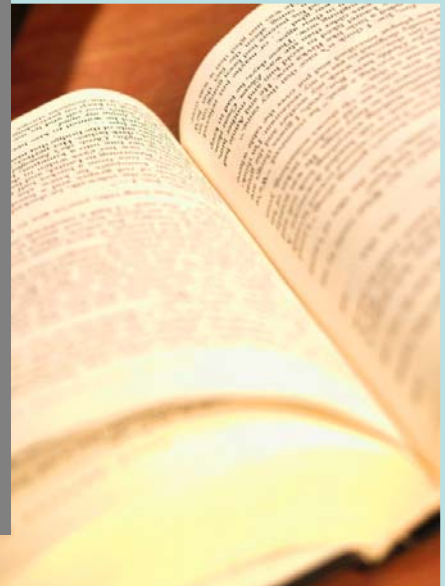


DISCUSIÓN



8.1.-RESULTADOS ANALITICOS

8.1.1.-Perfil lipídico.

Los niveles de colesterol del grupo control de dieta aterogénica superan de forma significativa (1136.00 ± 196.2) a los obtenidos en el grupo control sano (95.1 ± 5.93); y también respecto a los resultados obtenidos en los restantes grupos. En el capítulo sobre estatinas (puntos 4.4 y 4.5) aparece extensa bibliografía sobre las propiedades de estos compuestos, dentro de nuestro grupo Ortega en 2002, ha obtenido resultados similares en cuanto al papel de la atorvastatina como hipolipemiante. También en otros estudios sobre diversas estatinas (Levy, 1993; Brown et al, 2001; Eidelman et al, 2001) se confirma el papel que ejerce la atorvastatina, y otros compuestos dentro del grupo de estos fármacos.

Entre los grupos de intervención, aunque las diferencias en los resultados no son estadísticamente significativas en el tiempo que ha durado esta investigación, sí que se observa un descenso de los niveles de colesterol y triglicéridos en los de regresión espontánea, más potenciado en el grupo de intervención y regresión.

Castelao Martínez (2005) refiere que en los pacientes tratados con estatinas aparece una elevación de las transaminasas hepáticas en menos de un 5% de los casos, en el tiempo en que se ha desarrollado la experimentación no hemos encontrado diferencias significativas y no podemos hablar de alteración de las enzimas hepáticas debido al tratamiento.

8.1.2.-PCR como marcador de proceso inflamatorio.

En la arteriosclerosis participan diferentes componentes implicados en la respuesta inflamatoria crónica: reclutamiento celular, proliferación celular, esclerosis y neovascularización.

Mediante el estudio de los diferentes marcadores de la inflamación se ha analizado el papel de las estatinas en el proceso inflamatorio. En particular la PCR, proteína C reactiva, refleja inflamación a nivel sistémico.

Estudios en humanos han demostrado que las estatinas son capaces de reducir la PCR sérica en pacientes hiperlipidémicos (Ridcker et al 2001) incluyendo a los que se encuentran en hemodiálisis (Chang et al 2002). El valor predictivo de la PCR para el evento coronario agudo es de especial relevancia en pacientes con patologías tan profundamente ligadas como es la enfermedad cardiovascular y la glomeruloesclerosis.

Estudios en estos fármacos útiles en el proceso arteriosclerótico indican también su capacidad antiinflamatoria (Van Wissen et al 2002; Gómez Gerique et al 2002). De acuerdo con esto, estos tratamientos son especialmente efectivos en reducir la incidencia de eventos coronarios en la población con altos niveles de PCR.

Se ha demostrado mediante estudios angiográficos (Brown et al, 1996) que el beneficio clínico de los pacientes tratados con estatinas no corresponde por completo al enlentecimiento en la progresión de la lesión; las estatinas poseen otras propiedades derivadas de sus efectos pleiotrópicos sobre la disfunción endotelial (Blanco-Colio et al 2003), la

trombogenicidad y el efecto antiinflamatorio, como ya hemos referido en el capítulo de antecedentes.

Stuvelin et al en 2003, examinaron la relación entre PCR y tasa de filtración glomerular en un grupo de pacientes no diabéticos con insuficiencia renal leve. Encontraron que la PCR estaba proporcionalmente relacionada con factores de riesgo cardiovasculares y renales. También describieron una relación directa entre inflamación, medida como PCR, e hiperfiltración.

