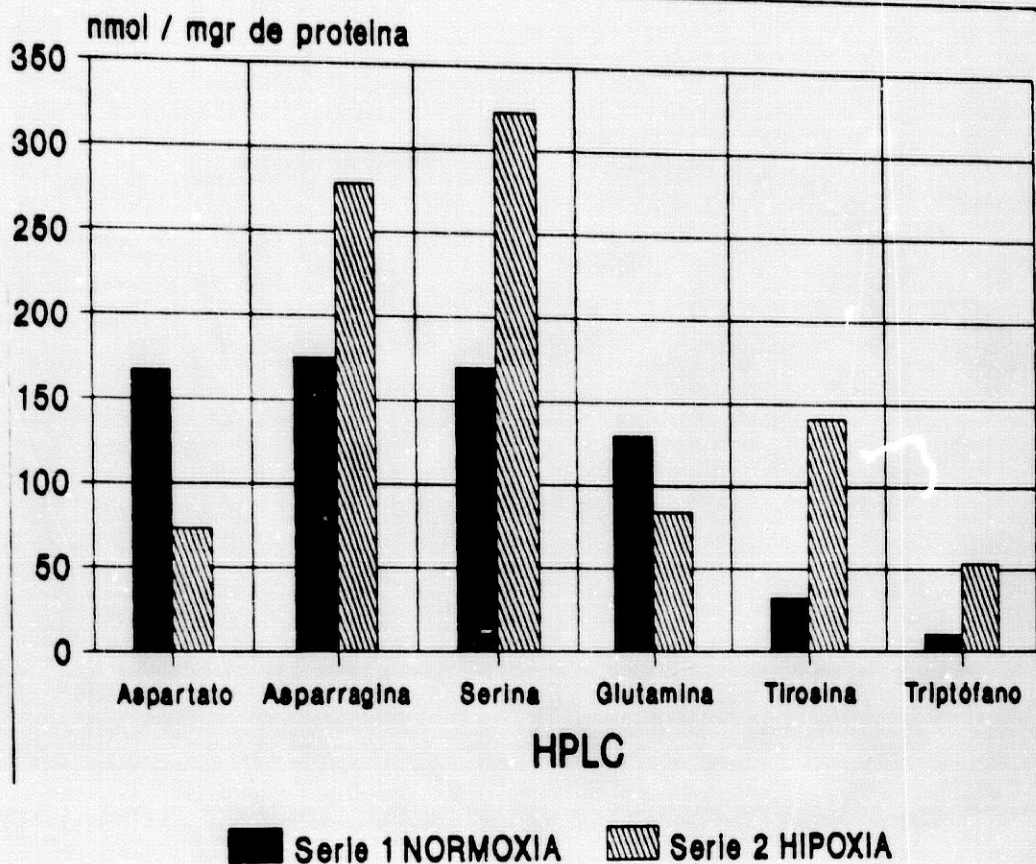
Las concentraciones de los aminoácidos en la acidosis inducida, determinadas mediante HPLC, se modificaron del siguiente modo:

a) cuando expresamos los valores en $\mu\text{mol} / \text{gr}$ de tejido húmedo se produjo un descenso significativo de Asp ($P < 0,001$), Glu ($P < 0,05$), Gln ($P < 0,001$), Phe ($P < 0,05$) y Leu ($P < 0,01$), así como un incremento de Tir ($P < 0,02$) (Gráfica IV. 5 A).

b) Cuando expresamos los valores en nmol / mgr de proteína sólo fue significativo el descenso de Asp ($P < 0,01$) y Gln ($P < 0,01$) y los incrementos de ASN ($P < 0,05$), Ser ($P < 0,01$), Tir ($P < 0,001$), Trp ($P < 0,05$) (Gráfica IV. 5 B).



GRAFICA IV- 5 A. METABOLITOS DETERMINADOS POR HPLC Y QUE HAN MODIFICADOS SUS NIVELES POR EFECTO DE LA HIPOXIA Y LA ACIDOSIS ($\mu\text{mol} / \text{gr}$ de tejido húmedo).



GRAFICA IV- 5 B. AMINOACIDOS DETERMINADOS MEDIANTE HPLC Y QUE HAN MODIFICADO SUS NIVELES POR EFECTO DE LA HIPOXIA Y LA ACIDOSIS (nmol/mgr proteína).

2.2 VALORES DETERMINADOS MEDIANTE ¹H RMN (Extractos en tampón fosfato).

Cuando estudiamos estas muestras mediante espectroscopia de protones pudimos comparar una pequeña parte de los aminoácidos con los estudiados en HPLC, así como, junto a los demás metabolitos observar un comportamiento distinto al de la isquemia por clampaje del pedículo renal (Tabla IV. 6).

TABLA IV. 6- METABOLITOS DETERMINADOS MEDIANTE ¹H RMN EN NORMOXIA E HIPOXIA (ACIDOSIS) (extractos en tampón fosfato).

METABOLITOS	$\mu\text{mol/gr}$ de tej. húmedo		$\mu\text{mol/mgr}$ de proteína	
	NORMOXIA	ACIDOSIS	NORMOXIA	ACIDOSIS
1-GLUTAMICO	3,10 \pm 0,15	2,00 \pm 0,39 \ddagger	271 \pm 13	256 \pm 50
2-GLUTAMINA	1,40 \pm 0,07	0,81 \pm 0,23 \ddagger	122 \pm 06	103 \pm 29
3-GLICINA	2,38 \pm 0,18	2,04 \pm 0,55	208 \pm 15	261 \pm 70
4-ALANINA	2,30 \pm 0,20	1,81 \pm 0,44	201 \pm 17	232 \pm 56
5-COLINA	0,27 \pm 0,08	0,41 \pm 0,26	23 \pm 07	52 \pm 33
6-GPC	1,14 \pm 0,17	0,46 \pm 0,13 \ddagger	100 \pm 14	58 \pm 16
7-BETAINA	0,79 \pm 0,07	0,62 \pm 0,17	74 \pm 06	79 \pm 21
8-INOSITOL	2,21 \pm 0,16	1,20 \pm 0,26 \ddagger	193 \pm 14	153 \pm 33
8-TAURINA	3,62 \pm 0,37	2,51 \pm 0,68	317 \pm 32	321 \pm 87
9-PIRUVATO	0,29 \pm 0,12	0,13 \pm 0,02	25 \pm 10	16 \pm 02
10-CREATINA	0,75 \pm 0,04	0,72 \pm 0,23	65 \pm 03	92 \pm 29
11-LACTATO	1,97 \pm 0,16	1,50 \pm 0,44	172 \pm 14	192 \pm 56
12-LACT/PIR	6,89 \pm 0,68	11,5 \pm 1,17 \ddagger		

-Los valores corresponden a la media \pm error standard de cinco experimentos individuales.

-Diferencias significativas con respecto a los valores normóxicos:

P < 0,001 * P < 0,01 \ddagger P < 0,02 \ddagger P < 0,05.

En la figura IV. 3 se representa un espectro de protones en riñón de rata acidótica.

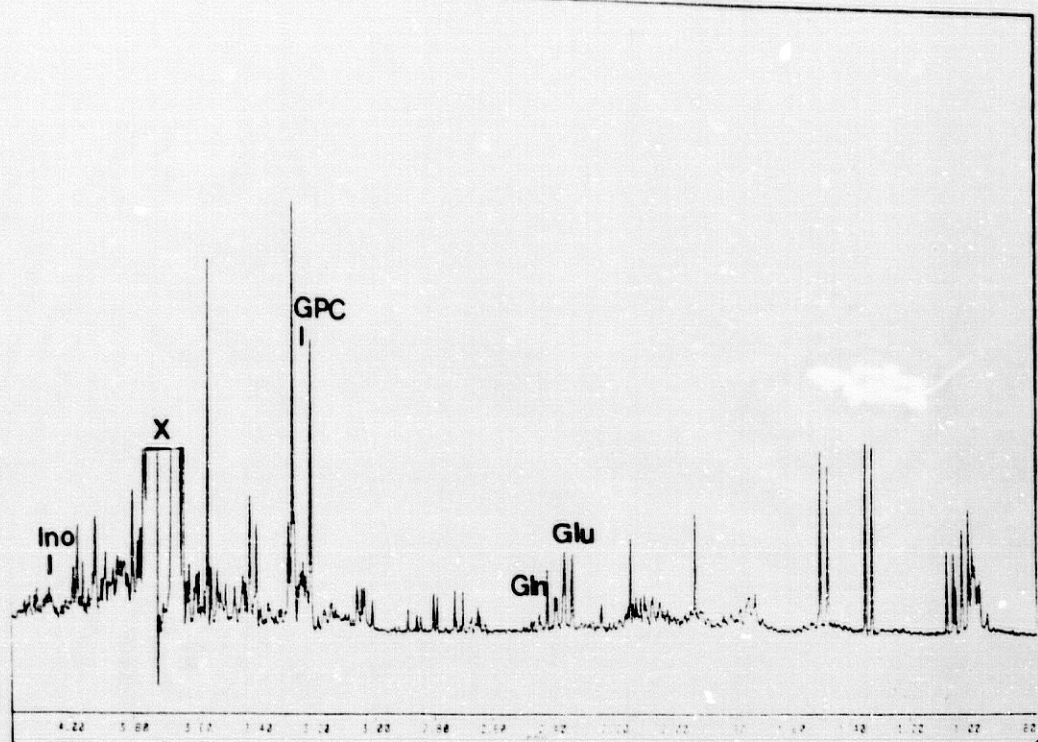
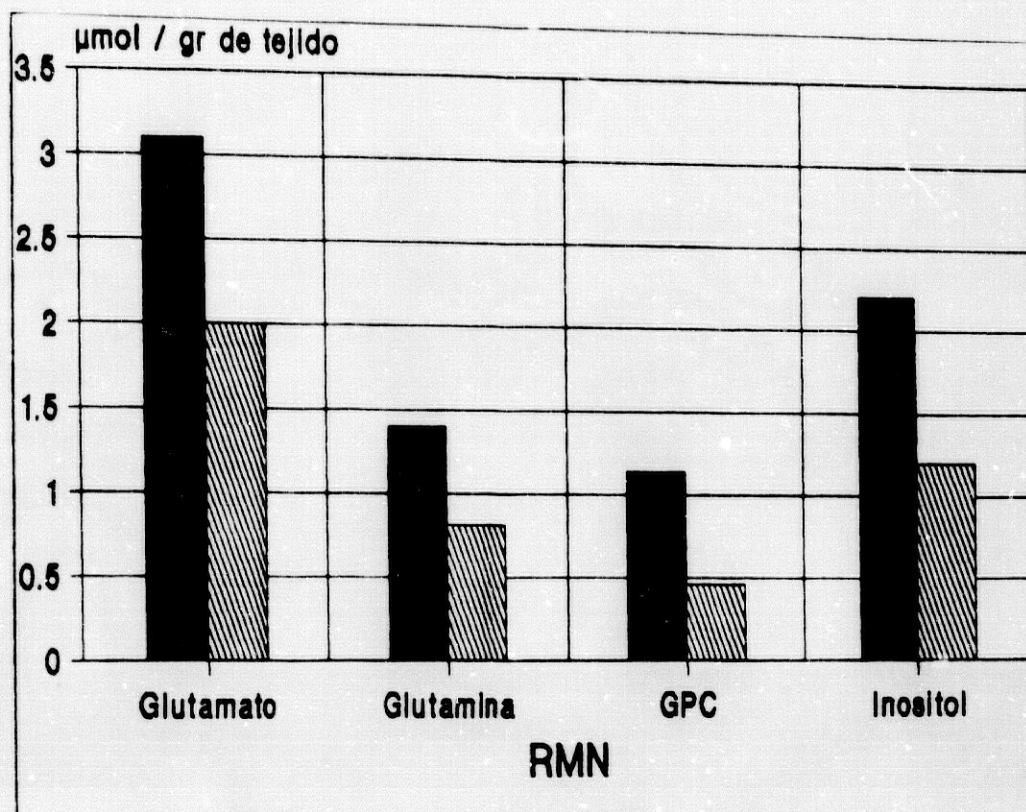


FIG. IV.3- ESPECTRO ^1H RMN DE EXTRACTO RENAL EN RATA HIPOXICA (ACIDOSIS). Se señalan los metabolitos que han modificado sus niveles de un modo significativo. X- Area artefactada por los azúcares de los filtros empleados.

Las modificaciones inducidas por la hipoxia y la acidosis en los niveles de metabolitos determinados mediante ^1H RMN fueron, por otra parte, las siguientes:

-Cuando expresamos los valores en $\mu\text{mol} / \text{gr}$ de tejido se produjo un descenso significativo de los niveles de Glu ($P < 0,05$), Gln ($P < 0,05$), GPC ($P < 0,02$) e Inositol ($P < 0,02$) (Gráfica IV. 6).

-Cuando expresamos las concentraciones en nmol / mgr de proteína no se encontraron diferencias significativas en los metabolitos determinados mediante ^1H RMN para las situaciones normóxica y acidótica.



■ Serie 1 NORMOXIA ▨ Serie 2 HIPOXIA

GRAFICA IV. 6- METABOLITOS DETERMINADOS MEDIANTE ^1H RMN Y QUE HAN MODIFICADO SUS VALORES POR EFECTO DE LA HIPOXIA Y LA ACIDOSIS ($\mu\text{mol/gr}$ de tejido húmedo).

3- CONCENTRACION DE AMINOACIDOS EN SANGRE Y RIÑON DE RATAS NORMOXICA E HIPOXICAS (ACIDOSIS).

La acidosis inducida mediante asfixia de ratas previamente anestesiadas con Ketamina intraperitoneal es de tipo respiratorio, con un componente de acidosis metabólica, probablemente debido a los efectos de la anestesia, ya que las ratas consideradas normóxicas presentaban un descenso de la reserva alcalina. Las medias \pm desviación standard de los datos gasométricos de las ratas normóxicas y acidóticas fueron, respectivamente, las siguientes:

NORMOXIA	HIPOXIA+ACIDOSIS
-pO ₂ : 92 \pm 2,73	-pO ₂ : 47,75 \pm 8,40
-pH: 7,38 \pm 0,005	-pH: 7,05 \pm 0,02
-pCO ₂ : 35,32 \pm 2,34	-pCO ₂ : 57,8 \pm 4,27
-CO ₃ H ⁻ : 18,06 \pm 0,58	-CO ₃ H ⁻ : 16,28 \pm 0,94

Los valores de los aminoácidos determinados en plasma y riñón de ratas normóxicas y acidóticas vienen recogidos en la tabla IV. 7:

TABLA IV. 7- AMINOACIDOS DETERMINADOS MEDIANTE HPLC EN PLASMA Y RIÑON DE RATAS NORMOXICAS E HIPOXICAS (ACIDOSIS). (extractos en tampón fosfato) (El cociente riñón/plasma se obtiene dividiendo el contenido de un determinado aminoácido en riñón por su contenido en sangre):

AMINOACIDO	PLASMA		RIÑON		COC RIÑON/PLASMA	
	NORM.	ACID.	NORM.	ACID.	NORM.	ACID.
1-ASP	3,4	4,2	254,6	76,0	74,8	18,0
2-GLU	5,4	7,1	512,0	365,3	94,8	51,4
3-ASN	5,4	10,2	266,0	290,6	49,2	28,4
4-SER	23,6	38,2	250,3	336,0	11,0	8,7
5-GLN	37,5	34,5	198,6	88,1	5,2	2,7
6-ARG	16,0	26,9	153,3	132,0	9,5	4,9
7-ALA	34,9	68,4	308,0	300,0	8,8	4,3
8-TIR	9,0	11,1	49,3	146,6	5,4	13,1
9-TRP	5,7	3,4	16,0	56,0	2,8	16,4
10-MET	4,2	6,9	38,6	57,3	9,1	8,3
11-VAL	14,2	11,3	86,3	54,6	6,5	4,8
12-PHE	13,9	10,1	145,3	52,0	10,4	5,1
13-ILE	8,4	7,7	76,6	100,0	9,0	12,9
14-LEU	13,1	7,9	194,6	74,6	14,8	9,4
15-LIS	23,8	23,5	92,0	144,0	3,8	6,1

-Los valores sanguíneos son la media de diez experiencias individuales \pm error standard de la media (Para n en riñón ver apartado IV.1) y vienen expresados en $\mu\text{mol}/100$ cc. Para hallar la concentración en tejido renal hemos asignado un valor de 0,75 cc de agua por gramo de tejido (Hems y Brosnan 1970). Las concentraciones en riñón vienen expresadas en $\mu\text{mol}/100$ cc.

El cociente riñón/plasma puede indicar la naturaleza de las modificaciones en la concentración de determinados metabolitos, que pueden ser producidas por su metabolismo intrarrenal o por los intercambios con el plasma sanguíneo.

No ha entrado en nuestros objetivos el comprobar la captación-excreción renal exacta de los diversos aminoácidos, sino demostrar que la persistencia de flujo puede modificar los niveles metabólicos tisulares, condicionando los efectos de la privación de oxígeno.

V- DISCUSSION.

V- DISCUSION.

1.- GENERALIDADES.