La PCR es una proteína muy sensible que refleja bajos grados de inflamación a nivel sistémico (Barman and Gauldie ,1994).

Recientemente el uso de la PCR ultrasensible ha demostrado ser de gran utilidad como marcador en procesos inflamatorios. López Fernández et al (2006) analiza y relaciona la concentración de PCR-us y la presencia de síndrome metabólico.

En los resultados analíticos obtenidos en nuestro estudio, ha destacado que los valores de PCR del grupo control sano fueron significativamente inferiores al resto de los grupos.

En el estudio ATOMIX (Gómez-Gerique et al, 2002), el uso de la atorvastatina en pacientes con hiperlipemia combinada, redujo la PCR de forma significativa a los 6 y a los 12 meses de tratamiento.

Sin embargo en nuestro estudio, no se observa una diferencia estadísticamente significativa de PCR entre ningún grupo de intervención (C, D y E). Aunque en los animales de los grupos D y E (tratados con atorvastatina), sí se observó una tendencia a disminuir los niveles de PCR, esto no constituyó una diferencia estadísticamente significativa en

el tiempo que duró el estudio experimental; es esperable un descenso significativo de la PCR en los grupos de intervención en estudios a más largo plazo como en los casos antes referidos. Así como sería de interés medir la PCR ultrasensible como han postulado López-Fernández et al recientemente.

Debido a las características de nuestro modelo de estudio, no ha sido posible determinar factores de función renal como la creatinina o la proteinuria.

8.2-VALORACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS. MUESTRAS HISTOLÓGICAS DE RIÑÓN.

Para evaluar la afectación renal y el remodelado glomerular, hemos valorado diversos parámetros a nivel histológico: depósitos de grasa, inflamación, fibrosis, daño glomerular, marcadores inmunocitoquímicos y afectación del sistema vascular renal.

8.2.1-Efectos de la atorvastatina sobre los depósitos grasos en los distintos grupos experimentales.

En nuestro estudio se han valorado los depósitos grasos a nivel renal en los distintos grupos experimentales.

Se ha demostrado cómo la hiperlipidemia exacerba la enfermedad renal. La arteriosclerosis se inicia con el depósito de grasa y la formación de células espumosas a distintos niveles, lo que representa la fase

xantomatosa o de lesión inicial. En este estudio entre otros objetivos evaluamos cómo altos contenidos de colesterol en plasma, se traducen a nivel renal y el efecto que tiene el tratamiento con atorvastatina en los distintos grupos.

En revisiones bibliográficas, no hemos encontrado similares estudios en los que se cuantifique mediante análisis de imagen la cantidad, morfología, así como la distribución de los depósitos grasos en riñón en distintos grupos de experimentación; aunque Vazquez-Pérez et al (2001), refieren cómo la atorvastatina reduce el contenido lipídico renal en conejos alimentados con dieta hiperlipémica, no realizan una descripción morfométrica. Su estudio se centró en el efecto de la atorvastatina en el daño glomerular. Wilson et al (2003) demostraron el efecto de otra estatina, la simvastatina para disminuir la fibrosis y la proliferación mesangial en el riñón en un modelo de cerdos.

Los resultados de nuestro estudio confirman, el efecto beneficioso de la atorvastatina sobre la reducción de los depósitos de grasa renal.

De la valoración semicuantitativa referente a ausencia/presencia de grasa, es de destacar que el efecto de la atorvastatina sobre la presencia de grasa en el riñón produce una reducción significativa siempre que vaya acompañada de una dieta adecuada (grupo D, 39.72%). Ni la dieta por sí sola (Grupo C, 75.47%) ni la atorvastatina administrada al grupo de progresión (Grupo E, 66.66%) provocan beneficios significativos (Grupo control B, 72.89%) sobre la presencia de grasa en parénquima renal en el tiempo empleado en este experimento. Aunque el grupo E, de progresión y tratamiento con estatinas, muestra menor presencia de grasa en riñón

(66.66%) que los grupos B, grupo de dieta aterogénica (72.89%) y C, grupo de regresión sin intervención (75.47%), no podemos decir que la atorvastatina en el tiempo empleado impida la progresión de forma significativa. Vázquez Pérez et al en 2001, encuentran en su estudio que la atorvastatina reduce el contenido renal lipídico basándose en una disminución del daño glomerular. Sin embargo, no realizan ningún tipo de estudio morfométrico de los depósitos grasos. Zager (1999 y 2002) describe los cambios adaptativos en los túbulos proximales tras provocar lesión renal. Ésta consistió en un incremento de un 25-50% de contenido de colesterol en la membrana celular de los túbulos, obtenidos del análisis de los perfiles de colesterol y fosfolípidos.

Entre las muestras que presentaban depósitos grasos, se realizó una valoración del tipo de depósito. Se estudió la distribución de los mismos según fueran inclusiones lipídicas aisladas, acúmulos grasos o ambos tipos de depósitos.

El grupo B, mostró tanto células con inclusiones lipídicas aisladas como formando grandes acúmulos. Este tipo de distribución mixta presentó una diferencia significativa con el resto de los grupos. Posteriormente se halló el porcentaje del tipo de distribución de los depósitos lipídicos en cada grupo, lo que nos dió una idea más definida de la distribución de cada tipo de depósito relacionada con la afectación renal. En la observación de las muestras de riñón que contenían grasa del grupo B (control con dieta aterogénica) el 100% resultaron de tipo mixto presentando grandes acúmulos grasos y células aisladas con inclusiones lipídicas, se observó que los depósitos grasos invadían las células

contiguas generando grandes acúmulos de $37\mu\text{m}$ de diámetro, lo que interpretamos como una característica de una mayor afectación grasa en el riñón.

Al retirar la dieta se observa una disminución de los depósitos grasos (grupo C, 27.5% de tipo mixto), esta disminución es mucho mas patente cuando además se suministra atorvastatina (grupo D) en este grupo sólo el 17.24% de observaciones fueron de tipo mixto quedando reducido la mayoría de los depósitos grasos a pequeños depósitos en células aisladas (55.17%), de forma aislada se encontraban pequeños acúmulos de $12\mu\text{m}$ de diámetro. El hecho de suministrar atorvastatina sin eliminar la dieta grasa (Grupo E) reduce ligeramente el contenido graso pero mantiene un alto porcentaje de acúmulos grasos de gran tamaño (60%).

Según lo observado los datos nos pueden sugerir que la enfermedad grasa en riñón en su inicio presenta pequeños depósitos en células aisladas, a medida que avanza la afectación, los depósitos grasos tienden a ocupar la mayor parte del citoplasma en varias células contiguas, formando acúmulos grasos de mayor tamaño.

Dentro del análisis de las características morfológicas del acúmulo graso se ha estudiado el área, el diámetro máximo y el factor forma circular.

Los mayores valores de diámetro (37.37 ± 1.46) y área de los acúmulos grasos (614.43 ± 42.8) se encontraron en el grupo B; estos acúmulos mantenían diferencias significativas con todos los grupos.

Al encontrar diferencias estadísticas entre el grupo B, y el resto de los grupos, tanto en área como en diámetro máximo, se puede concluir que la atorvastatina acelera la regresión del depósito de grasa e impide de forma significativa la progresión de la enfermedad renal por depósito de grasa.

Según los resultados obtenidos, el efecto de esta estatina sobre la eliminación de los depósitos de grasa y en la reducción del área y diámetro de los mismos comienza con una disminución del tamaño de estos acúmulos grasos. En nuestra experimentación y en el tiempo empleado, hemos observado una disminución significativa de la grasa renal en el grupo de progresión con intervención en comparación con el grupo B, de dieta aterogénica, por lo que podemos decir que frena la progresión.

En resumen, como conclusión del estudio de los depósitos grasos, que encontramos al suministrar la dieta aterogénica, es decir en los especímenes más afectados y con más acúmulos grasos, se observa que estos son de mayor tamaño y de forma irregular. Sin embargo, al añadir atorvastatina y de forma más destacada, si realizamos a la vez una retirada de la dieta aterogénica, el tamaño y la cantidad del depósito de grasa disminuye, aumentando la dispersión de la grasa, situándose en células aisladas y tomando forma circular los pequeños acúmulos restantes.