El funcionalismo celular de los seres vivos está directamente ligado a fenómenos bioquímicos básicos. Cualquier método que proporcione, por ello, información útil sobre la bioquímica celular y / o tisular de un órgano determinado posee en términos de comprensión y evaluación de funciones, a menudo vitales, considerable importancia (Nunnally 1986).

La RMN se ha introducido, recientemente, en el campo de la medicina clínica (Hendee 1988). Su utilización momentánea se encuentra circunscrita a la obtención de imágenes tomográficas pero, comoquiera que la IRM y otros métodos diagnósticos basados en el análisis de imágenes poseen escaso valor en el estudio de la función tisular (regional o global, según los casos) y la ERM, fundamentalmente el método de medida de fosfatos de elevada energía mediante ^{31}P RMN, se ha revelado eficaz en la detección de cambios bioquímicos elementales asociados con ciertas situaciones de deterioro funcional, he aquí porqué la ERM puede constituir un instrumento de relevante interés para el conocimiento de la enfermedad (Matwiyoff y Wicks 1986).

La utilidad diagnóstica de la espectroscopia protónica está aún por demostrar. Nosotros hemos iniciado el estudio de los fenómenos bioquímicos básicos resultantes de la isquemia mediante ^1H RMN realizada sobre extractos de tejido renal. Nos ha parecido, en efecto, importante realizar un análisis bioquímico detallado de los fenómenos inducidos por la isquemia como paso previo o punto de referencia inicial para la comprensión de futuros experimentos *in vivo*.

Aunque con ^{31}P RMN ya se han realizado estudios con órganos completos (Bogusky y cols 1986; Weiner 1988), con ^1H RMN la experiencia es mucho más limitada. Los escasos trabajos publicados se han realizado sobre cerebro. Inicialmente se trabajó con extractos tisulares (Cerdán y cols 1985) y células intactas (Navon y cols 1983) para, posteriormente, continuar con animales vivos (Behar y cols 1983) e incluso humanos (Bottomley y cols 1984b), utilizando en ocasiones técnicas de localización espacial para la detección de trastornos metabólicos localizados en la sustancia gris o blanca (Narayama y cols 1989).

Desde hace muchos años se vienen utilizando, por otra parte, los extractos perclóricos para la medición de los metabolitos tisulares mediante ensayos enzimáticos y químicos. Nosotros hemos intentado una aproximación fisiológica al conocimiento de la bioquímica renal contrastando el método clásico del extracto perclórico con la extracción tisular en una solución tampón a pH 7,4. Las variaciones inducidas por la isquemia han resultado ser mayoritariamente coincidentes en ambos métodos, especialmente en lo que se refiere a la detección de aquellos metabolitos que, en nuestra opinión, pueden tener mayor relevancia clínica. La extracción en solución tampón nos ha permitido además el estudio, mediante RMN, de muestras tisulares complejas, no filtradas o no centrifugadas. Ha sido posible, de esta manera, determinar qué tipo de metabolitos quedan detectados con la mayor fiabilidad.

Este segundo método nos ha permitido el estudio gradual mediante RMN de muestras más complejas, no filtradas o no centrifugadas, para comprobar qué metabolitos eran resueltos con claridad.

2-ASIGNACION DE RESONANCIAS.

La asignación de valor de resonancia a los distintos osmolitos renales (GPC, Betaina, inositol), al piruvato, al succinato, la taurina, la glicina y la colina se ha realizado en coincidencia con los datos existentes en la literatura (Balaban y Burg 1987; Endre y Kuchel 1985; Gullans y cols 1988). Nuestros espectros han demostrado poseer, sin embargo, mayor resolución y picos mejor definidos (junto con el hallazgo de otros nuevos) que los publicados hasta ahora.

Los desplazamientos químicos de los aminoácidos encontrados en tejido renal isquémico han coincidido básicamente con los valores de resonancia previamente referidos para ellos en otros órganos, principalmente cerebro (Cerdán y cols 1985), Hígado (Cerdán y cols 1988), intestino (Quirk y cols 1989), y células tumorales (Evanochko y cols 1984b). Como no teníamos valores de referencia previos en tejido renal, salvo para glicina, hemos optado, en nuestro estudio, por su confirmación mediante el análisis de soluciones modelo que contenían los distintos aminoácidos en variables grados de concentración.

3-CUANTIFICACION DE LOS ESPECTROS POR RMN.

Gullans y cols (1988) han cuantificado diversos metabolitos en espectros ^1H RMN de extractos perclóricos de tejido renal. Nuestros resultados coinciden con los suyos en lo que a los valores de inositol y de creatina encontrados se refiere. Los niveles de Betaina han resultado ser, en cambio, inferiores (1.4 ± 0.07 vs. 2.8 ± 0.6). Otros autores han obtenido resultados equivalentes (Cohen 1986; Endre y Kuchel 1985; Yancey y cols 1982). Los valores de GPC han resultado ser, igualmente, muy inferiores a los reportados por Gullans y

cols (1988) (2.01 ± 0.23 vs. 6.4 ± 0.4), circunstancia que puede ser debida a diversos factores: la distinta concentración de perclórico empleada para hacer el extracto, la mayor resolución de nuestros espectros (que evita contribuciones anómalas de señales adyacentes) y la diferente dieta de las ratas, entre otros. En cambio, son similares a los cuantificados por otros autores mediante ^{31}P RMN (Wolff y cols 1988).

En cuanto al contenido de aminoácidos, sólo hemos encontrado referencias en la literatura con respecto al Asp, Glu, Gln, Ala, Ser, Gly (Bogusky y cols 1983, Hems y Brosnan 1970, Pitts y cols 1970, Vargas 1978). Los niveles reportados son similares a los encontrados en nuestros dos métodos de extracción, salvo el glutamato, cuyo valor ha sido bajo en nuestros extractos perclóricos.

Aunque nosotros no lo hemos intentado en este trabajo, sería interesante para futuras investigaciones averiguar la contribución espectral individual de distintos metabolitos: carnitina, colina, PC, GPC, sorbitol, inositol etc., así como conocer su distribución en el espesor del tejido renal (córTEX, médula externa, médula interna, papila) o en los distintos compartimentos celulares (mitocondria, citosol, retículo endoplásmico). En esta labor de investigación básica puede ser potencialmente útil la espectroscopia de ^{13}C .

4-EFECTOS DE LA ISQUEMIA EN EL CONTENIDO METABOLICO RENAL (Fig. V.1).

Las células renales necesitan grandes cantidades de energía para mantener la homeostasis de los fluidos corporales, así como el balance de electrolitos. El dador principal de energía es el ATP, mediante su hidrólisis a ADP

y Pi. Su síntesis se produce acoplada a la oxidación de diferentes sustratos respiratorios (Hinkle y Mc Carty 1978; Wirthensohn y Guder 1986). La adecuada utilización de los sustratos para el metabolismo renal exige un aporte adecuado de oxígeno que actúa como aceptor final en la cadena transportadora de electrones mitocondrial con la concomitante formación de ATP en el proceso de la fosforilación oxidativa.

Aunque la respiración mitocondrial esté regulada por una gran variedad de mecanismos, en muchos casos asociados a cambios hormonales, cuando la concentración de O₂ disminuye por debajo de valores críticos se produce una inhibición de la respiración (Brand y Murphy 1987), debido a que la actividad citocromo C oxidasa resulta limitada por la baja disponibilidad de O₂ (Hummerich y cols 1988). Por este motivo, durante la isquemia, la demanda de energía excede la capacidad de producción de ATP, por lo que este es convertido en ADP, AMP y Adenosina con la liberación de Pi (Waarde y cols 1989).

Los enzimas fosfofructoquinasa y piruvato quinasa, principales responsables del control de la glucólisis, se activan fuertemente en respuesta a la disminución de la carga energética, con lo que este proceso resulta acelerado con el consecuente incremento en la producción de lactato (Hems y Brosnan 1970).

En nuestro trabajo, se demuestra un incremento con la isquemia de la relación lactato/piruvato (Tabla IV. 4) indicativo de una progresiva reducción citoplasmática, que se acompaña también de un acúmulo de H⁺ con disminución del pH (Bergstron y cols 1981). La concentración creciente de lactato es expresión del flujo de la glucosa a través de la glucólisis, pero conforme se prolonga la anoxia, la caída de pH inhibe dicha glucólisis a nivel de la PFK (Hand y Somero 1982). Paradójicamente, esta inhibición no provoca de entrada

una disminución del lactato, sino que, gracias al acúmulo protónico, su concentración se eleva por acción de la LDH sobre el piruvato (Somero 1980). La significativa reducción citoplasmática de la relación $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$ es evidente por el incremento de la relación lactato / piruvato (Lemieux y cols 1980).

Una consecuencia importante de la isquemia es la elevación del Ca^{++} en el citosol, como consecuencia de la depolarización de la membrana plasmática y de la salida del ión del sistema reticuloendotelial. La consiguiente activación de las fosfolipasas induce una rotura lipídica con acúmulo de subproductos que juegan un papel importante en el insulto isquémico (Humes y cols 1989).

La elevación del contenido de ácidos grasos, así como de los correspondientes Acil-CoA es, por otra parte, consecuencia de que la oxidación de estos compuestos en condiciones isquémicas se vea rápidamente inhibida, debido a la necesidad de utilizar el sistema de nucleótidos difosfopiridínicos, lo que resultaría en una disminución de la disponibilidad de NAD^+ .

Los ácidos grasos, además, impiden a su vez el metabolismo oxidativo del lactato en los túbulos renales (Wiedemann y Krebs 1969) por inhibición del enzima piruvato deshidrogenasa, que en condiciones no isquémicas, permitiría la oxidación del lactato (Guder y Wieland 1972; Baverel y cols 1980).

Las mitocondrias pueden actuar como amortiguadores del Ca^{++} citosólico (Mc Cormack y cols 1990), induciendo un incremento en la permeabilidad de la membrana interna, que puede llegar a producir la apertura de un poro proteico que permite el paso de moléculas de hasta 2.000 Da a través de la membrana (Al-Nasser y Crompton 1986; Crompton y cols 1987).

La apertura de este poro puede tener consecuencias severas y puede ser responsable de la necrosis celular en condiciones de isquemia- reperusión y / o stress oxidativo.

El incremento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna como consecuencia de la elevación de Ca^{++} , es potenciado fuertemente por la presencia de ácidos grasos o de sus ésteres (Mittnacht y Farber 1981), por lo que en condiciones isquémicas caben esperarse graves alteraciones de la función mitocondrial.

En nuestras condiciones experimentales, la elevación de los niveles de glutamato y succinato, a igual que la disminución en el tejido renal de los intermediarios de la gluconeogénesis (Hems y Brosnan 1970), pueden explicarse dentro de este contexto.

Respecto a la gluconeogénesis, la elevada relación $NADH/NAD^+$ citosólica, se traduce en un aumento de la relación malato / oxalacetato. La menor concentración de oxalacetato en este compartimento puede dificultar la utilización del esqueleto carbonado de la glutamina tanto para la gluconeogénesis como para su oxidación (Bowman 1966, Hanson y Garber 1972).

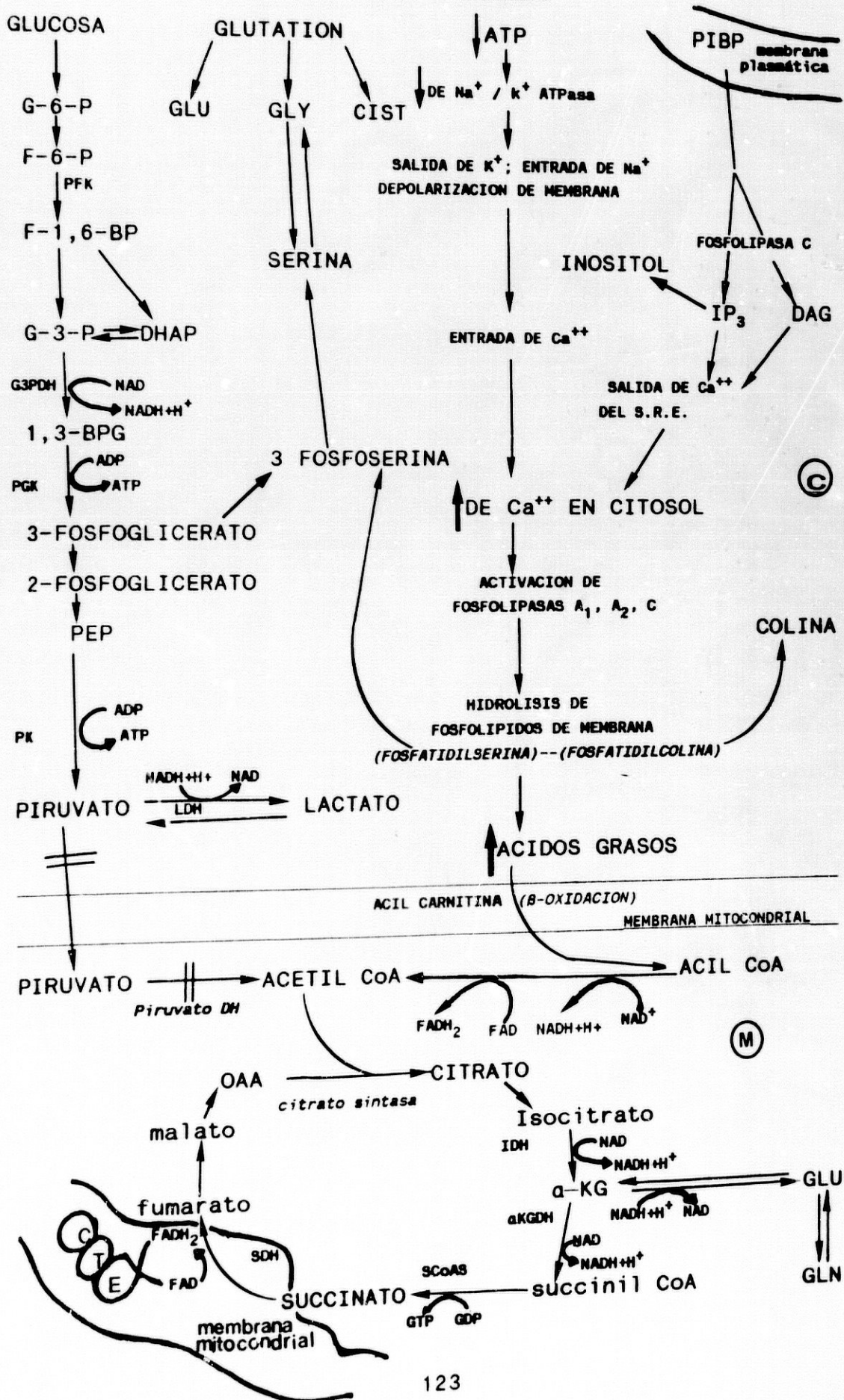
Además, la elevación de los ácidos grasos, principalmente el ácido oleico, junto al lactato, inhiben el metabolismo tubular de la glutamina disminuyendo la formación de amonio y glucosa a partir de este aminoácido (Guder y Wirthensohn 1979). Bajo estas circunstancias, la disminución de la producción de amonio por el riñón puede explicar el acúmulo de Glutamato, demostrado *in vitro* (Vinay y cols 1976). Este efecto, que se observó primero en perros (Lemieux y cols 1979), también es inducido por los cuerpos cetónicos, aunque no se ha demostrado que estos se incrementen durante la isquemia (Lemieux y cols 1980).

Otro factor que produce inhibición de la glutaminasa es el acúmulo de glutamato en el compartimento mitocondrial (Goldstein 1967), pero se ha demostrado que la amoniogénesis se ve disminuida también por la inhibición de otras etapas. El suministro de glutamato como sustrato disminuye la producción de amonio, lo que sugiere que el lugar primario de inhibición es la conversión de glutamato a α -cetoglutarato (Preuss y cols 1978). Aunque existe una ligera disminución en la concentración de Glutamina, no parece ser ésta la principal fuente del incremento del Glutamato. Su discreta disminución probablemente expresa que el efecto inhibitorio de los subproductos acumulados sobre la desaminación de la glutamina, es mucho menor que sobre la desaminación del glutamato (Tannen y Kunin 1982). También, en menor grado, se inhibe la glutamato transaminasa disminuyendo la síntesis de aspartato o alanina a pesar de las elevadas concentraciones de glutamato (Lemieux y cols 1979).

El descenso del tripéptido glutatión, depurador natural de radicales libres, está bien documentado durante la isquemia (Scadutto y cols 1988). La hidrólisis completa del tripeptido produce glutamato, cisteina y glicina (Endre y Kuchel 1985). Al menos en parte, los incrementos en glutamato y glicina se pueden atribuir al metabolismo del glutatión. Aunque en nuestro trabajo no hemos determinado las modificaciones en la concentración de cisteina, si que hemos detectado, en los extractos en tampón fosfato que, aunque no significativamente ($P < 0,10$), los niveles de Taurina se encuentran incrementados. Esto podría ser consecuencia de la degradación de la cisteina procedente del glutatión.