8.2.2-Inflamación y fibrosis

Los valores de PCR resultaron ser altos en los grupos experimentales a excepción de los del grupo A. El grupo A fue el único que mostró diferencias significativas con los restantes. Este parámetro analítico plasmático no tuvo correspondencia con la afectación a nivel histológico, ya que, como hemos descrito anteriormente de forma cualitativa, encontramos algún foco inflamatorio en el grupo B y de forma escasa en el grupo E, pero no ha sido posible realizar una valoración cuantitativa. Tampoco hemos obtenido fibrosis renal en el tiempo que ha durado la experiencia. Esto supone una diferencia con los resultados obtenidos por Wilson et al (2003), los cuales en su modelo de cerdos y fibrosis renal inducida por dieta aterogénica si demostraron que la simvastatina reducía la fibrosis y la inflamación. En nuestro caso y sólo de forma cualitativa, al encontrar que los focos inflamatorios destacan especialmente en el grupo B podemos decir que la atorvastatina puede haber disminuido los focos inflamatorios.

8.2.3.-Daño glomerular

8.2.3.a- Efectos de la atorvastatina sobre el grado de lesión glomerular en los distintos grupos experimentales. Valoración semicuantitativa.

Al estudiar el grado de lesión glomerular se plantearon dos cuestiones a resolver: elegir una escala de daño glomerular válida y la necesidad de diferenciar entre dos tipos de glomérulos característicos de

la anatomía de las aves, los de tipo reptiliano que predominan en la corteza y que son menores y caracterizados por un mesangio central y compacto y los de tipo mamífero que predominan en la médula. Para el análisis estudiamos por separado los glomérulos de tipo mamífero y reptiliano, incidiendo en que los que son objeto de nuestro estudio son los de tipo mamífero muy similares a los de otros animales de experimentación como la rata; tomamos como diámetro mínimo para considerarlos glomérulos de tipo mamífero 94µm.

Boffa et al (2003) establecen una clasificación semicuantitativa para valorar el daño renal en el proceso de glomeruloesclerosis, según el porcentaje de los depósitos de matriz mesangial, al encontrarnos ante un estudio en el que no hemos alcanzado la fibrosis ni hemos podido cuantificar la inflamación adoptamos esta clasificación porque nos resulta la más adaptable a nuestro modelo de estudio. El Nahass et al (1991) utilizan una clasificación similar, aunque utilizando también el engrosamiento de la membrana basal; esta fue empleada posteriormente por Adamczak et al en 2003. Estos estudios experimentales, todos realizados con lesiones en ratas, demuestran que la valoración de los depósitos de la matriz extracelular y la hialinosis constituyen una buena herramienta para la clasificación del daño glomerular.

Hemos querido estudiar el grado de lesión glomerular primeramente de forma conjunta, sin distinguir los glomérulos de tipo reptiliano y mamífero.

Comprobamos que no existían diferencias significativas entre el grupo control sano (A) y el grupo de regresión con intervención (D); se

puede decir que la atorvastatina acompañada de una dieta adecuada acelera la regresión pues ambos presentaban un grado de lesión glomerular próximo a 2 según la clasificación de Boffa et al (2003). Sí que presentaban un grado de lesión significativamente menor que los restantes grupos.

El grupo B presentó diferencias significativas con todos los grupos. Al presentar este grupo, un grado de lesión significativamente mayor que el grupo E, se puede concluir que la atorvastatina además de acelerar la regresión ha frenado la progresión. Nuestros resultados son análogos a los obtenidos con simvastatina en ratas alimentadas con una dieta rica en sal e inhibición de óxido nítrico (Vieira, 2004). La simvastatina y la atorvastatina actúan de igual modo frenando la progresión de la proliferación mesangial.

Cuando aplicamos la clasificación de Boffa et al (2003) en los glomérulos de tipo reptiliano, encontramos que los del grupo de dieta aterogénica presentaban el mayor grado de daño glomerular y mostraban diferencias significativas con los restantes grupos. Los que menor daño glomerular presentaban de forma significativa eran los del grupo D encontrando una correspondencia entre el menor grado de daño glomerular y el tratamiento con atorvastatina. Se concluye que esta estatina actúa en los corpúsculos reptilianos, acelerando la regresión.

Entre los glomérulos de tipo mamífero los resultados reflejaban que el grado de lesión del grupo B era significativamente mayor que el resto de los grupos. También fue significativo el menor índice de daño glomerular del grupo D con respecto al resto, lo que significa que la

atorvastatina frena la progresión y acelera la regresión del daño glomerular en este tipo de glomérulos.

Al no encontrar diferencias significativas entre los valores del grupo A y C se puede deducir que el daño glomerular es un proceso que puede revertir al cesar la injuria al igual que ocurre en las ratas Zucker (Kasiske et al en 1988).