FIG V.1 (Pag. 123)- REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LOS PROCESOS BIOQUIMICOS QUE ACONTECEN EN LA ISQUEMIA. G-6-P: GLUCOSA-6-FOSFATO; F-6-P: FRUCTOSA-6-FOSFATO; F-1,6-P: FRUCTOSA-1,6- BIFOSFATO; G-3-P: GLICERALDEHIDO-3-FOSFATO; DHAP: DIHIDROXIACETONA FOSFATO; PEP: FOSFOENOL PIRUVATO; OAA: OXALACETATO; α KG: α CETOGLUTARATO; PIBP: FOSFOINOSITOL BIFOSFATO; IP₃: INOSITOL TRIFOSFATO; DAG: DIACILGLICEROL; PFK:FOSFOFRUCTOQUINASA; PK: PIRUVATOQUINASA; G3PDH: GLICERALDEHIDO 3 FOSFATO DESHIDROGENASA; IDH: ISOCITRATO DH; SCoAS: SUCCINIL COENZIMA A SINTASA; CTE: CADENA TRANSPORTADORA DE ELECTRONES; C: CITOSOL; M: MATRIZ MITOCONDRIAL.

ISQUEMIA



El efecto protector del glutatión en la isquemia reside predominantemente en su capacidad de servir como fuente de glicina (Weinberg y cols 1989). La glicina actúa como protector en el insulto isquémico contrarrestando los procesos que aceleran la depleción del ATP (Weinberg y cols 1990).

La serina, que también se encuentra incrementada en los extractos de tejido renal isquémico, puede provenir de la glicina, ya que este aminoácido es el mayor precursor para la síntesis de serina en el riñón (Pitts y cols 1970). La reacción está catalizada por la serina transhidroximetilasa, una reacción reversible, aunque la conversión de serina a glicina es menos de la mitad que el paso de glicina a serina.

Otras posibles fuentes de glicina y serina son:

a) El 3-Fosfoglicerato formado por la reducción de la dihidroxiacetonafosfato procedente de la glucólisis.

b) La fosfoserina formada por la reacción de las distintas fosfolipasas con la fosfatidilserina.

En cualquier caso, el papel de la serina en la isquemia y su exacta procedencia requiere futuras investigaciones (Cohen y Kaunin 1981).

Respecto a la elevación de succinato durante la isquemia, podemos pensar que la inhibición causada sobre la α -KG deshidrogenasa sea menor que sobre la succinato deshidrogenasa. El α -KG podría, en parte, proseguir su oxidación en el CAT hasta succinato. Este último flujo se halla favorecido por el pH bajo (Tannen y Kunin 1981) y por la elevada concentración de Ca^{++} intramitocondrial que activa la α -KG deshidrogenasa, disminuyendo la K_m para el α -KG (Rutter y Denton 1988). Probablemente, la gran cantidad de sustrato procedente de los ácidos grasos, unido a que la citrato sintasa es muy activa en ausencia de ATP, posibiliten las primeras reacciones del CAT hasta llegar al succinato donde ya existe un paso difícilmente franqueable en condiciones isquémicas: el enzima succinato deshidrogenasa que cataliza el paso de succinato a fumarato. Este enzima se localiza en la membrana mitocondrial directamente ligado a la cadena transportadora de electrones y por tanto está fuertemente inhibido en ausencia de oxígeno (Devlin 1986).

A los 60' de isquemia, los metabolitos acumulados (lactato, Glu, Ser, Gly, succinato) tienden a estabilizarse o a descender con respecto a los 45' de isquemia. Esto puede ser reflejo de que la maquinaria metabólica empieza a agotarse en ausencia de sustrato, o bien ser reflejo de la caída en la actividad glucolítica provocada por un acúmulo de NADH, H^+ y lactato (Neely y Feuvray 1981).

5-EFECTOS DE LA HIPOXIA PRODUCIDA POR ASFIXIA EN EL CONTENIDO METABOLICO RENAL (Fig. V.2).

Los experimentos en los que se produjo una situación de asfixia sobre las ratas, pretenden demostrar diferencias en la naturaleza y concentración de los metabolitos presentes en el tejido renal respecto de los observados en circunstancias de privación del flujo sanguíneo. La presencia o inhibición de una determinada ruta metabólica en condiciones hipóxicas dependiendo de la magnitud del flujo sanguíneo ha sido confirmada previamente en otros órganos, tales como el corazón (Neely y Feuvray 1981).

Nuestros resultados no son comparables con los modelos de hipoxia pura en los que se produce una depleción de ATP, pero no acidosis tisular (Ratcliffe y cols 1988), puesto que nuestras condiciones experimentales no sólo han inducido en la rata una hipoxemia sino un cuadro de acidosis mixta (respiratoria (elevación de CO_2) y metabólica (disminución de la reserva alcalina)) que pueden condicionar los hallazgos.

La acidosis metabólica en la rata produce un aumento de la formación de amoniaco y glucosa por el riñón (Tannen 1978). La gluconeogénesis se induce por el incremento de la PEPCK que transforma el OAA en fosfoenolpiruvato, pudiendo pasar a glucosa o reentrar en el ciclo de Krebs para su degradación en CO_2 y H_2O (Bennett y Alleyne 1976). La amoniogénesis, en cambio, se inicia antes de que la PEPCK se incremente de modo significativo (Lowry y Ross 1980).

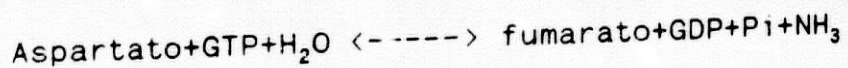
Para algunos autores, el efecto desencadenado en primer lugar por el decremento brusco de pH es la conversión del α -cetoglutarato (α -KG) a succinato por la activación del enzima α -KG DH (Zipp y Tannen 1983). La disminución del α -KG estimula la desaminación del glutamato con producción de

amonio que precede la liberación de NH_3 desde el grupo amida de la glutamina por activación de la glutaminasa (Krebs y Vinay 1975).

Para otros autores, el primer paso en la regulación de la formación de amonio es un aumento de la desaminación de la glutamina, consecuencia de una disponibilidad de este aminoácido en los locus específicos de desaminación (Welbourne y Bazer 1980).

En cualquier caso, en el perfil metabólico de la acidosis, existe acuerdo en considerar que el glutamato y el α -KG disminuyen (Tannen y Sastrasinh 1984). La respuesta de la glutamina es inconsistente: se ha comunicado elevación descenso o ausencia de cambio (Vinay y cols 1982, Boyd y Goldstein 1979, Bennet y Alleyne 1978). De hecho, la información aportada por la medición *in vivo* de los niveles de glutamina puede ser confusa por la presencia en el riñón de rata de gran actividad glutamina sintetasa que puede formar glutamina en presencia de glutamato y amonio libre (Damian y Pitss 1970).

El aspartato puede ser origen de amonio a través de la ruta metabólica del ciclo de los nucleótidos de purina (Boguski y cols 1981). El aspartato procedente de la transaminación del glutamato se convierte en fumarato y libera amonio (Tamura y Endon 1988):



La importancia de este ciclo requiere mayor investigación, ya que la reacción catalizada por la glutamato DH está muy desplazada en la utilización de amoniaco más que en su formación (Lowenstein 1972), lo que puede potenciar la glutamato transaminasa con formación de aspartato.

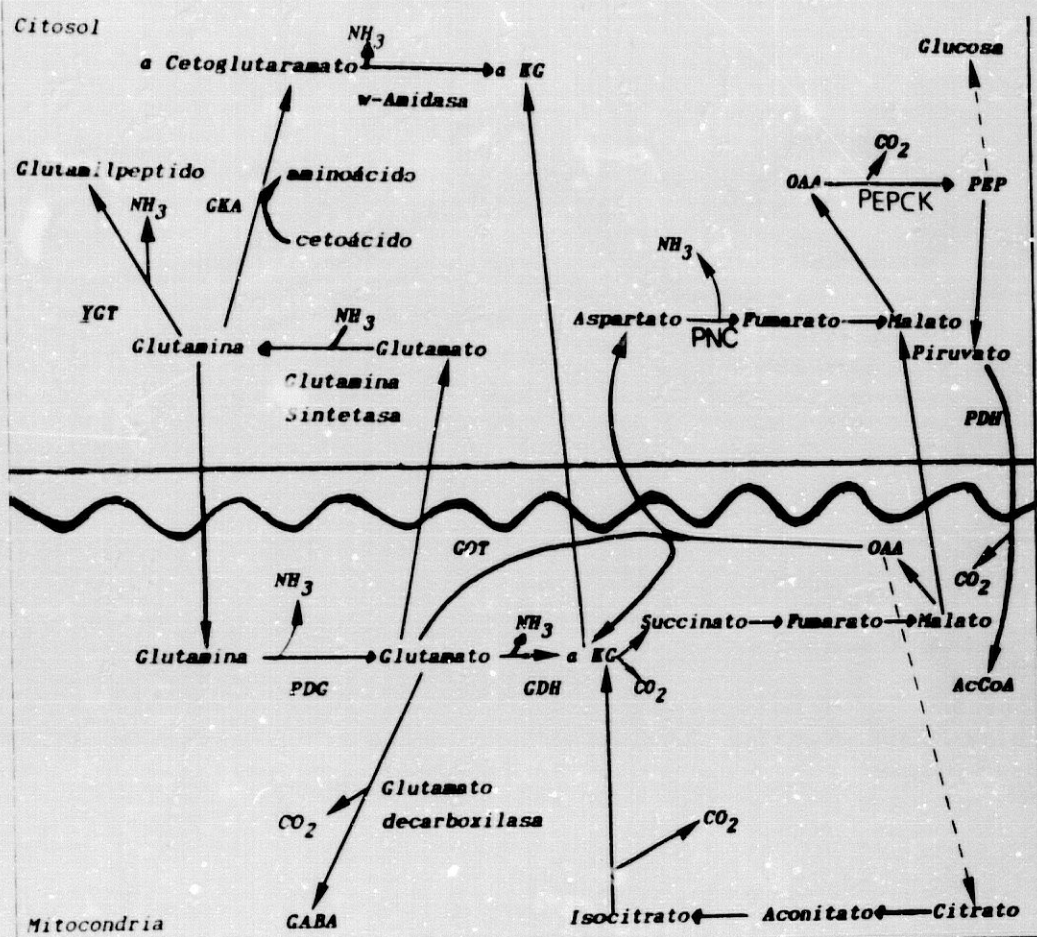


FIG. V. 2- RUTAS DE LA AMONIAGENESIS RENAL (Adaptado de Tannen y Sastrasingh 1984). OAA: oxalacetato. α KG: α Cetoglutarato. Ac CoA: Acetil coenzima A. PEP: Fosfoenolpiruvato. GABA: Acido gamma aminobutirico. GT: gamma glutamil transferasa. GKA: Glutamina cetoácido aminotransferasa. PNC: Ciclo de los nucleótidos de purina. PEPCK: Fosfoenolpiruvato carboxikinasa. PDH: Piruvato deshidrogenasa. PDG: Glutaminasa dependiente de fosfato. GDH: Glutamato deshidrogenasa. GOT: Glutamato oxalacetato transaminasa.

En nuestro trabajo (TABLA v.1) se ha comprobado una disminución significativa de Aspartato, Glutamato y Glutamina. Estos tres aminoácidos han sido los más estrechamente ligados a la amoniogénesis en situaciones acidóticas.

TABLA V.1- Modificaciones determinadas mediante ¹H RMN y HPLC en los niveles tisulares de aminoácidos implicados en la amoniogénesis mediante acidosis inducida por asfixia. Diferencias significativas: #: P < 0,001 *: P < 0,01 æ: P < 0,02 ¥: P < 0,05.

METABOLITO	µmol / gr de tej húmedo		nmol / mgr prot	
	NORMOXIA	ACIDOSIS	NORMOXIA	ACIDOSIS
ASP (HPLC)	1,91±0,17	0,57±0,20	167±14	73±25
GLU (¹ H RMN)	3,10±0,15	2,00±0,39	271±13	256±50
GLN (¹ H RMN)	1,40±0,07	0,81±0,23	122±06	103±29

El descenso de glutamato y glutamina puede ser resultado de la desaminación por parte de la glutaminasa y de la glutamato DH respectivamente. El descenso de Asp resulta difícil de explicar. Puede ser resultado de varios factores:

-Su metabolización a través del ciclo de nucleótidos de purina con formación de amoniaco.

-Su transformación junto al αKG en OAA y glutamato respectivamente, por acción de la aspartato transaminasa, aunque su actividad no se incrementa con la acidosis (Nissim y cols 1986a).

-Su liberación a la corriente sanguínea (disminución del cociente riñón/plasma en la acidosis).

Como en los extractos tisulares de riñón de ratas acidóticas se produjo un descenso en el contenido de proteínas con respecto a los extractos de riñón normóxico,

también hemos medido el contenido de aminoácidos por mgr de proteínas. La disminución de proteínas podría deberse a una mayor hidratación del tejido en respuesta a un flujo sanguíneo incrementado. Los descensos en los niveles de aspartato y glutamina siguen siendo significativos, aunque no el de glutamato.

En cualquier caso, el mayor descenso de aspartato debe corresponderse con una gran activación de los enzimas del ciclo de nucleótidos de purina durante la acidosis aguda, mientras que el menor descenso de glutamato y glutamina indica una menor activación de la Glutamato DH y de la Glutaminasa Dependiente de Fosfato en nuestras condiciones experimentales. Posiblemente, con una situación de acidosis de mayor duración, estos aminoácidos tendrían un descenso más acentuado.

Nuestro trabajo coincide con la bibliografía consultada en la no modificación de aminoácidos como la Ala, Gly, Arg, Val, Ile, Lis (Lemieux y cols 1988, Nissim y cols 1986b, Tamura y Endon 1988).

La tirosina incrementa sus valores de un modo paralelo al decremento de fenilalanina, su único precursor directo. Esta síntesis de tirosina no ha sido descrita previamente. Su relación con la acidosis o con otros factores asociados a nuestro diseño experimental no se ha podido determinar, por lo que puede ser motivo de futuras investigaciones.

Las modificaciones producidos en Asn, Trp y Leu no se han podido confrontar con la bibliografía consultada, pero pueden explicarse en parte por su captación o expulsión por el riñón.

Por último, el incremento de los niveles tisulares de serina ha sido descrito previamente (Pitts y cols 1970).

6.-EVOLUCION DE LOS OSMOLITOS RENALES EN LA ISQUEMIA Y LA ACIDOSIS.

Las células de diversos organismos, inmersas en elevadas concentraciones salinas, poseen similares concentraciones de solutos intracelulares que igualan la osmolaridad externa (Yancey y cols 1982). En una amplia variedad de organismos, la concentración de solutos orgánicos, más que la de los inorgánicos (Na^+ , K^+ , Cl^-), se eleva para contrarrestar los efectos de altas concentraciones salinas externas (Balaban y Burg 1987).

Estos solutos orgánicos, osmóticamente activos, son los llamados "osmolitos" y comprenden tres grupos: polioles, metilaminas y derivados aminoácidos (Gly, Ala, Pro, Ser...) (Borowitzka 1985). Los citados osmolitos han demostrado no afectar la función de múltiples reacciones enzimáticas (Bowlus y Somero 1979) y contrarrestan, en cambio, los efectos de elevadas concentraciones de urea y de sales inorgánicas (Somero 1986).

En condiciones de deshidratación se considera que la concentración intracelular de los osmolitos renales se incrementa en diferente intensidad según el animal o la especie. Ello sugiere una regulación compleja (Gullans y cols 1988) en la que se incluye la participación de la hormona antidiurética (Blummenfeld y cols 1989). Con la hidratación, los osmolitos renales disminuyen a nivel celular y se liberan al espacio extracelular (Wirthenson y cols 1989), aunque en diferente grado y velocidad según la especie, lo que corrobora su compleja regulación (Wolff y cols 1988).

En la isquemia nosotros hemos encontrado un incremento significativo del inositol y colina, mientras que la GPC y la Betaina no modifican sus valores (Tabla V.2).

TABLA V.2- Evolucion de los osmolitos renales y precursores en la isquemia renal determinados mediante $^1\text{H RMN}$. Los valores vienen expresados en $\mu\text{mol} / \text{gr}$ de tejido húmedo. Diferencias significativas con respecto a los niveles normóxicos: * $P < 0,01$ †: $P < 0,05$.

A) EXTRACTOS PERCLORICOS.

METABOLITO	NORMOXIA	ISQUEMIA		
		2 MINUTOS	45 MINUTOS	60 MINUTOS
1-COLINA	0,38±0,11	0,40±0,03	0,75±0,05*	0,93±0,08*
2-GPC	2,01±0,23	2,20±0,17	2,46±0,24	2,25±0,18
3-BETAINA	1,40±0,07	1,16±0,13	1,52±0,18	1,15±0,13
4-INOSITOL	3,14±0,16	4,04±0,16*	5,47±0,18	4,61±0,14*

b) EXTRACTOS EN TAMPON FOSFATO.