Es de destacar la similitud en los resultados obtenidos al realizar el análisis de daño renal tomando los glomérulos de los dos tipos por separado o de forma conjunta.

8.2.3.b- Valoración cuantitativa de la hipertrofia glomerular en los distintos grupos experimentales

Otra característica que indica daño glomerular es la hipertrofia del glomérulo debido a la expansión mesangial, pues en etapas posteriores destacan la fibrosis y la esclerosis y el glomérulo reduce su tamaño. Yoshida et al (1989), y posteriormente Adamzack (2003), comprueban que en fases tempranas de glomeruloesclerosis existe una correlación positiva entre índice de glomeruloesclerosis y volumen glomerular. En glomeruloesclerosis avanzada el ovillo glomerular encoge. En su experiencia comprueban el remodelado vascular al observar la reversibilidad de la hipertrofia en los glomérulos de las ratas tratadas con enalapril a pesar de la lesión practicada en ellas. Esta reversibilidad es una cualidad que puede aplicarse a la atorvastatina.

En nuestro modelo no encontramos diferencias importantes con respecto al diámetro equivalente del corpúsculo, resaltamos el caso de los glomérulos de tipo mamífero, los cuales son el objeto de nuestro estudio.

Tras hallar el diámetro equivalente de los corpúsculos de tipo reptiliano y de los de tipo mamífero, encontramos que la atorvastatina no parece ejercer ninguna influencia en el diámetro de los corpúsculos.

Para medir la hipertrofia glomerular valoramos el área del ovillo glomerular por análisis de imagen. Vázquez Pérez et al (2001) en un ensayo experimental alimentaron durante 12 semanas a conejos de Nueva Zelanda con una dieta hipercolesterolémica o normal, tratando a ambos con una dosis de 1mg/kg/día de atorvastatina. Posteriormente midieron el área del ovillo glomerular mediante técnicas de imagen y los resultados reflejaron que los glomérulos de conejos hipercolesterolémicos se mostraban hipertróficos y que la atorvastatina previno la hipertrofia glomerular.

Hemos medido de forma semejante en nuestro ensayo el área glomerular en los glomérulos de tipo reptiliano y de tipo mamífero.

En los glomérulos de tipo mamífero el grupo de dieta hipercolesterolémica mostró un área ($5957.19 \pm 334.94 \mu\text{m}^2$) significativamente mayor que la del grupo control ($4541.66 \pm 240.27 \mu\text{m}^2$) y que la del grupo de regresión ($4451.00 \pm 306.13 \mu\text{m}^2$) y de regresión con intervención ($4392.63 \pm 267.25 \mu\text{m}^2$). No se hallaron diferencias significativas en cambio, en el grupo de progresión con tratamiento con atorvastatina ($5028.35 \pm 162.02 \mu\text{m}^2$), aunque sí que muestra una medida

inferior al grupo B ($5957.19 \pm 334.94 \mu\text{m}^2$) esto, en el tiempo empleado, no constituye una diferencia estadísticamente significativa.

Estos datos ponen de manifiesto de nuevo, el beneficio que supone para el daño renal, el haber cambiado la dieta hipercolesterolémica por una alimentación adecuada, ya que tan sólo, con el cambio de dieta se produce una disminución de la hipertrofia. Esta acción sobre el remodelado se ve mas potenciada al añadir atorvastatina. No tenemos datos estadísticamente significativos para hablar de el efecto de la atorvastatina en el caso del grupo de progresión con intervención, pero los resultados animan a realizar ensayos a más largo plazo.

Madox et al 2002, demuestra en un ensayo en ratas Zucker obesas que la restricción dietética en estadios tempranos ayuda a prevenir la hipertrofia glomerular y posiblemente a revertirla. A los tres meses de restricción dietética obtiene una reducción del área glomerular del 33% sobre el grupo hipercolesterolémico. Estos resultados concuerdan exactamente con el 33% de reducción del área glomerular obtenido en nuestro grupo de regresión con respecto al grupo B. Con lo que concluimos que a pesar de la distinta morfología del riñón de las aves y de los mamíferos y puesto que con dos modelos tan diferentes, ratas Zucker y pollos se han llegado a los mismos resultados, pensamos que este ave es un buen modelo experimental para el estudio del daño renal inducido por lípidos.

Vázquez Pérez et al (2001), postula que la atorvastatina acompañada de una dieta hipercolesterolémica reduce pero no normaliza la hipertrofia glomerular. A diferencia nuestra, ellos no emplean el grupo

de regresión espontánea, ni de regresión con intervención. En nuestro experimento, si alcanzamos unas medidas similares a los glomérulos de pollos sanos en nuestro grupo de regresión y tratamiento con atorvastatina. Por lo que en nuestra experimentación llegamos a reducir y normalizar los valores del área glomerular.

Adamzack et al (2003) en ratas nefrectomizadas y tratadas con enalapril comprobaron la reversibilidad del daño glomerular en fases iniciales de glomeruloesclerosis, siempre que no existiera denudación de la membrana basal, en nuestro estudio también hemos llegado a la regresión de la lesión renal sin haber encontrado denudación de la membrana basal por microscopía electrónica. Nuestro grado de afectación del grupo aterogénico no llega a alcanzar este grado de lesión. En este grupo permanecen las características ultraestructurales funcionales de la membrana de filtración glomerular, manteniéndose el espacio urinario y la morfología normal de los pedicelos. La única afectación importante en el glomérulo se corresponde con la presencia de vacuolas lipídicas y un aumento del grosor de la membrana basal, así como de la hipertrofia de las células mesangiales. Gassler et al (1998) en ratones knockout *blc2* también describe un aumento del mesangio y podocitos con vacuolas, gotas de absorción y pseudoquistes, llegando a observar denudación de la membrana basal, lo que indica un grado de afectación mayor al que obtuvimos en nuestra experimentación.

8.3-ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS INMUNOCITOQUÍMICOS

8.3.1-Análisis de la inmunorreactividad a α - actina.

La proliferación excesiva de las células mesangiales es característica de daño renal y se asocia normalmente a la expansión de la matriz lo que da lugar al desarrollo de la glomeruloesclerosis. La proliferación de las células mesangiales se desarrolla en respuesta a numerosos factores de crecimiento y precede a la esclerosis.

Para el estudio específico del daño glomerular, hemos determinado la expresión de α -actina, el cual es un indicador de la activación de las células mesangiales. Hemos empleado tres parámetros para evaluar el contenido de α -actina en el glomérulo mediante análisis de imagen. En dos de ellos teníamos en cuenta tanto el área inmunorreactiva como el nivel de gris invertido correspondiente a la inmunorreactividad. Estos son, el cociente entre áreas y gris invertido de las zonas inmunorreactivas y el corpúsculo y por otro lado, el producto del área inmunorreactiva y gris invertido dividido por el área del corpúsculo. En la cuantificación de estos dos cocientes el contenido de α -actina en el grupo control A es mayor que en el grupo D, regresión con atorvastatina. Sin embargo en la estimación del contenido de α -actina mediante el tercer parámetro, el cociente de área inmunorreactiva y área del corpúsculo de referencia, encontramos que el contenido de α -actina del grupo D es mayor que el del grupo A. Estas diferencias se deben, a considerar en este último parámetro, exclusivamente el área inmunorreactiva y no el nivel de gris que también está afectando a la cantidad de actina. Este parámetro de

cociente de áreas es una estimación menos precisa que los parámetros, que incorporan en la medida del contenido de α -actina, el nivel de gris.

Joles et al (2000), cuando investigaron la reactividad a α actina en los glomérulos de ratas hipercolesterolémicas e hipertriglicéridémicas evaluaron la inmunorreactividad mediante una asignación de puntos de tipo semicuantitativo. En sus resultados sólo observaron un incremento mínimo en la inmunorreactividad a α -actina, con un alto marcaje por desmina y se interpretó que el daño renal debido a los lípidos se producía de forma primaria, presentando borramiento de los procesos podálicos, es decir mediante la lesión del podocito más que por la vía de la proliferación mesangial.

En nuestras observaciones en microscopía electrónica no llegamos a encontrar este tipo de lesión de los podocitos. La afectación que resulta de la hiperlipidemia se corresponde con una hipertrofia de las células mesangiales, como queda claramente demostrado en el incremento de la inmunorreactividad a α -actina, así como un incremento de los depósitos de grasa tanto a nivel glomerular como tubular. Este incremento de depósitos grasos en túbulos proximales también se puso de manifiesto en el riñón de ratas obesas (Zager 1999). Nosotros encontramos depósitos grasos en vacuolas lipídicas dentro del citoplasma de los túbulos proximales y distales, en los grupos más afectados. También se encontró una alta actividad metabólica en las células tubulares de los grupos B y E, como lo demuestra el incremento de lisosomas y cuerpos residuales en el citoplasma.