METABOLITO	NORMOXIA	ISQUEMIA		
		2 MINUTOS	45 MINUTOS	60 MINUTOS
1-COLINA	0,27±0,08	0,57±0,14	0,86±0,18*	0,86±0,04*
2-GPC	1,14±0,17	1,32±0,23	1,01±0,17	0,90±0,15
3-BETAINA	0,79±0,17	1,20±0,18	1,25±0,11	1,26±0,05
4-INOSITOL	2,21±0,16	2,72±0,46	5,09±0,16*	4,49±0,12

La médula renal es el principal lugar de síntesis y catabolismo del inositol en el hombre (Clements y Diethelum 1979) y en la rata (Hauser 1963). La síntesis local de inositol puede estimularse en la isquemia, aunque los mecanismos no son claros. Este incremento puede provenir del inositol trifosfato, metabolito hidrosoluble proveniente de la acción de la fosfolipasa C sobre el fosfatidil inositol bifosfato de la membrana plasmática. El inositol trifosfato actúa como segundo mensajero en la liberación del Ca^{++} sarcoplásmico, incrementando el Ca^{++} citosólico, que a su vez incrementa la actividad de la fosfolipasa C (Hokin 1985).

La glucosa, otro precursor del inositol, se deriva por la ruta glucolítica, por lo que es improbable que contribuya a incrementar sus niveles durante la isquemia.

Nuestros hallazgos son compatibles con el incremento de la concentración plasmática y de la eliminación urinaria de inositol que se produce en el fallo renal humano, fenómenos ambos indicativos de un incremento de la relación síntesis / catabolismo del inositol, probablemente a nivel renal (Aloia 1973).

Los enzimas que catalizan la síntesis de Betaina requieren NAD^+ , elemento que resulta deficitario en condiciones isquémicas (Wilken y cols 1970). La GPC se sintetiza localmente en la médula renal por acción de las fosfolipasas sobre la fosfatidilcolina (Balaban y Burg 1987). En nuestro trabajo esta síntesis no se ha visto incrementada, probablemente por una mayor escisión de la fosfatidilcolina, que ha favorecido el incremento de colina, un precursor de osmolitos.

En la acidosis aguda se produjo un decremento significativo de GPC e inositol, aunque esta significación se perdió al expresar sus valores en nmol/mgr de proteína. En nuestras condiciones experimentales no ha sido posible determinar la causa de este descenso.

7.-DIAGNOSTICO DE ISQUEMIA MEDIANTE RMN A NIVEL EXPERIMENTAL Y CLINICO. POSIBILIDADES DE LA ^1H RMN CON RESPECTO AL RESTO DE LOS NUCLEOS USADOS EN ESPECTROSCOPIA.

7.1- Hallazgos con ^{31}P RMN.

La ^{31}P RMN ha demostrado su utilidad a nivel experimental y clínico en el diagnóstico de los fenómenos isquémicos renales. Extractos tisulares (Ross y cols 1986), riñón de animal in situ (Boguski y cols 1986), riñones humanos extirpados para trasplante (Chan y cols 1982a), riñones humanos trasplantados in situ (Oberharnsli y cols 1987) y riñones normales in situ (Matson y cols 1987) han sido estudiados con ^{31}P . Los resultados obtenidos sugieren que elevadas concentraciones de ATP y bajos niveles de Pi predicen un buen estado energético y una buena viabilidad, por ejemplo, del riñón a trasplantar.

Sin embargo, el estudio in situ del riñón humano con ^{31}P plantea múltiples inconvenientes:

1- No todos los fosfatos indicadores del estado energético tisular tienen la concentración suficiente para ser medidos con las técnicas actuales (Stubbs y cols 1984).

2- El riñón es un órgano heterogéneo donde la disfunción puede depender de un número de células localizado (Bezis y cols 1984) y aunque se han desarrollado técnicas que obtienen señales RMN de regiones intrarrenales concretas (Boguski y cols 1986), su resolución está limitada por la mala relación señal-ruido que proporciona el ^{31}P .

3- En situaciones de riesgo vital, o por motivos socioeconómicos, el diagnóstico debe hacerse en un tiempo limitado (Bottomley 1989).

Es probable, no obstante, que la combinación de la ^{31}P RMN con otros núcleos más sensibles o más abundantes pueda potenciar la capacidad del método para la detección de la isquemia.

7.2- Hallazgos con ^1H RMN.

Los cambios en el perfil metabólico renal inducidos en la isquemia por clampaje del pedículo renal, que hemos demostrado con la espectroscopia de protones, hacen posible, por el contrario, el diagnóstico de isquemia tisular a nivel experimental mediante este núcleo. En efecto, entre los metabolitos con modificaciones significativas y que se pueden detectar en el homogenado de riñón completo se encuentran: El glutamato, el succinato, la glicina, el inositol y el lactato. De todos ellos, el lactato, marcador importante de la glucólisis anaerobia, se halla oscurecido por la señal de los protones $(\text{CH}_2)_n$ de los lípidos. La serina, otro aminoácido cuyo incremento significativo se ha detectado mediante HPLC, también queda enmascarada, incluso en los extractos tisulares, por los protones metileno de la Betaina, GPC y Creatina.

Nuestros resultados coinciden básicamente con los espectros ^1H RMN de riñón animal *in vivo* publicados. Así Wolff y Balaban (1987a) han detectado la presencia de sorbitol+inositol, betaina+GPC y lípidos y Berkowitz y cols (1988) en un espectro bidimensional de riñón de conejo, han identificado GPC, inositol, lactato y la fosfoetanolamina, metabolito lipídico cuyo papel en el córtex renal es desconocido (Wolff y Balaban 1987b).

El diagnóstico *in vivo* de la isquemia renal podría realizarse, por lo tanto, detectando el incremento de lactato, glutamato, succinato, glicina e inositol. La detección del lactato requiere el uso de secuencias de pulsos que eviten la superposición con los lípidos (Hardy y Dumoulin 1987), mientras que el glutamato, succinato, glicina e inositol no debe presentar problemas intrínsecos en su detección, salvo los derivados de la relación señal-ruido.

7.3- Problemas con la espectroscopia *in vivo* de ^1H RMN.

Un problema a solventar, es que los espectros *in vivo*, suelen expresarse, al no disponer de standard interno, en intensidad de los picos o porcentajes con respecto a un control. Esta situación es menos problemática con el ^{31}P , puesto que el incremento en 13-15 veces del Pi va acompañado de un decremento del ATP y la modificación relativa de sus áreas puede ser proporcionalmente valorable (Ratcliffe y cols 1988). En cambio, en el espectro de protones el incremento de los osmolitos, del glutamato y del lactato no se acompaña de un decremento significativo en el área de otro metabolito cuantificable. Esto supone que para hacer el diagnóstico de isquemia con RMN protónica habría que comparar el espectro obtenido con el resultante de un área sana, lo cual es prácticamente inviable en múltiples situaciones (Se han iniciado técnicas para la cuantificación molar de metabolitos *in vivo*, utilizando un doble coil de superficie y comparando la intensidad del núcleo bajo estudio con la concentración de protones del agua (Thulborn y Ackerman 1983, Shapiro y Chan 1987a). Su utilidad se ha verificado en animales con la adición exógena de un standard interno (el ácido metilendifosfonato) (Shine y cols 1987). La determinación de la concentración molar *in vivo* potenciaría la utilidad clínica de los hallazgos experimentales).

7.4- ^1H RMN y reversibilidad o irreversibilidad de la lesión.

Otra cuestión por resolver consiste en saber si las alteraciones isquémicas detectadas mediante ^1H RMN son indicativas del grado de lesión celular y / o de su irreversibilidad. La irreversibilidad parece estar asociada en concreto con el deterioro de la membrana celular que se traduce, entre otros hallazgos, en un incremento del Ca^{++} intracelular (Farber y cols 1981).

Mediante ^{23}Na RMN y ^{87}Rb RMN (este último de comportamiento similar al K^+) se ha comprobado en modelos experimentales de isquemia renal un incremento del Na^+ intracelular y un decremento del Rb^+ (K^+), indicadores de un fallo en el gradiente iónico de membrana (Allis y cols 1989). Estudios con ^{19}F RMN, en combinación con 5 FBAPTA, un indicador fluorado del Ca^{++} intracelular, han demostrado también el incremento de Ca^{++} intracelular consecutivo a la isquemia (Gupta y cols 1989). Este incremento, que viene acompañado de la estimulación en la actividad de diferentes fosfolipasas y la consiguiente disminución en los niveles de fosfolípidos de membrana, se considera hoy, no sólo un mediador de las consecuencias funcionales del insulto isquémico sino el responsable de la lesión celular irreversible (Farber y cols 1981) (la regulación de la concentración iónica (K^+ , Na^+ , Ca^{++} , Mg^{++}) en los fluidos intra y extracelulares se utiliza como criterio de la supervivencia celular porque su homeostasis es necesaria para el mantenimiento del volumen celular y de procesos metabólicos específicos (Hochachka 1986)).

En nuestro trabajo (Tabla V.3), hemos apreciado que se producen, por efecto de la isquemia, elevaciones significativas precoces (a los dos minutos) en los niveles de succinato e inositol en los extractos perclóricos y de

glicina y lactato en los extractos en tampón fosfato, indicando que la isquemia tisular experimental puede ser diagnosticada prácticamente desde su instauración. A los 45 minutos, las modificaciones en éstos y otros metabolitos, incrementados a los 2 minutos aunque no significativamente (glutamato, colina y lactato en los extractos perclóricos y glutamato, colina e inositol en los extractos fosfato), prosiguen este incremento que se estabiliza o decrece a los 60 minutos.

TABLA V.3- Comparación entre normoxia y distintos tiempos de isquemia de los niveles de metabolitos acumulados y determinados mediante ^1H RMN que han modificado sus valores de modo significativo. Las concentraciones vienen expresadas en $\mu\text{mol} / \text{gr}$ de tej húmedo. Las significaciones se expresan del siguiente modo:

- 1-Significación de un grupo con respecto a valores normóxicos: * $P < 0,05$. ** $P < 0,01$
 2-Significación de un grupo con respecto a valores de 2 minutos: o $P < 0,05$. oo $P < 0,01$
 3-Significación de un grupo con respecto a valores de 45 minutos: x $P < 0,05$. xx $P < 0,01$
 4-Significación de un grupo con respecto a valores de 60 minutos: s $P < 0,05$. ss $P < 0,01$

a) EXTRACTOS PERCLORICOS.

METABOLITOS	NORMOXIA	ISQUEMIA		
		2 MINUTOS	45 MINUTOS	60 MINUTOS
1-GLUTAMATO	1,57±0,13 ^{xxss}	2,15±0,20 ^{xxss}	3,78±0,07 ^{ssoo}	3,15±0,13 ^{ssoo}
2-COLINA	0,38±0,11 ^{xxss}	0,40±0,03 ^{xxss}	0,75±0,05 ^{ssoo}	0,93±0,08 ^{ssoo}
3-INOSITOL	3,14±0,16 ^{ooxxss}	4,04±0,16 ^{ssxx}	5,47±0,18 ^{ssoo}	4,61±0,14 ^{ssx}
4-SUCCINATO	0,40±0,04 ^{ooxxss}	1,01±0,10 ^{ssxxs}	1,55±0,11 ^{ssoo}	1,43±0,09 ^{ssoo}
5-LACTATO	1,51±0,16 ^{xxss}	2,05±0,06 ^{xxss}	5,13±0,31 ^{ssoo}	5,13±0,31 ^{ssoo}

b) EXTRACTOS EN TAMPON FOSFATO.

METABOLITOS	NORMOXIA	ISQUEMIA		
		2 MINUTOS	45 MINUTOS	60 MINUTOS
1-GLUTAMATO	3,10±0,15 ^{xxss}	3,81±0,39 ^{ss}	5,06±0,24 ^{ss}	5,18±0,27 ^{ss}
2-GLICINA	2,38±0,18 ^{ooxxss}	4,00±0,55 [*]	4,34±0,32 ^{ss}	4,44±0,25 ^{ss}
3-COLINA	0,27±0,08 ^{xxss}	0,57±0,14	0,86±0,18 [*]	0,86±0,04 ^{ss}
4-INOSITOL	2,21±0,16 ^{xxss}	2,72±0,46 ^{xxss}	5,09±0,16 ^{ssoo}	4,49±0,12 ^{ssoo}
5-LACTATO	1,97±0,16 ^{ooxxss}	2,70±0,24 ^{xxss}	4,56±0,12 ^{ssoo}	4,55±0,19 ^{ssoo}

No pretendíamos en este trabajo determinar el tiempo de clampaje necesario para causar daños irreversibles, sino demostrar la posibilidad de detectar mediante ^1H RMN modificaciones en los niveles de algunos metabolitos intracelulares que pudieran reflejar la existencia de daño isquémico. Estudios posteriores, utilizando riñones reperfundidos tras distintos tiempos de isquemia, podrán, tal vez, demostrar de una forma tangible las modificaciones máximas permisibles en cada uno de los metabolitos citados que permiten la reversibilidad del fenómeno.

Nuestros resultados no permiten definir el tiempo necesario para que se produzcan lesiones irrecuperables. No obstante, la tendencia a la estabilización o descenso de los metabolitos acumulados, permiten sugerir una alteración celular grave, producida ya a los 45 minutos.

De cualquier forma, parece claro que en el daño isquémico del órgano deben ser determinantes las alteraciones en los flujos iónicos, como consecuencia del metabolismo anaerobio, con las siguientes alteraciones en la permeabilidad de membrana, que se reflejan en las modificaciones en la concentración de las especies moleculares determinadas (por ejemplo, la gran influencia de los niveles de Ca^{++} en la activación de fosfolipasas que son un mecanismo etiopatogénico fundamental en los disturbios metabólicos que hemos observado)

En cualquier caso, la superioridad y mayor versatilidad de la espectroscopia protónica sobre la ^{31}P RMN parecen demostradas. La ^1H RMN, en nuestra experiencia, ha permitido detectar mayor número de metabolitos y ha diferenciado la anoxia renal por clampaje de pedículo y sin aporte externo de sustrato de la hipoxia renal por asfixia y con persistencia

del flujo sanguíneo, indicando que la presencia o no de un sustrato externo puede modificar los mecanismos defensivos celulares ante el insulto isquémico.

A su mayor versatilidad, la ^1H RMN une la necesidad de una menor fuerza de campo para obtener una resolución similar a la ^{31}P RMN. Actualmente, el límite clínico para la fuerza de campo magnético estático oscila entre 2-2,5 Tesla (Ver Tabla I.1 y I.2). La posibilidad de sobrepasarlo dependerá de una mayor experiencia clínica y experimental sobre los efectos biológicos del magnetismo (Petersen y cols 1985a).

Parece demostrado, por último, que la IRM protónica, tras la administración de Gadolinio-DTPA puede distinguir el tejido renal viable del no viable (Choyke y cols 1989). La espectroscopia de protones sería, en estas condiciones, un complemento ideal para los estudios de imagen.

8.- RMN Y PATRONES DE FALLO RENAL.

El diagnóstico de fallo renal se basa actualmente en una detallada anamnesis junto a exámenes clínico y de laboratorio, hasta llegar, en ocasiones, a la biopsia renal (Serra 1990). La contribución radiológica a su diagnóstico es imprecisa, pues así como los US pueden ser utilizados para evaluar el tamaño renal, el uso de la UIV está muy discutido (Keeton y Pillay 1986). Incluso, debe evitarse en el fallo prerrenal (Davidson 1985).

El fallo prerrenal se ha diagnosticado a nivel experimental mediante ^{31}P RMN donde se aprecia un incremento de GPC (Shapiro y cols 1989). Este dato es perfectamente reproducible en espectroscopia ^1H RMN, utilizando la cual, se ha confirmado el incremento consistente de la GPC durante situaciones de deshidratación (Fallo prerrenal) (Gullans y cols 1988).

El fallo parenquimatoso es multietiológico. Desde el punto de vista radiológico sólo es posible informar del tamaño renal o de la capacidad de excreción de solutos (medios de contraste) (Newhose y Pfister 1979). En modelos animales de fallo renal, la IRM, mediante el cálculo de los tiempos de relajación, ha permitido distinguir el fallo renal isquémico del nefrotóxico (Iaina y cols 1989). También la espectroscopia de ^{31}P ha permitido esta distinción (Chan y cols 1982b). Nosotros, con espectroscopia de protones hemos distinguido, a nivel experimental, el tejido normóxico del isquémico por clampaje del pedículo renal y del hipóxico por asfixia de la rata. En ambos casos, la disminución del aporte de O_2 y el bajo pH son factores fundamentales, aunque la presencia o no de flujo sanguíneo puede condicionar las rutas metabólicas que acontecen en el tejido isquémico. El incremento, en la isquemia por clampaje del pedículo renal, del inositol mientras que permanecen constantes la GPC y la Betaina, hace posible el diagnóstico diferencial entre fallo prerrenal y fallo renal de origen isquémico. Las posibles diferencias con otras etiologías de fallo renal requieren futuras investigaciones.

El fallo postrenal no plantea apenas problemas a los métodos diagnósticos actuales. En la espectroscopia de ^{31}P , el acúmulo de Pi puede inducir a error con el incremento de la GPC que ocurre en la deshidratación. La IRM evidencia un alargamiento de los tiempos de relajación provocado por el acúmulo líquido (Iaina y cols 1989).

En la hipertensión renovascular se puede llegar al diagnóstico de certeza tras la determinación selectiva de reninas en la vena renal (Dsouza 1978). La IRM no supone una contribución definitiva en este campo, aunque la detección de isquemia *in vivo* evitaría métodos cruentos.