En nuestra experiencia, hemos encontrado a diferencia de Joles et al (2000), que el aumento de colesterol circulante, produce una proliferación de la matriz mesangial, presentando el grupo aterogénico un drástico aumento de la inmunorreactividad a α -actina, lo que constituyó una diferencia estadísticamente significativa con respecto a los restantes grupos. Mientras que Joles et al (2000) no encontró proliferación mesangial a pesar del daño ultraestructural de los podocitos. Probablemente, la nefrectomía de las ratas de su experimentación, aceleró los procesos degenerativos y apoptóticos por un daño renal directo, observándose los primeros daños a nivel de cambios morfológicos ultraestructurales en los podocitos. Esta rápida intervención no ha dado lugar a la proliferación mesangial. Mientras que en un proceso de afectación, como sería nuestra experimentación que duró 3 meses de administración de dieta hipercolesterolémica seguida o no de intervención de otros 3 meses, probablemente el proceso de lesión sea mas gradual y ocurra por acúmulo progresivo de depósitos grasos y una proliferación mesangial gradual y que sólo, cuando alcanzan un determinado nivel, empiezan a ocasionar daños ultraestructurales. Esto explicaría que en nuestra experimentación encontráramos proliferación mesangial y depósitos grasos sin observar afectación ultraestructural de la membrana de filtración glomerular. Después de estos daños iniciales, manteniendo esta experimentación un tiempo más prolongado, la afectación pasaría a una última fase más grave, donde probablemente se observarían lesiones a nivel ultraestructural en los podocitos y membrana de filtración glomerular.

Tras evaluar la inmunorreactividad a α -actina en los grupos de intervención (D y E), tanto en el grupo de regresión como en el de progresión, obtuvimos marcaje a α -actina que fue significativamente inferior a los restantes grupos; esto sugiere que la atorvastatina, ejerce un papel inhibitor eficaz de la proliferación mesangial, y por tanto podemos concluir que acelera la regresión y frena la progresión. En este caso, la atorvastatina ha demostrado que posee un gran potencial para inhibir la activación de las células mesangiales e incluso revertir el proceso de remodelado glomerular.

8.3.2-Análisis de la inmunorreactividad a MMP-9 y IMP-3

La familia de metaloproteinasas incluye a las colagenasas, gelatinasas y estromalinas, que son Zn-dependientes y tienen la habilidad de degradar los componentes de la matriz extracelular a pH fisiológico (Woessner 1992).

Diversos estudios experimentales y clínicos han permitido establecer un papel de las MMP en varios procesos fisiológicos como en la degradación del endometrio funcional en el ciclo reproductivo femenino (Salamonsen, 2000), la cicatrización de heridas (Ravanti, 2000), regulación de la fibrinólisis (Lijnen,2002), remodelado epitelial (Ganz,1999), envejecimiento (Li,1999), y hay evidencias de que están implicadas en todas las fases del proceso arteriosclerótico (Loftus 2002).

En nuestro modelo de estudio, hemos elegido la detección de MMP9 y IMP3. La MMP9 degrada componentes de la matriz extracelular como colágenos III, IV, V y IX, gelatina, elastina, agregan, versican,

proteoglicanos y osteonectina. IMP3 es el inhibidor de la metaloproteinasa 3; esta metaloproteinasa degrada colágenos III, IV, V y IX, gelatina, agregán, versican, proteoglicanos, tenascina, fibronectina, laminina, y osteonectina.

Aunque hacen falta más estudios para determinar el papel de las metaloproteinasas en la glomeruloesclerosis sería de esperar una activación de las mismas cuando comienza la activación de las células mesangiales y la proliferación de la matriz extracelular.

Se ha demostrado la acumulación en el mesangio de colágeno tipo 4, fibronectina, laminina y proteoglicanos.

El recambio en la matriz extracelular es el resultado del balance entre la síntesis y la degradación. Algunas líneas de evidencia sugieren la implicación de las metaloproteinasas en estos procesos, incluyendo la matriz extracelular glomerular (Lovet DH 1992; Woessner JF 1991).