La predicción de la viabilidad del riñón a trasplantar está basada, esencialmente, en la estimación del tiempo operatorio de isquemia y la duración del almacenamiento en frío del órgano (Goldszer y cols 1983). Las técnicas de laboratorio no son concluyentes en su uso clínico (Nunnally 1983). La ^{31}P RMN ha mostrado poseer gran utilidad en este campo, estimándose entre 60-120 minutos de isquemia caliente el tiempo necesario para el desarrollo de daño celular irreversible (Bretan y cols 1986). El diagnóstico de isquemia mediante ^1H RMN tiene como ventaja principal el menor tiempo de estudio.

En cuanto a la funcionalidad del riñón trasplantado el US Doppler constituye el método electivo de screening. Un registro anormal es indicación de biopsia renal (Needleman y Kurtz 1987). La ^{31}P RMN ha distinguido entre fallo por rechazo y fallo por isquemia en el riñón trasplantado, aunque los cambios detectados han sido siempre, posteriores a la aparición de alteraciones histológicas (Chan y Shapiro 1989). La ^1H RMN puede conducir, en cambio, sólo al diagnóstico de fallo isquémico. Su papel en otras etiologías requiere futuras investigaciones.

9- RESUMEN.

La presentación de fenómenos isquémicos en patología renal y su asociación con cambios bioquímicos bien definidos se han revisado en la presente Tesis, en la cual ha quedado, a nuestro juicio, demostrada la virtualidad de la ^1H RMN en el diagnóstico de la isquemia experimental renal y se han destacado sus aportaciones con respecto a los suministrados por otros procedimientos espectroscópicos, así como la posibilidad de la presunción de fallo renal, su naturaleza y su carácter reversible o irreversible.

Los hallazgos encontrados permiten suponer que es posible someter a revisión los esquemas diagnósticos vigentes e, igualmente, permite sostener la tesis de que, en el futuro, será posible describir las situaciones de enfermedad no sólo mediante imágenes morfológicas alteradas o modificaciones cuantitativas de ciertos indicadores de función, sino también mediante la demostración, en el órgano o tejido enfermo, de metabolitos diversos cuya presencia en el mismo haga presumir no sólo la naturaleza sino también la severidad de la enfermedad.

VI- CONCLUSIONES.

VI-CONCLUSIONES.

El análisis de los resultados del presente estudio y su comparación con los publicados , hasta ahora, en la literatura sobre Espectroscopia por Resonancia Magnética Nuclear permiten, a nuestro juicio, la formulación de las siguientes conclusiones:

1.- De modo semejante a como se ha realizado con anterioridad (Espectroscopia de ^{31}P , ^{23}Na , ^{87}Rb , ^{19}F), la espectroscopia ^1H RMN constituye un método de presunción diagnóstica fiable de las situaciones de isquemia renal experimentalmente inducidas.

2.- El diagnóstico de isquemia renal aguda, mediante ^1H RMN, se basa en la demostración, en los extractos de tejido renal isquémico, de un incremento significativo de los niveles de concentración de glutamato, glicina, succinato, lactato e inositol respecto de los existentes en condiciones normales de oxigenación.

3.- La evolución, en función del tiempo, de la concentración tisular de los metabolitos antes citados demuestra que la actividad de los procesos bioquímicos que se inician con el clampaje del pedículo renal se estabiliza o descende transcurrido cierto tiempo (45 minutos, aproximadamente). Que este fenómeno resulte indicativo o no de lesión renal irreversible es algo que tendrá que ser aclarado en futuras investigaciones que incluyan experimentos de reperfusión y/o estudios *in vivo*.

4.- Los diferentes hallazgos bioquímicos encontrados en el tejido renal tras la inducción en los animales de una situación de hipoxia con flujo sanguíneo renal conservado (disminución, estadísticamente significativa de glutamato, glicerofosforilcolina e inositol) demuestran que el flujo persistente en riñón, y no simplemente la disminución o reducción a cero de la pO_2 de perfusión en el sistema vascular intrarrenal, es responsable de los cambios metabólicos subyacentes a la lesión.

5- La conclusión anterior queda reforzada, a nuestro juicio, por el hecho de que en condiciones de deshidratación (fallo prerrenal) algunas especies bioquímicas identificables por espectroscopia de 1H RMN en el extracto del tejido renal del animal (glicerofosforilcolina, en concreto) cursan con valores de concentración distintos (significativamente elevados) respecto de los encontrados en la isquemia aguda y en la hipoxia con flujo renal persistente. Los cambios observables en el osmolito GPC permiten, en consecuencia, diferenciar con seguridad las situaciones descritas.

6- A pesar de la existencia de un cierto número de limitaciones en su uso (oscurecimiento de la resonancia del lactato por los protones lipídicos y dificultad en la determinación exacta de concentraciones absolutas de metabolitos) la 1H RMN ha demostrado ser, en nuestra experiencia, un método espectroscópico útil para el estudio de la patología renal, con importantes derivaciones a nivel experimental y, presumiblemente, a nivel clínico.

2

VII- ABREVIATURAS Y GLOSARIO.

VII- ABREVIATURAS Y GLOSARIO.

1-ABREVIATURAS.

- ALA: Alanina
AMP: Adenosinmonofosfato
ADP: Adenosindifosfato
ARG: Arginina
ASD: Arteriografía por sustracción digital
ASN: Asparragina
ASP: Aspártico
ATP: Adenosintrifosfato
Bo: Campo magnético principal
B₁: Campo magnético de Radiofrecuencia
¹³C RMN: ERM de ¹³C
CAD: Convertidor analógico-digital
CAT: Ciclo de los ácidos tricarbóxicos (o de Krebs).
Da: Dalton
ERM: Espectroscopia por resonancia magnética
FAD: Flavina adenina dinucleótido (Forma oxidada)
FADH₂: Forma reducida del FAD
5-FBAPTA: 1,2-bis(2-amino-5-fluorofenoxi)etano-N,N,N',N'-
tetraacetato.
FID: Free induction decay. Decaimiento de la señal de
precesión
¹⁹F RMN: ERM de ¹⁹F
Gd-DTPA: Gadolinio-Dietilenotriaminopentaacetato
GLN: Glutamina
GLU: Glutámico
GLY: Glicina
GPC: Glicerofosforilcolina
HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Presión
¹H RMN: ERM de ¹H
ILE: Isoleucina

IR: Insuficiencia Renal
IRM: Imagen (anat6mica) por resonancia magn6tica.
 α -KG: α -cetogluturato
Km: Costante de Michaelis- Menten
LEU: Leucina
LDH: Lactato deshidrogenasa
LIS: Lisina
 ^{23}Na RMN: ERM de ^{23}Na
NAD⁺: Nicotinamida adenina dinucle6tido (Forma oxidada)
NADH: Forma reducida del NAD⁺.
OAA: Oxalacetato
 ^{31}P RMN: ERM de ^{31}P
PC: Fosforilcolina
PFK: Fosfofructoquinasa
PHE: Fenilalanina
Pi: Fosfato inorgánico
ppm: partes por mill6n
PRO: Prolina
 ^{87}Rb RMN: ERM de ^{87}Rb
RF: Radiofrecuencia
RMN: Resonancia Magn6tica Nuclear
rpm: Revoluciones por minuto
SER: Serina
TAC: Tomografía axial computarizada
T: Tesla
T₁: Tiempo de relajaci6n longitudinal
T₂: Tiempo de relajaci6n horizontal
TAN: Contenido total de nucle6tidos de adenina
 ^{99}Tc -DTPA: ^{99}Tc Tecnecio-dietiltri Aminopentaacetato
Tc-DMSA: Tecnecio-Dimercaptosuccinato
TIR: Tirosina
TIS: Tomografía isot6pica de scanning
TRP: Tript6fano
UIV: Urografía intravenosa
US: Ultrasonidos (ecografía)
VAL: Valina

2-GLOSARIO.

Absorbancia: Logaritmo del cociente entre la luz que atraviesa una cubeta espectrofotométrica y la luz incidente.

Atomo: La partícula más pequeña de un elemento químico que aún mantiene las características esenciales de dicho elemento. Consiste en un núcleo (conteniendo protones y neutrones) y electrones.

Bobina de gradiente (coil de gradiente): Bobinas que inducen una variación espacial del campo magnético principal en una dirección determinada, indispensable para IRM o para ERM localizada.

Constante giromagnética (cociente giromagnético): Especifico para cada núcleo, relaciona el momento magnético con el momento cinético.

Desplazamiento Químico (Chemical shift) (δ): Cambio pequeño, pero mensurable, en la frecuencia de resonancia de un mismo núcleo a causa de los distintos entornos electrónicos.

Frecuencia de precesión (Larmor o resonancia): Frecuencia a la que un núcleo gira dentro de un determinado campo magnético (B_0). El campo de radiofrecuencia (B_1) debe igualar esta frecuencia de precesión para inducir resonancia.

Gauss: Unidad de fuerza de campo magnético. 10.000 Gauss = 1 Tesla.

Hertz (Hz): Unidad de frecuencia. 1 Hz = 1 ciclo / segundo.
1 KHz = 1.000 Hz. 1 MHz = 1.000.000 Hz.

Látex (red): Entorno electrónico con el que se produce intercambio de energía magnética mediante el proceso de relajación longitudinal (Spin- látex o T_1).

Momento angular: propiedad intrínseca de los cuerpos que poseen masa y que describen un movimiento circular a una determinada velocidad. Si también posee carga, al momento angular se le asocia un momento magnético.

Momento magnético: Como los elementos nucleares poseen carga eléctrica, la rotación o spin de esta carga produce un dipolo magnético cuyo valor es llamado momento magnético. El valor numérico y la orientación del vector de momento magnético indica la energía de las diferentes orientaciones de un núcleo sometido a un campo magnético externo.

Paramagnetismo: Propiedad de una sustancia que tiene una susceptibilidad magnética pequeña y positiva. Los átomos o iones paramagnéticos incrementan ligeramente el campo magnético local.

Precesión: Movimiento de giro del spin alrededor del eje del campo B_0 . Este giro se produce a la frecuencia de Larmor.

Pulso: Emisión corta de radiación de radiofrecuencia. La combinación de varios pulsos permite la creación de distintas secuencias que se repiten muchas veces para la obtención de señales por RMN.

Relajación: Proceso físico por el que un núcleo sometido a un campo magnético externo retorna a la posición de equilibrio tras haber sido excitado por energía de Radiofrecuencia.

Relajación Longitudinal (T_1 o Spin- Látex): Constante de tiempo exponencial en el retorno al equilibrio del vector de magnetización después de un pulso. Expresa los efectos del entorno sobre el núcleo.

Relajación horizontal (T_2 o Spin- Spin): Constante de tiempo exponencial en el retorno al equilibrio sobre el plano XY del vector de magnetización después de un pulso. Expresa las interacciones de los distintos núcleos entre sí.

Saturación: Estado de equilibrio en el que no existe magnetización neta, ya que el número de núcleos en los distintos estados energéticos es similar. La saturación entraña la desaparición de la señal en RMN.

Spin: Los protones y los neutrones individuales, al igual que el electrón, pueden considerarse en órbita alrededor del núcleo y rotando sobre su propio eje (movimiento de spin). En los núcleos con un número par de protones o neutrones los efectos del movimiento de spin se anulan. Los núcleos con un número impar de protones o neutrones presentan un componente rotacional neto caracterizado por el número cuántico de spin.

Tesla: Unidad de campo magnético. 1 Tesla = 10.000 Gauss.

Transformada de Fourier: Técnica matemática que transforma una señal que es observable como intensidad en el tiempo en una señal de intensidad en frecuencia.

VIII- BIBLIOGRAFIA.

VIII-BIBLIOGRAFIA.

- 1-Abragam A: The principles of Nuclear Magnetism. London, Oxford University Press (1961).
- 2-Ackerman J.J.H.; Grove, T.H.; Wong, G.G., et al: Mapping of metabolites in whole animals by ^{31}P NMR using surface coils. Nature 283: 167-170 (1980).
- 3-Agris, P.F.; Campbell, I.D.: ^1H NMR of intact Friend leukemia cells: phosphorylcholine increase during differentiation. Science 216: 1325-1327 (1982).
- 4-Aisen, A.M.; Chenevert, Th. L.: MR Spectroscopy: Clinical Perspective. Radiology 173: 593-599 (1989).
- 5-Aisenberg, A.C.: The glycolysis and respiration of tumors. New York. Academic Press (1971).
- 6-Allis, J.L.; Endre, Z.H.; Radda, G.K.: ^{87}Rb , ^{23}Na and ^{31}P Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy of the perfused rat kidney. Renal Physiol and Biochem 12: 171-180 (1989).
- 7-Al- Nasser, I.; Crompton, M.: The entrapment of the Ca^{++} indicator Arsenazo III in the matrix space of rat liver mitochondria by permeabilisation and resealing. Biochem J 239: 31-40 (1986).
- 8-Aloia, J.F.: Monosacharides and polyols in diabetes mellitus and uremia . J Lab Clin Med 82: 809 (1973).
- 9-Arnold, P.E.; Van Putten, V.J.; Lumlertgul, D., et al: Adenine nucleotide metabolism and mitochondrial calcium transport following renal ischemia. Am J Physiol 248: F845-F850 (1985).

10-Bagnasco, S.; Balaban, R.; Fales, H.M.: Predominant osmotically active solutes in rat and rabbit renal medullas. *J Biol Chem* 261: 5872-5877 (1986).

11-Balaban, R.S.; Burg, M.B.: osmotically active organic solutes in the renal inner medulla. *Kidney Int* 31: 562-564 (1987).

12-Balaban, R.S.; Sylvia, A.L.: Spectrophotometric monitoring of O₂ delivery to the exposed rat kidney. *Am J Physiol* 241: F257-F262 (1981).

13-Barany, M.; Lamber, B.G.; Glick, R.P.: In vivo H-1 spectroscopy in human at 1,5 T. *Radiology* 167: 839-844 (1988).

14-Barnothy, M.F.: Biological effects of magnetic fields. Vol II. New York. Plenum Press (1969).

15-Battocletti, J.H.; Salles, S.; Halbd, R.E.: Exposure of rhesus monkeys to 20.000 G steady magnetic field: effect on blood parameters. *Med phys* 8: 115-118 (1981).

16-Baumgartner, B.R.; Nelson, R.C.; Ball, T.I.: MR Imaging of renal transplants. *AJR* 147: 949-953 (1986).

17-Baverel, G; Forissier, M; Pellet, M: Lactate and pyruvate metabolism in dog renal outer medulla. Effects of oleate and ketone bodies. *Int J Biochem* 12: 163-168 (1980).

18-Bayati, A.; Christofferson, R.; Källskog, O. et al: mechanism of erythrocyte trapping in ischaemic acute renal failure. *Acta Physio Scand* 138: 13-23 (1990).

19-Beck, F.; Dorge, R.; Rick, R., et al: Intra and extracellular element concentrations of rat renal papilla in antidiuresis. *Kidney Int* 25: 397-403 (1984).

20-Behar, K.L.; Den Hollander, J.A.; Stomski, M.E, et al: High resolution NMR study of cerebral hypoxia in vivo. PNAS USA 80: 4945-4948 (1983).

21-Bennet, F.I.; Alleyne, G.A.O.: Gluconeogenesis and ammoniogenesis in rat kidney: Effect of 3-mercaptopicolinic acid. Febs Lett 65: 215-219 (1976).

22-Bennet, F.I.; Alleyne, G.A.O.: Effect of acute metabolic acidosis on the levels of some metabolic intermediates in the rat kidney. Renal Physiol 1: 307-310 (1978).

23-Bergstrom, J.; Guarneri, G.; Hultman, E.: Carbohydrate metabolism and electrolyte changes in human muscle during heavy work. J Appl Phys 30: 122-125 (1981).

24-Berkowitz, B.A.; Wolff, S.D.; Balaban, R.S.: Detection of metabolites in vivo using 2D proton homonuclear correlated spectroscopy. J Mag Res 79: 547-553 (1988).

25-Bernard, A.M.; Certaines, J.D.; Le Jeune, J.J.: Résonance Magnétique Nucléaire. MASSON 1988.

26-Bertolez, M.; Pedrosa, C.S.: Aparato urinario: Anatomía y técnicas de examen. En Diagnóstico por la imagen. Tratado de Radiología clínica. Vol II. Emalsa, S.A. Interamericana (1986).

27-Bezis, M.; Rosen, S.; Silva, P., et al: selective vulnerability of the medullary thick ascending limb to anoxia in the isolated perfused rat kidney. J Clin Invest 73: 182-190 (1984).

28-Bloch, F; Hansen, WW; Packard, H: The nuclear induction experiment. Physical Rev 70: 474-485 (1946).

29-Blumenfeld, J.D.; Hebert, S.C.; Heilia, Ch. W., et al: organic osmolytes in inner medulla of Brattleboro rat: Effects of ADH and dehydration. Am J Physiol 256: F916-F922 (1989).

30-Bogusky, R.T.; Dietrich, R.L.: Effect of acute metabolic acidosis on ammonia metabolism in kidney. Am J Physiol 256: F321-F328 (1989).

31-Boguski, R.T.; Garwood, M.; Matson, G.B., et al: Localization of phosphorus metabolites and sodium ions in the rat kidney. Mag Res in Med 3: 251-261 (1986).

32-Bogusky, R.T.; Lowenstein, L.M.; Aoki, T.T.: The relationship between glutamate deamination and gluconeogenesis in kidney. Biochem J. 210: 695-698 (1983).

33-Bogusky, R.T.; Steele, K.A.; Lowenstein, L.M.: The purine nucleotide cycle in the regulation of ammoniogenesis during induction and cessation of chronic acidosis in the rat kidney. Biochem J 196: 323-326 (1981).

34-Bookstein, J.J.; Abrams, H.L.; Buenger, R.E.: Radiologic aspects of renovascular hypertension. Part 1. Aims and methods of the radiology study group. J.A.M.A. 220: 1218-1224 (1972).

35-Bore, P.J.; Papatheofanis, I.; Sells, R.A.: Adenosine triphosphate regeneration and function in the rat kidney following warm ischemia. Transplantation 21: 235-237 (1979).

36-Borowitzka, L.J.: Glycerol and other carbohydrate osmotic effectors. In: transport processes, ionic- and osmoregulation. Ed. by Gilles. Berlin. Springer-Verlag. pp:437-453 (1985).

37-Bottomley, P.A.: Human in vivo NMR Spectroscopy in Diagnostic Medicine: Clinical tool or research probe?. Radiology 170: 1-15 (1989).

38-Bottomley, P.A.; Edelstein, W.A.: Power deposition in whole-body NMR-imaging. Med Phys 8: 510-512 (1981).

39-Bottomley, P.A.; Edelstein, W.A.; Foster, T.H., et al: In vivo solvent-suppressed localized hydrogen nuclear magnetic resonance spectroscopy: A window to metabolism? PNAS USA 82: 2148-2152 (1985).

40-Bottomley, P.A.; Foster, T.B.; Darrow, R.D.: Dept-resolved surface-coil spectroscopy (DRESS) for in vivo ^1H , ^{31}P , and ^{13}C NMR. J Mag Res 59: 338-342 (1984a).

41-Bottomley, P.A.; Hart, H.A.; Edelstein, W.A.: Anatomy and metabolism of the normal human brain studied by magnetic resonance at 1.5 Tesla. Radiology 150: 441-446 (1984b).

42-Bovey, F.A.: Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Academic Press, New York (1969).

43-Bowlus, R.D.; Somero, G.N.: Solute compatibility with enzyme function and structure: rationales for the selection of osmotic agents and end-products of anaerobic metabolism in marine invertebrates. J Exp. Zool. 208: 137-152 (1979).

44-Bowman, R.H.: Effects of diabetes, fatty acids, and ketone bodies on tricarboxylic acid cycle metabolism in the perfused rat heart. J Biol Chem 241: 3041-3048 (1966).

45-Boyd, T.A.; Goldstein, L.: Kidney metabolites levels and ammonia production in the acute acid-base alterations in the rat. Am J Physiol 236: E289-E294 (1979).

46-Bradley, W.G.; Newton, T.H.; Crooks, L.E.: Physical principles of Nuclear Magnetic Resonance. In modern Neuroradiology Vol 2: Avanced Imaging Techniques. Clavadel Press CA (1983).

47-Bradley, W; Tosteson, H.: Basic priciples of NMR. In Nuclear Magnetic Resonance in Medicine. Eds Kaufman-Crooks-Margulis. pp: 11-29 . Igaku-Shoin (1981).

48-Brand, M.D.; Murphy, M.P.: Control of electron flux through the respiratory chain in mitochondria and cells. Biol Rev. 62: 141-193 (1987).

49-Brandt, J.L.; Frank, N.R.; Lichtman, H.C.: Effects of hemoglobin solution on renal functions in man. Blood 6: 1152-1158 (1951).

50-Brenner, B.M.; Rector, F.C.: The kidney. Vol I. saunders (1981).

51-Bretan, P.N.; Vigneron, D.B.; James, T.L.: Assesment of renal viability by phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy. The J of urology 135: 866-871 (1986).

52-Brezis, M.; Rosen, S.; Silva, P., et al: Selective vulnerability of the medullary thick ascending limb to anoxia in the isolated perfused rat kidney. J Clin Invest 73: 182-190 (1984).

53-Brooks, W.M.; Irving, M.G.; Simpson, S.J., et al: Application of the inverse DEPT polarization transfer pulse sequence as a powerful water suppression method to follow metabolic processes in H₂O solution by ¹H NMR spectroscopy. J Mag Res 56: 521-526 (1984).

54-Budinger, T.F.: Nuclear magnetic resonance (NMR) in vivo studies: Known threshold for health effects. J Comput Assist Tomogr 5: 800-811 (1981).

55-Budinger, T.F.: Thresholds for physiological effects due to RF and magnetic fields used in NMR imaging. IEEE Trans Nucl Sci NS 26: 2821-2825 (1979).

56-Budinger, T.F.; Culander, C.; Bordow, R.: Switched magnetic field threshold for the induction of magnetophosphenes. Abstract of the third Annual Meeting of the society for magnetic Resonance in Medicine. August 1984. New York. pp: 118 (1984a).

57-Budinger, T.F.; Bristol, K.S.; Yen, C.K., et al: Biological effects of static magnetic fields. Abstracts of the third Annual Meeting of the Society of Magnetic Resonance in Medicine. New York. pp: 113 (1984b).

58-Bundesgesundheitsamt (der Bundesrepublik Deutschland): Empfehlungen zur Vermeidung gesundheitlicher Risiken, verursacht durch magnetische und hochfrequente elektromagnetische Felder bei der NMR-Tomographie und in-vivo-NMR-Spektroskopie. Bundesgesundheitsblatt 27: 92-96 (1984).

59-Cameron, I.L.; Ord, V.A.; Fullerton, G.D.: Characterization of proton NMR relaxation times in normal and pathological tissue by correlation with other tissue parameters. Magnetic Resonance imaging 2: 97-106 (1984).

60-Capdevila, A.; Sanz Marin, M.P.: Resonancia magnética nuclear en los estudios de la patología urogenital y pelvis. Medicine 5ª ed. 15: 73-80 (1988).

- 61-Caralps Riera, A.: Evaluación clínica y paraclínica del enfermo renal. *Medicine* 5ª ed. 55: 2.205-2.219 (1990).
- 62-Carrington, A; Mclachlin, A.D.: *Introduction to Magnetic Resonance*. New York: Harper and Row (1967).
- 63-Catalá, J.: *Física*. Ed. Cometa, SA:432-447(1979).
- 64-Cerdán, S.; Künnecke, B.; Dölle, A., et al: In situ metabolism of 1,w Medium chain dicarboxylic acids in the liver of intact rats as detected by ^{13}C and ^1H NMR. *J Biological Chem* 263: 11664-11674 (1988).
- 65-Cerdán, S.; Parrilla, R.; Santoro, J.: ^1H NMR detection of cerebral myo-inositol. *Febs Letters* 187(1): 167-172 (1985).
- 66-Chan, L.; French, M.E.; Gadian, D.G., et al: study of human kidney prior to transplantation by phosphorus nuclear magnetic resonance. In Pegg, D.E. (ed.). *Organ preservation III. Symposium of the transplantation society*. Lancaster: MTP, 113-119 (1982a).
- 67-Chan, L.; Ledinghan, J.G.G.; Dixon, J.A., et al: Acute renal failure: a proposed mechanism based upon ^{31}P nuclear magnetic resonance studies in the rat. In Eliahou (ed.). *Acute Renal Failure*. Jhon Libbey. pp: 35-41 (1982b).
- 68-Chan, L.; Shapiro, J.I.: Magnetic resonance study of renal transplantation. *Renal Physiol and Biochem* 12: 181-190 (1989).
- 69-Chapman, S.; Nakielmy, R.: *Aids to radiological differential diagnosis*. Baillièere tindall (1984).

70-Chaudry, I.H.; Sayeed, N.M.; Bane, A.E.: Alterations in cell function with ischemia and shock and their corrections. *Archs Surg* 116: 1309-1317 (1981).

71-Chaudry, I.H.; Sayeed, N.M.; Bane, A.E.: Effect of hemorrhagic shock on tissue adenine nucleotides in conscious rats. *Can J Physiol Pharmacol* 52: 131 (1974).

72-Choykc, P.L.; Frank, J.A.; Girton, M.E.: Dynamic enhanced MRI of acute and chronic renal infarction: An animal model. *Mag Res Imaging* vol 7(sup 1): 52 (1989).

73-Clements, R.S.; Diethelum, A.G.: The metabolism of myo-inositol by the human kidney. *J Lab Clin Med* 93: 210-219 (1979).

74-Clore, G.M.; Kimber, B.J.; Granenborn, A.M.: A 1-1 hard pulse: a simple and effective method of water resonance suppression in FT ¹H NMR. *J Mag Res* 54: 170-173 (1983).

75-Cobo Martinez, M.V.: Estudio de reproductibilidad de un método de valoración de aminoácidos por H.P.L.C. Tesina. Universidad de Granada (1985).

76-Cohen, J.J.; Kaunin, D.E.: Renal metabolism: Relation to renal function. In *The Kidney*. Brenner and Rector (Ed.). WB Saunders (1981).

77-Cohen, M.P.: Aldose reductase metabolism and diabetic nephropathy. *Metabolism* 35, suppl 1: 55-59 (1986).

78-Cooley, J.W.; Tukey, J.W.: "An algorithm for machine calculation of complex Fourier series." *Mathematical Computation* 19: 297 (1965).

- 79-Crompton, M.; Costi, A.; Hayat, L.: Evidence for the presence of a reversible Ca^{++} - dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. *Biochem J* 245: 915-918 (1987).
- 80-Crooks, L.E.; Ortendahl, D.A.; Kaufman, L., et al: Clinical efficacy of NMR imaging. *Radiology* 146: 123-128 (1983).
- 81-D'arsonval, M.A.: Action physiologique des courants alternatifs à grande fréquence. *Arch Physiol* 5: 401-406 (1983).
- 82-Damadian, R.V.: Tumor detection by nuclear magnetic resonance. *Science* 171: 1151-1153 (1971).
- 83-Damian, A.C.; Pitts, R.F.: Rates of glutaminase I and glutamine synthetase reactions in rat kidney in vivo. *Am J Physiol* 218: 1249-1255 (1970).
- 84-Davidson, A.J.: *Radiology of the kidney*. W.B. SAUNDERS Company. (1985).
- 85-Davis, P.L.; Crooks, L.; Arakaw, M., et al: Potential hazards in NMR imaging: heating effects of changing magnetic fields and RF fields on small metallic implants. *Am J Roentgenol* 137: 857-860 (1981).
- 86-Del Rio Pérez: Nefrología. En Farreras y Rozman. *Medicina Interna*. Tomo I. Pg: 839 (1980).
- 87-Devlin, T.M.: *Bioquímica*. Tomo I. Ed. Reverté S.A. (1986).
- 88-Dsouza, V.J.: A new simple test for renin sampling. *Radiology* 129: 351 (1978).

89-Dwyer, M.E.; Merion, M.; Sousa, K.R.: Applications of a physiologic analysis system for the biological researcher. *J of Analysis and Purification*. pp: 46-49 Sept. (1987).

90-Elton, LRB: *Introducción a la teoría nuclear*. Rialp, SA. Madrid (1964).

91-Endre, Z.H.; Allis, J.L.; Ratcliffe, P.J., et al: Rubidium NMR: a novel method of measuring cation flux in intact kidney. *Kidney Int*. 35: 1249-1256 (1989a).

92-Endre, Z.H.; Iaina, A.: Renal Nuclear Magnetic Resonance. *Renal Physiol and Biochem* 12: 141-143 (1989b).

93-Endre, Z.H.; Kuchel, P.W.: Proton NMR spectroscopy of rabbit renal cortex. *Kidney Int*. 28: 6-10 (1985).

94-Evanochko, W.T.; Ng, T.C.; Glickson, J.P.: Applications of in vivo NMR spectroscopy to cancer. *Mag Res Med* 1: 508-534 (1984a).

95-Evanochko, W.T.; Sakai, T.T.; Ng, T.C., et al: NMR study of in vivo RIF-1 Tumors analysis of perchloric acid extracts and identification of ^1H , ^{31}P and ^{13}C resonances. *Biochim Biophys Acta* 805: 104-116 (1984b).

96-Farber, J.L.; Chien, K.R.; Mitnacht, S.: The pathogenesis of irreversible cell injury in ischemia. *Am J Pathol* 102: 271-281 (1981).

97-Fein, A.B.; Lee, J.K.T.; Balfe, D.M.: Diagnosis and staging of renal cell carcinoma: A comparison of MR imaging and CT. *AJR* 148: 749-753 (1987).

98-Feinberg, H.: Energetics and mitochondria. In organ Preservation: Basic and applied aspects. Ed by pegg, Jacobsen and Halasz. Lancaster: MTP Press limited. pp: 3-13 (1982).

99-Finkelstein, S.D.; Gilfor, D.; Farber, J.L.: Alterations in the metabolism of lipids in ischemia of the liver and kidney. J Lipid Res 26: 726-734 (1985).

100-Finn, W.F.: Postischemic acute renal failure. Initiation, maintenance, and recovery. Invest Urol 17: 427-431 (1980).

101-Fitzsimons, JR; Thomas, RG; Mancuso, AA: Communication: Proton imaging with surface coil on a 0,15 T resistive system. Mag Res Med 2: 180-185 (1985).

102-Food and Drug Administration: Guidelines for evaluation of electromagnetic exposure risk for trials of clinical NMR systems. Rock ville, Md, Dept Healt and human services. (1982).

103-Fraile, M.; Setoain, J.: Aplicaciones nefrourológicas de la medicina nuclear. Medicine 5a ed. 22: 145-158 (1988).

104-Gadian, D.G.: Nuclear magnetic resonance and its applications to living systems. Clarendon press (1982).

105-Gaffey, C.T.; Tenforde, T.S.: Alterations in the rat electrocardiogram induced by stationary magnetic fields. Bioelectromagnetics. 2: 357-370 (1981).

106-Gamelin, L. ;Zager, R.A.: Evidence againts oxidant injury as a critical mediator of postischemic acute renal failure. Am J Physiol 255: F450-F460 (1988).

107-García-Granados, A.: Servicio de Resonancia Magnética Nuclear. Guía del Usuario. Universidad de Granada. Vers. 1 Enero (1987).

108-Gili Planas, J.: Tomografía por Resonancia Nuclear Magnética. Introducción a los fundamentos físicos de la tomografía por RNM. Med. Clín. (Barc) (Supl 1) 82: 9-21 (1984).

109-Gili, J.: Fundamentos biofísicos de la Resonancia Magnética Nuclear. Tipos de tomógrafos RM. Medicine 5ª ed. vol 9: 3-10 (1988a).

110-Gili, J.: Riesgos biológicos, recomendaciones e inconvenientes en las exploraciones por resonancia magnética. Medicine 5ª ed. vol: 9: 23-26 (1988b).

111-Goergen, T.G.; Lindstrom, R.R.; Tan, H., et al: CT appearance of acute renal cortical necrosis. A.J.R. 137: 176 (1981).

112-Goldstein, L: Pathways of glutamine deamination and their control in the rat kidney. Am J Physiol 213: 980-989 (1967).

113-Goldszer, R.C.; Strom, T.B.; Tilney, N.L.: Acute renal failure associated with renal transplantation. In: failure associated with renal transplantation. Ed Brenner. Philadelphia. W.B. Saunders. 21: 555-566 (1983).

114-Gómez González, J.; Caniego Monreal, J.L.; Pedrosa, C.S.: Indicaciones clínicas de la resonancia magnética. Radiología 32 (1): 15-43 (1990).

115-Gordon, R.E.; Hanley, P.E.; Shaw, D., et al: Localization of metabolites in animals using ^{31}P topical magnetic resonance. Nature 287: 736-738 (1980).

116-Graaf, A.A.; Bovee, W.J.; Deutz, N.E.P.: In vivo ¹H NMR procedure to determine several rats metabolite levels simultaneously, undisturbed by water and lipid signals. *Mag Res Imaging* 6: 255-261 (1988).

117-Gremy, F.; Perrin, J.: *Elements de Biophysique*. Flammarion Eds. Paris (1971).

118-Griffiths, J.R.; Stevens, A.N.; Iles, R.E., et al: NMR studies of tumors. *Biosci Rep.* 2: 729-725 (1982).

119-Guder, W.G.; Wagner, S.; Wirthenson, G.: Metabolic fuels along the nephron: Pathways and intracellular mechanism of interaction. *Kidney Int* 29: 41-45 (1986).

120-Guder, W.G.; Wieland, O.H.: Metabolism of isolate kidney tubules. Additive effects of parathyroid hormones and free fatty acids on renal gluconeogenesis. *Eur J biochem* 31:69-79 (1972).

121-Guder, W.G.; Wirthenson, N.G.: Metabolism of isolated kidney tubules. Interactions between lactate, glutamine and oleate metabolism. *Eur J Biochem* 99: 577-584 (1979).

122-Guillenwater, J.Y.; Westervelt, F.B.; Vaughan, E.D., et al: Renal function one week after release of chronic unilateral hydronephrosis in man. *Kidney Int* 7: 179-186 (1975).

123-Gullans, S.R.; Blumenfeld, J.D.; Balschi, J.A.: Accumulation of major organic osmolytes in rat renal inner medulla in dehydration. *Am J Physiol.* 255: F626-F634 (1988).

124-Gullans, S.R.; Heilig, C.W.; Stromski, M.E.: Methylamines and polyols in Kidney, Urinary Bladder, Urine, Liver, Brain, and Plasma. And analysis using ^1H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Renal Physiol and Biochem 12: 191- 201 (1989).

125-Gupta, R.K.; Dowd, T.L.; Spitzer, A.: ^{23}Na , ^{19}F , ^{35}Cl and ^{31}P multinuclear magnetic resonance studies of perfused rat kidney. Renal Physiol and Biochem 12: 144-160 (1989).

126-Gutmann, I; Wahlefeld, AW: L-(+)-Lactate. Determination with lactate dehydrogenase and NAD. In Methods of enzymatic analysis. Academic Press. pp:1464-1468 (1974).

127-Halasz.: Commentary. Differential diagnosis of renal transplant rejection. Is MR imaging the answer? AJR 147: 954-955 (1986).

128-Hand, S.C.; Somero, G.N.: Urea and methylamine effects on rabbit muscle phosphofructokinase. Catalytic stability and agregation state as a function of pH and temperature. J Biol Chem 257: 734-741 (1982).

129-Hanson, R.W.; Garber, A.J.: Phosphoenol pyruvato carboxykinasa. I. Its role in gluconeogenesis. Am J Nutr 25: 1010-1021 (1972).

130-Hardy, C.J.; Dumoulin, C.L. : Lipid and water suppression by selective ^1H homonuclear polarization transfer. Mag Res Med 5: 58-66 (1987).

131-Hare, W. S.C.; Poynter, J.D.: The radiology of renal papillary necrosis as seen in analgesic in analgesic nephropaty. Clin Radiol 25: 423-443 (1974).

132-Harms, S.E.; Morgan, T.J.; Yamanashi, W.S., et al: Principles of nuclear magnetic resonance imaging. Radiographics 4: 26-43 (special edition) (1984).

133-Harris, R.K.; Mann, B.E.: NMR and the periodic table. Academic Press. New York (1978).

134-Hems, D.A.; Brosnan, J.T.: Effects of ischaemia on content of metabolites in rat liver and kidney in vivo. Biochem J 120: 105-111 (1970).

135-Hauser, G.: The formation of free and lipid myoinositol in the intact rat. Biochem Biophys Acta 70: 278-280 (1963).

136-Hendee, N.R.: The Physical principles of computed tomography. Little Brown and Co. (1983).

137-Hendee, W.R.: Radiation Physics.-Introduction. -In The year book of diagnostic radiology. Ed. Bragg, DG. Year book medical publisher, INC. pp: 446-447 (1988).

138-Hendee, W.R.; Morgan, C.I.: Magnetic Resonance Imaging. Part I: Physical principles (Medical progress) West J Med 141: 491-500 (1984).

139-Hinkle; P.C.; McCarty, R.: How cells make ATP. Sci Amer 238: 104-123 (1978)

140-Hochachka, P.W.: Defense strategies against hypoxia and hypothermia. Science 231: 234-241 (1986).

141-Hokin, LE: Receptors and phosphoinositide-generated second messengers. Ann Rev Biochem 54: 205-235 (1985).

142-Hore, P.J.: Solvent suppression in Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance. J Mag Res 55: 283-300 (1983).

143-Hore, P.J.: Two dimensional chemical shift correlation using water suppression pulses. *J Mag Res* 56: 535-538 (1984).

144-Hricak, H.; Crooks, L.; Sheldon, Ph., et al: Nuclear Magnetic Resonance Imaging of the kidney. *Radiology* 146: 425-432 (1983).

145-Hricak, H; Thoeni, R.F.; Carroll, P.R., et al: Detection and staging of renal neoplasms: a reassessment of MR imaging. *Radiology* 166: 643-649 (1988).

146-Hricak, H.; Willians, R.D.: Magnetic Resonance Imaging and its application in Urology. *Urology* 23: 442-454 (1984).

147-Humes, H.D.; Nguyen, V.D.; Cieslinski, D.A., et al: The role of free fatty acids in hypoxia-induced injury to renal proximal tubule cells. *Am J Physiol* 256: F688-F696 (1989).

148-Humes, H.D.; Weinberg, J.M.: Alterations of renal tubular cell metabolism in acute renal failure. *Mineral electrolite metabolism* 9: 290 (1983).

149-Hummerich, H.; De Groot, H.; Noll, T., et al: Dependence of mitochondrial and cytosolic adenine nucleotides on oxygen partial pressure in isolated hepatocytes. *Biochem J* 250: 641-645 (1988).

150-Iaina, A.; Weininger, J.; Abrashkin, S.: Paramagnetic enhanced proton magnetic resonance measurement in rats: correlates with renal function. *Mag Res Imaging* 6: 131-134 (1988).

151-Iaina, A.; Weininger, J.; Abrashkin, S., et al: Renal proton magnetic resonance in experimental acute renal failure in rats. *Renal Physiol and Biochem* 12(3): 202-211 (1989).

152-Jacobsen, I.A.; Pegg, D.E.: Kidney. In organ preservation for transplantation. Ed. by A.M. Karrow, Jr and D.E. Pegg. New York. pp: 553-575 (1981).

153-Jones, J.P.; Partain, C.L.; Mitchell, M.R., et al: Principles of magnetic resonance. In Kresselhy (ed): Magnetic resonance annual. New York. Raven Press. pp: 71-111 (1985).

154-Jue, T.; Rothman, D.L.; Lohman, et al: surface coil localization of ^{31}P NMR signals from orthotopic human kidney and liver. PNAS USA 85: 971-974 (1988).

155-Kane, J.W.; Sternheim, N.M.: Life science physics. Ed. John Wiley and sons. p:32 (1978).

156-Kaufman, L.; Crooks, L.: Hardware for NMR imaging. In Nuclear Magnetic Resonance in Medicine. Eds Kauffman, Crooks and Margulis. pp: 184-203 (1981).

157-Keeton, G.R.; Pillay, G.P.: Diagnostic role of intravenous urography in acute and chronic renal failure. Urol Radiol 8: 72-76 (1986).

158-Kjos, B.O.; Elman, R.L.; Brand-Zawaski, M., et al: Reproducibility of relaxation times and density calculated from routine MRimages sequences. Clinical study of CNS. AJNR 6: 271-276 (1985).

159-Kovacevic, Z.; Mc Givan, J.D.: Mitochondrial metabolism of glutamine and glutamate and its physiological significance. Physiol Rev 63 (2): 547-605 (1983).

160-Krebs, H.A.; Vinay, P.: Regulation of renal ammonia production. Med Clin N Am. 59: 595-603 (1975).

161-Le Bihan, D.: Imagerie par resonance magnetique. Bases physiques. MASSON 1985.

162-Led, J.J.; Petersen, S.B.: Heating effects in carbon-13 NMR spectroscopy on aqueous solution caused by proton noise coupling at high frequencies. J Mag Res 32: 1-17 (1978).

163-Lemieux, G.; Berkofsky, J.; Lemieux, C.: Real importance of alanine in renal metabolism: in vitro studies in rat and dog. Am J Physiol 255: R42-R45 (1988).

164-Lemieux, G.; Pichette, C.; Vinay, P.: Cellular mechanisms of the anti-ammonogenic effect of ketone bodies in the dog. Am J Physiol 239: F420-F426 (1980).

165-Lemieux, G.; Vinay, P.; Baverel, G., et al: relationship between lactate and glutamine metabolism in vitro by the kidney: differences between dog and rat and importance of alanine synthesis in the dog. Kidney Int 16: 451-458 (1979).

166-Lemieux, G.; Vinay, P.; Robitaille, P. et al: The effect of Ketone bodies on renal ammoniogenesis. J. Clin Invest 50: 1781-1791 (1971).

167-Levine, I.N.: Physical Chemistry. Mc Graw-Hill Book company. pp: 711-721 (1983).

168-London, D.; Davis, P.; Williams, R., et al: Nuclear magnetic resonance imaging of induced renal lesions. Radiology 148: 167-172 (1983).

169-Lowenstein, J.M.: Ammonia production in muscle and other tissues: The purine nucleotide cycle. Physiol Rev 52: 382-413 (1972).

170-Lowry, O.H.; Passonneau, J.V.: A flexible system of enzymatic analysis. Academic Press. New York. pp: 123-124 (1972).

171-Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L., et al: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193: 265-275 (1951).

172-Lowry, M.; Ross, B.D.: Activation of oxoglutarate dehydrogenase in the kidney in response to acute acidosis. Biochem J 190:771-780 (1980).

173-Mansfield, P.; Morris, P.G.: Biomagnetics effects. In Mansfield, P.; Morris, P.G.: NMR Imaging in Medicine. Academic Press, New York. pp: 297-332 (1982).

174-Martín Andrés, A.; Luna del Castillo, J.D.: Bioestadística para las ciencias de la salud. 2ª ed. Norma, S.A. (1989).

175-Matson, G.B.; Twieg, D.B.; Karczmar, G.S., et al: spatially selected ^{31}P NMR of humans organs with surface coils: improvement of ISIS with a composite pulse (Abstr). In Book of abstracts. Society of Magnetic Resonance in Medicine. P:605 (1987).

176-Matson, G.B.; Weiner, M.: MRN Spectroscopy in vivo: Principles, Animal studies, and clinical applications. In magnetic Resonance imaging. David and Bradley (eds). The C.V. Mosby Company. St. Louis. Washington, D.C. Toronto (1988).

177-Matwiyoff, N.A.; Wicks, J.D.: Stable isotopes and magnetic resonance spectroscopy: studies of animal model and humans. In Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy. Ed. Mettler, F.A. Churchill Livingstone (1986).

178-Mc Affe, J.G.; Subramanian, G.: Experimental models and evaluation of animal data for renal radiodiagnostic agents. In: Lambrecht, R.M.; Eckleman, W.C., eds. Animals model in radiotracer design. New York: Springer-Verlag, Inc. pp: 211-227 (1983).

179-Mc Cormack, J.G.; Halestrap, A.P.; Denton, R.M.: Role of calcium ions in regulation of mamalian intramitochondrial metabolism. *Physiol Rew* 70: 391-425 (1990).

180-Mc Dougal, W.S.: Renal perfusion/reperfusion injuries. *The J of Urology* 140: 1325-1330 (1988).

181-Medulin, M; Thickman, D.; Kressel, H.Y., et al: Magnetic Resonance Imaging of postoperative patients with metallic implants. *A.J.R.* 143: 1281-1284 (1984).

182-Metcalfe, J.C.; Hesketh, T.R.; Smith, G.A.: Free cytosolic Ca⁺⁺ measurements with fluorine labelled indicators using ¹⁹F NMR. *Cell Calcium* 6: 183-195 (1985).

183-Miller, W.L.; Thomas, R.A.; Berne, R.M., et al: Adenosine production in the ischemic kidney. *Cir Res* 43: 390 (1978).

184-Mitchell, D.G.; Tubin, M.; Le veen, R., et al: Induced renal artery stenosis in rabbits: Marnetic resonance imaging, angiography and radionuclide determination of blood volume and blood flow. *Mag Res Imaging* 6: 113-124 (1988).

185-Mittnacht, S.; Farber, J.L.: Reversal of ischemic mitochondrial dysfunction. *J Biol Chem* 256: 3199-3206 (1981).

186-Mizgala, C.L.; Qamme, G.A.: Renal handlin of phosphate. *Physiol Rew* 65: 431-466 (1985).

187-Moon, K.L.; Hricak, H.: NMR imaging of the urinary tract. Appl Radiol Jan/Feb (1984).

188-Moore, W.S.: Theoretical and physical background to NMR scanning. Proceedings of an international symposium on NMR imaging. Rl Witcofski (ed.) Wiston-Salem. North Carolina. Bowman Gray School of Medicine Press: 1-4 (1982).

189-Moran, S.M.; Myers, B.D.: Pathophysiology of protracted acute renal failure in man. J Clin Invest. 76: 1440-1448 (1985).

190-Mountford, C.E.; Grossman, G.; Reid, G., et al: Characterization of transformed cells and tumors by ¹H MR spectroscopy. Cancer Res 42: 2270 (1982).

191-Muller, R.N.; Petersen, S.B.; Rinck, P.A.: Relaxation: T₂ the spin-spin relaxation time. In an introduction to biomedical Nuclear Magnetic Resonance. Vol 1. Ed. Petersen. Thieme (1985a).

192-Muller, R.N.; Petersen, S.B.; Rinck, P.A.: High Resolution NMR Spectroscopy. In an introduction to biomedical Nuclear Magnetic Resonance. Vol 1. Ed. Petersen. Thieme (1985b).

193-Myers, B.D.; Carrie, B.J.; Yee, R.R., et al: Pathophysiology of hemodynamically mediated acute renal failure in man. Kidney Int 18: 495-504 (1980).

194-Myers, B.D.; Miller, D.C.; Mehigan, J.T., et al: Nature of the renal injury following total renal ischemia in man. J Clin Invest 73: 329-341 (1984).

195-Myers, B.D.; Moran, S.M.: Hemodynamically mediated acute renal failure. The New England J of Medicine. 314 (2): 97-105 (1986).

196-Naidich, J.B.; Marlene, E.R.; Mossey, R.T., et al: Non dilated obstructive uropathy: Percutaneous nephrostomy performed to reverse renal failure. Radiology 160: 653-657 (1986).

197-Narayama, P.A.; Fotedar, L.K.; Jackson, E.F., et al: Regional in vivo proton magnetic resonance spectroscopy of brain. J Mag Res 83: 44-52 (1989).

198-National Radiological Protection Board (NRPB): Exposure to nuclear magnetic resonance clinical imaging. Radiography 47: 258-260 (1981).

199-Navon, G.; Burrows, H.; Cohen, J.S.: Differences in metabolite levels upon differentiation of intact neuroblastoma X glioma cells observed by proton NMR spectroscopy. FEBS lett 162:320-323 (1983).

200-Needleman, L.; Kurtz, A.B.: Doppler evaluation of the renal transplant. J Clin Ultrasound 15: 661-673 ((1987).

201-Neely, J.R.; Feuvray, D.: Metabolic products and Myocardial ischemia. Am J Pathol 102: 282-291 (1981).

202-New, P.F.; Rosen, B.R.; Brady, T.J., et al: Potencial hazards and artifacts of ferromagnetic and nonferromagnetic surgical and dental materials and devices in nuclear magnetic resonance imaging. Radiology 147: 139-148 (1983).

203-Newhose, J.H.; Pfister, R.C.: The nephrogram. Radiol clin North Am 17: 213-216 (1979).

- 204-Ng, T.C.; Evanochko, W.T.; Hiramoto, R.N., et al: ^{31}P NMR spectroscopy of in vivo tumors. J Mag Res 49: 271-286 (1982).
- 205-Nissim, I.; Yudkoff, M.; Segal, S.: Effect of 5-amino-4-imidazole carboxamide riboside on renal ammoniogenesis. Study with (^{15}N) Aspartate. J Biol Chem 261: 6509-6514 (1986a).
- 206-Nissim, I.; Yudkoff, M., Segal, S.: Nitrogen sources for renal ammoniogenesis: study with ^{15}N aminoacid. Am J Physiol 251: F995-F1002 (1986b).
- 207-Novick, A.C.; Ziegelbaum, M.; Vidt, D.G., et al: Trends in surgical revascularization for renal artery disease: Ten years experience. J.A.M.A. 257: 498-501 (1987).
- 208-Nunnally, R.L.: In vivo monitoring of metabolism with nuclear magnetic resonance spectroscopy. Sem Nucl Med 13: 377 (1983).
- 209-Nunnally, R.L.: NMR spectroscopy for in vivo determination of metabolism: an overview. In NMR in Medicine. Ed. Thomas, SR. The American Association of Physicists in Medicine. pp:249-268 (1986).
- 210-Oberhaensli, R.D.; Galloway, G.J.; Bore, P.J., et al: The study of human organs by phosphorus-31 topical magnetic resonance spectroscopy. Br J Radiol 60: 367-373 (1987).
- 211-Ordidge, R.J.; Connelly, A.; Lohman, J.A.D.: Image-selected in vivo spectroscopy (ISIS)- A new technique for spatially selective NMR spectroscopy. J Mag Res 66: 283-294 (1986).

212-Ortendahl, D.A.; Hylton, N.; Kaufman, L., et al: Analytical tools for magnetic resonance imaging. Radiology 153: 479-488 (1984).

213-Parker, R.E.: Estadística para biólogos. 2ª ed. Omega (1981).

214-Pavlicek, W.; Geisinger, M.; Castle, L., et al: The effects of nuclear magnetic resonance on patients with cardiac pacemakers. Radiology 147: 149-153 (1983).

215-Persson, B.R.R.; Stahlberg, F.: Potential health hazards and safety aspects of clinical NMR examinations. Radiation physics department. Lasarettet S-221 85 Lund, Suecia, 1986.

216-Peters, C.; Prosens, J.: MRI siting in adverse environments. Experimental results. I. Abstracts of the third Annual Meeting of the society of Magnetic Resonance in Medicine. New York. pp:585 (1984).

217-Petersen, S.B.; Muller, R.N.; Rinck, P.A.: Safety of patients and personnel. In an introduction to biomedical Nuclear magnetic resonance. Vol 1. Ed. Petersen. Thieme (1985a).

218-Petersen, S.B.; Muller, R.N.; Rinck, P.A.: T_1 , Spin-lattice relaxation time. -In an introduction to biomedical Nuclear Magnetic Resonance. Vol 1. Ed. Petersen. Thieme (1985b).

219-Petersen, S.B.; Muller, R.N.; Rinck, P.A.: The magnetic Resonance Phenomenon. -In An introduction to biomedical Nuclear Magnetic Resonance. Vol 1. Ed. Petersen. Thieme (1985c).

220-Pimentel, C.: Insuficiencia renal. En Pedrosa, C.S.

Diagnóstico por la imagen. Tratado de radiología clínica. Vol II :Emalsa, S.A. Interamericana (1986).

221-Pitts, R.F.; Damian, A.C.; McLeod, M.B.: Synthesis of serine by rat kidney in vivo and in vitro. Am J Physiol 219: 584-589 (1970).

222-Poynter, J.D.; Hare, W.S.C.: Necrosis in situ: a form of renal papillary necrosis seen in analgesis nephropathy. Radiology 111: 69 (1974).

223-Preuss, H.G.; Eastman, S.T.; Vavatsi-Manoso, et al: The regulation of renal ammoniogenesis in the rat by extracellular factors. I- The combined effects of acidosis and physiologic fuels. Metabolism 27: 1626-1638 (1978).

224-Purcell, EM; Torrey, HC; Pound, RV: Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid. Physical Rev 69: 37 (1946).

225-Putman and Ravin: Textbook of diagnostic imaging. Vol II. W. B. Saunders Company (1988).

226-Quirk, P.G.; King, G.F.; Campbell, I.D., et al: Quantitation of metabolites of isolated chicken enterocytes using NMR spectroscopy. Am. J. Physiol 256: G423-G429 (1989).

227-Ratcliffe, P.S.; Endre, Z.H.; Sheinman, S.J.: ³¹P nuclear magnetic resonance study of steady-state adenosine 5'-triphosphate levels during graded hypoxia in the isolated perfused rat kidney. Clin Sci 74: 437-448 (1988).

228-Ratcliffe, P.J.; Endre, Z.H.; Tange, J.D., et al: Ischaemic acute renal failure: Why does it occur? Nephron 52: 1-5 (1989).

229-Ratcliffe, P.J.; Moonen, C.T.W.; Holloway, P.A.H., et al: Acute renal failure in hemorrhagic hypotension: cellular energetics and renal function. *Kidney Int* 30: 355-360 (1986).

230-Roos, C.E.; Coffey, H.T.; Efferson, K.: Superconducting magnets. In *Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Imaging*. Ed. Partain . W.B. Saunders (1983).

231-Ross, B.; Freeman, D.; Chan, L.: Contributions of nuclear magnetic resonance to renal biochemistry. *Kidney Int* 29:131-141 (1986).

232-Ross, B.; Smith, M.; Marshall, V., et al: Monitoring response to chemotherapy of intact human tumours by ^{31}P Nuclear Magnetic Resonance. *LANCET*, 24 March: 641-646 (1984).

233-Rothman, D.L.; Behar, K.L.; Hetherington, H.P.: Homonuclear ^1H double-resonance difference spectroscopy of the rat brain in vivo. *PNAS USA* 81: 6330-6334 (1984).

234-Ruiz Santiago, F.; Fernández Mena, J.; Perán Mesa, F. y cols: Estudio "in vitro" de la isquemia renal mediante espectroscopia por resonancia magnética de protones y HPLC. Libro de resúmenes de la VIII reunión del FISS. pp:46 (1989).

235-Rutter, G.A.; Denton, R.M.: Regulation of NAD^+ - linked IDH and $\alpha\text{-KG DH}$ by Ca^{++} ions within toluene-permeabilized rat heart mitochondria. Interactions with regulation by adenine nucleotides and NADH/NAD^+ ratios. *Biochem J* 252: 181-189 (1988).

236-Sanz Marin; Gili planas.: Posibilidades en el diagnóstico clínico de la tomografía por resonancia magnética nuclear (RMN). *Med Clin (Barc) Supl 1 - 82*: 16-25 (1984).

237-Sauk, V.J.; Chen, C.N.; Hoult, D.I.: A quadrature probe for adult head NMR imaging. Abstracts of the third annual meeting of the society of magnetic resonance in medicine. New York. pp: 650 (1984).

238-Saunders, RD; Smith, H: Safety aspects of NMR clinical imaging. Br Med Bull 40: 148-154 (1984).

239-Scaduto, R.C.; Gattone, V.H.; Grotyohann, L.W., et al: Effect of an altered glutathione content on renal ischemic injury. Am J Physiol 255: F911-F921 (1988).

240-Schimassek, H.; Koohl, D.; Bucher, T.H.: Glycerolphosphorylcholin, die Nierensubstanz "Mamark" von Ullrich. Biochem Z. 331: 87-97 (1959)

241-Schrier, R.W.; Arnold, P.E.; Gordon, J.A., et al: Protection of mitochondrial function by mannitol in ischemic acute renal failure. Am J Physiol 247: F365-F369 (1984).

242-Sears, F; Zemansky, N.W.: Física. Ed. Aguilar (5ª ed.): 30-32 (1973).

243-Serra, A.: Insuficiencia renal aguda. Medicina 5ª ed 56: 13-21 (1990).

244-Shapiro, J.I.; Chan, L.: In vivo determination of absolute molar concentrations of phosphate metabolites using proton concentration as an internal standard. J Mag Res 75: 125-128 (1987a).

245-Shapiro, J.I.; Chan, L.: P-31 nuclear magnetic resonance spectroscopic study of obstructive uropathy in the rat. J Clin Invest 80: 1422-1427 (1987b).

- 246-Shapiro, J.I.; Chan, L.; Cheung, C., et al: Effects of adenosine triphosphate depletion in the isolated perfused rat kidney. *Mineral Electrolyte Metab* 13: 415-421 (1987c).
- 247-Shapiro, J.I.; Cosby, R.L.; Chan, L.: P-31 Magnetic resonance spectral changes in obstructed or dehydrated kidney. *Kidney Int* 35: 830-835 (1989).
- 248-Sherzinger, A.L.; Hendee, W.R.: Basic principles of magnetic resonance imaging- An update. In *High-tech Medicine* (special issue). *West J Med* 143: 782-792 (1985).
- 249-Shine, N.R.; Xuan, J.A.; Korötsky, A.P.: Determination of renal molar concentrations of phosphorus containing metabolites in vivo using ^{31}P NMR. *Mag Res Med* 4: 244-251 (1987).
- 250-Shires, G.T.; Cunningham, J.N. Backer, C.R.F., et al: Alterations in cellular membrane function during hemorrhagic shock in primates. *Ann Surg* 176: 288-295 (1972).
- 251-Shulman, G.I.; Alger, J.R.; Prichard, J.W., et al: Nuclear magnetic resonance spectroscopy in investigative and diagnostic medicine. *J Clin Invest* 74: 1127-1131 (1984).
- 252-Siegel, N.J.; Glazier, N.B.; Chaudry, I.H., et al: Enhanced recovery from acute renal failure by the post-ischemic infusion of adenine nucleotides and magnesium chloride in rats. *Kidney Int* 17: 338-349 (1980).
- 253-Slichter, C.P.: Principles of magnetic resonance. 2nd ed. Springer-Verlag. Berlin (1978).
- 254-Smith, C.W.: Evaluation of digital venous angiography of renovascular hypertension. *Radiology* 144: 51-54 (1982).

- 253-Somero, G.N.: pH-temperature interactions on proteins: principles of optimal pH and buffer system design. *Mar Biol Lett* 2: 163-178 (1980).
- 254-Somero, G.N.: Protons, osmolytes, and fitness of the internal milieu for protein function. *Am J Physiol* 251: R197-R213 (1986).
- 255-Spice, J.E.: *Enlace químico y estructura*. Ed. Alhambra (1967).
- 256-Steinberg, H.V.; Nelson, R.C.; Murphy, F.B.: Renal allograft rejection: Evaluation by doppler US and MR Imaging. *Radiology* 162: 337-342 (1987).
- 257-Streitwieser, A; Heathcock, C.A.: *Química Orgánica*. Interamericana (1982).
- 258-Strich, G.; Gerber, K.; Slutsky, R.A.: Magnetic resonance tissue analysis of acute renal vascular occlusion in the rabbit: enhancement with Gadolinium-DTPA complex. *Mag Res Imaging* 3: 37-42 (1985).
- 259-Stubbs, M.; Freeman, D.; Ross, B.D.: Formation of nmr invisible ADP during renal ischaemia in rats. *Biochem J* 224: 241-246 (1984).
- 260-Styles, P.; Grathwohl, C.; Brown, F.F.: Simultaneous multinuclear NMR by alternate scan recording of ^{31}P and ^{13}C spectra. *J Mag Res* 35: 329-336 (1979).
- 261-Sumpio, B.E.; Chaudry, I.H.; Clemens, M.G.: Accelerated functional recovery of isolated rat kidney with ATP-Mg Cl_2 after warm ischemia. *Am J Physiol* 247: R1047-R1053 (1984).

262-Talner, L.B.; Scheible, W.; Ellenbogen, P.H., et al: How accurate is ultrasonography in detecting hydronephrosis in azotemic patients?. *Urol Radiol* 3: 1-6 (1981).

263-Tamura, K.; Endon, H.: Contribution of purine nucleotide cycle to intranephron ammoniogenesis in rats. *Am J Physiol* 255: F1122-F1127 (1988).

264-Tannen RL: Ammonia metabolism. *Am J Physiol* 235: F265-F277 (1978).

265-Tannen, R.L.; Kunin, A.S.: Effect of pH on metabolism of α -KG by renal cortical mitochondria. *Am J Physiol* 240: F120-F126 (1981).

266-Tannen, R.L.; Kunin, A.S.: Influence of pyruvate on ammonia metabolism by renal cortical mitochondria. *Kidney Int.* 22: 280-285 (1982).

267-Tannen, R.L.; Sastrasin, S.: Response of ammonia metabolism to acute acidosis. *Kidney Int* 25: 1-10 (1984).

268-Terrier, F.; Hricak, H.; Berry, I., et al: Edema and the lack of blood perfusion produce opposite effects on the magnetic resonance characteristics on acutely ischemic rat kidneys. *Invest. Radiol* 22: 118-125 (1987).

269-Terrier, F.; Hricak, H.; Justich, E.: The diagnostic value of renal cortex-to-medulla contrast on magnetic resonance images. *Eur J Radiol* 6: 121-126 (1986).

270-Terrier, F.; Hricak, H.; Ruel, D., et al: Magnetic Resonance Imaging in the diagnosis of acute renal allograft rejection and its differentiation from acute tubular necrosis: Experimental study in the dog. *Invest Radiol* 20: 617-625 (1985).

271-Thulborn, K.R.; Ackerman, J.J.H.: Absolute molar concentrations by NMR in inhomogeneous B_1 . A scheme for analysis of in vivo metabolites. J Mag Res 55: 357-371 (1983).

272-Thulborn, K.R.; Soffe, N.F.; Radda, G.K.: Simultaneous in vivo measurement of oxygen utilization and high-energy phosphate metabolism in rabbit skeletal muscle by multinuclear 1H and ^{31}P NMR. J Mag Res 45: 362-366 (1981).

273-Trump, B.F.; Mergner, W.J.; Kahng, M.W., et al: studies of the subcellular pathophysiology of ischemia. Circulation 53 (supl 1): 17-26 (1976).

274-Urgubil, K.; Petein, M.; Maidan, R., et al: High resolution proton NMR studies of perfused rat hearts. FEBS Lett 167: 73-78 (1984).

275-Vargas Morales, A.M.: Acidosis láctica y gluconeogénesis renal durante el ejercicio. Tesis doctoral. Universidad de Granada (1978).

276-Venkatachalam, M.A.; Bernard, D.B.; Donohoe, J.F., et al: Ischemic damage and repair in the rat proximal tubule. Differences among S_1 , S_2 and S_3 segments. Kidney Int 14: 31 (1978).

277-Vigneron, D.B.; Tzika, A.A.; Hricak, H., et al: Complete and partial ureteral obstruction: evaluation of renal effects with P-31 MR spectroscopy and Tc-DMSA scintigraphy. Radiology 168: 645-650 (1988).

278-Vinay, P.; Allignet, E.; Pichette, C., et al: Changes in renal metabolic profile and ammoniogenesis during acute and chronic metabolic acidosis in dog and rat. Kidney Int 17: 312-325 (1982).

279-Vinay, P.; Lemieux, G.; Cartier, P.: Effect of fatty acids on renal ammoniogenesis in vivo and in vitro studies. Am J Physiol 231: 880-887 (1976).

280-Vinocur, B.: MR magnet strength debate: In search of an optimum field. Diagn. Imaging pp:106-113 (1984).

281-Waarde, A.V.; Stromski, M.E.; Thulin, G., et al: Protection of the kidney against ischemic injury by inhibition of 5'-nucleotidase. Am j. Physiol 256 (n22 pt 2): F298-F305 (1989).

282-Webb, J.A.W.; Talner, L.B.: The role of intravenous urography in hypertension. Radiol Clin North Am. 17:187-195 (1979).

283-Weidemann, M.J.; Krebs, H.A.: The fuel of respiration of rat kidney cortex. Biochem J 112: 149-166 (1969).

284-Weinberg, J.M.; Davis, J.A.; Abarzua, R.K.: Ouabain-induced lethal proximal tubule cell injury is prevented by glycine. Am J Physiol 258: F436-F455 (1990).

285-Weinberg, J.M.; Davis, J.A.; Abarzua, R.K., et al: Relationship between cell ATP and glutathione content and protection by glycine against hypoxic proximal tubule cell injury. J Lab Clin Med. 113: 612-623 (1989).

286-Weiner, M.W.: Magnetic Resonance measurements of renal metabolism, structure and function. Seminars in Nephrology, vol 6 (2): 139-152 (1986a).

287-Weiner, M.W.: Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy of the Kidney. In Curr Nephrol. 9: 467-500 (1986b).

- 288-Weiner, MW: The promise of magnetic resonance spectroscopy for medical diagnosis. *Invest Radiol* 23: 253-261 (1988).
- 289-Welbourne, T.C.; Bazer, G.T.: Mitochondrial glutamine permeability and renal ammonia production in metabolic acidosis. *Am J Physiol* 239: E51-E56 (1980).
- 290-Wells, P.N.T.: Ultrasonic imaging. In Wells: Scientific basis of medical imaging. Churchill Livingstone (1982).
- 291-Wilken, D.R.; McMacken, M.L.; Rodriguez, A.: Choline and Betaine aldehyde oxidation by rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 216: 305-317 (1970).
- 292-Williams, S.R.; Gadian, D.G.; Proctor, E., et al: ^1H NMR studies of muscle metabolism in vivo. *Biochem Soc Trans* 13: 839-840 (1985).
- 293-Wirthenson, G.; Beck, F.X.; Guder, W.G.: Role and regulation of glycerophosphorylcholine in rat renal papilla. *Pflügers Arch* 409: 411-415 (1987).
- 294-Wirthensohn, G.; Guder, W.G.: Renal substrate metabolism. *Physiol Rev* 66: 469-497 (1986).
- 295-Wirthensohn, G.; Lefrank, S.; Schnolke, M. et al: Regulation of organic osmolyte concentrations in tubules from rat renal inner medulla. *Am J Physiol* 256: F128-F135 (1989).
- 296-Wolff, S.D.; Balaban, R.S.: Application of ^{23}Na nuclear magnetic resonance to the study of the kidney. In Solez and Racusen (eds). *Acute Renal Failure*. New York. Marcel Dekker (1990).

297-Wolff, S.D.; Balaban, R.S.: Proton NMR spectroscopy and imaging of the rabbit kidney, in vivo, at 4,7 Tesla. J Mag Res 75: 190-192 (1987a).

298-Wolff, S.D.; Balaban, R.S.: Study of renal organic osmolyte function using NMR spectroscopy and imaging. Ann Meet Soc Mag Res Med 6th, New York. p:187 (1987b).

299-Wolff, S.D.; Eng, C.; Balaban, R.S.: NMR studies of renal phosphate metabolites in vivo: effects of hydration and dehydration. Am J Physiol 255: F581-F589 (1988).

300-Woods, H.E.; Krebs, H.A.: The effect of glycerol and hydroxyacetone on hepatic adenine nucleotides. Biochem J 132: 55-60 (1973).

301-Yagil, Y.; Myers, B.D.; Jamison, R.L.: Course and pathogenesis of postischemic acute renal failure. Am J Physiol 255: F257-F264 (1988).

302-Yancey, P.H.; Clark, M.E.; Hand, S. C., et al: Living with water stress: Evolution of osmolyte systems. Science 217: 1214-1222 (1982).

303-Young, I.R.; Bailes, D.R.; Burl, M., et al: Initial clinical evaluations of a whole body nuclear magnetic resonance (NMR) tomograph. J.C.A.T. 6: 1-18 (1982).

304-Zipp, T.; Tannen, R.: Influence of phosphoenol pyruvate carboxykinase inhibition on the response of NH_3 production to acute acidosis. J Lab Clin Med 102: 198-204 (1983).