Schaefer et al (1997) estudiaron en ratas obesas Zucker las alteraciones potenciales de las MMP-2 y MMP-9 glomerulares las cuales son particularmente eficaces en la degradación de colágeno tipo IV, el mayor componente estructural de la matriz mesangial y la membrana basal glomerular (Davies 1992). Su investigación indicó una reducción de la actividad gelatinolítica en un temprano estadio de glomeruloesclerosis. Concluyen, que la actividad gelatinolítica del glomérulo ya está reducida al iniciarse la esclerosis en el glomérulo, lo que intensifica la supresión de la degradación de la matriz en su modelo y esto se basa en la menor expresión de MMP9, además de la sobreexpresión de IMP-1.

En contraste, Boffa et al (2003) en su experiencia de regresión de

la fibrosis vascular y glomerular en los riñones de ratas Sprague-Dawley tratadas con losartán describen el papel de las metaloproteinasas MMP9 y MMP2 en la glomeruloesclerosis. Sugieren que la recuperación de la función renal y la estructura renal se deben a dos mecanismos: la inhibición de la síntesis de colágeno debida al bloqueo de la actividad de angiotensina II y al aumento de la actividad de las metaloproteinasas.

Esta disparidad de resultados, indica que el papel de las metaloproteinasas en enfermedades renales aún está por aclarar; están aumentadas en una gran variedad de enfermedades renales humanas y en modelos animales de nefropatías (Norman, 1996). Sin embargo aparecen disminuidas en otros estudios. No está claro si su acción es protectora (Boffa et al 2003) o potencia el daño (Shaefer et al. 1997).

A diferencia de los resultados obtenidos por el grupo de Boffa et al (2003), en nuestros resultados no se observó inmunorreactividad cuantificable a nivel glomerular de MMP9 ni IMP3, tan sólo detectamos algunas células dispersas, sin que se encontraran cambios en los distintos tratamientos.

Crisby et al (2001), estudiaron en humanos el efecto de la pravastatina en placas de la carótida y determinaron las metaloproteinasas; observaron un aumento de la inmunorreactividad a IMP-1 y un descenso de la de MMP-2 en los grupos tratados con pravastatina. No había diferencias significativas entre MMP-1, MMP-9 y IMP-2 entre los grupos tratados con estatinas y los que no. El contenido de colágeno era significativamente mayor en los grupos tratados con estatinas.

En nuestros resultados, aunque parece inesperado el marcaje en los

túbulos renales, puesto de MMP9 e IMP3 deben estar relacionadas con el metabolismo del colágeno, encontramos reactividad en el citoplasma de estas células, sin que se deba a un falso marcaje puesto que no se encontró reactividad cuando sólo se incubó con la segunda capa. Al igual que nuestros resultados, otros autores también han obtenido marcaje en túbulos renales, (Piedagnal, et al. 1999), sin que se conozca su posible función fisiológica. También este marcaje podría corresponderse con la reacción cruzada a una proteína de este ave, de estructura muy similar al antígeno de la secuencia proteica de origen humano correspondiente y cuyo papel funcional en el riñón del ave puede ser distinto.

Encontramos un marcaje moderado en los túbulos proximales y distales, sin que se encontraran diferencias de inmunorreactividad a MMP9 y IMP3 entre los distintos grupos experimentales. Tan sólo destacó un mayor marcaje a MMP9 en los túbulos distales de la médula, mientras que esta diferencia no se observó con IMP3. También se localizaron depósitos de IMP3 junto a depósitos grasos.

En el análisis estadístico de la inmunorreactividad a MMP-9 en los túbulos proximales el grupo de dieta aterogénica mostró mayor inmunorreactividad; esto constituye una diferencia significativa con respecto al resto de los grupos y puede interpretarse que, al aumentar el daño renal aumenta la actividad de la metaloproteinasa. En el resto de los grupos es de destacar que en el grupo de regresión con intervención la inmunorreactividad a MMP9 presentó un valor menor de forma significativa con respecto a los grupos sano, aterogénico y de progresión con intervención.

En los resultados de la detección de MMP 9 en los túbulos distales, el grupo control sano fue el que mayor marcaje presentó mostrando una diferencia significativa con el resto. Entre los grupo B y D no se encontraron diferencias significativas. En los túbulos distales la inmunorreactividad no mostró un patrón definido y no podemos llegar a una relación para interpretar el papel de esta metaloproteinasa en los túbulos distales de los diferentes grupos experimentales.

En el caso de los túbulos distales de la médula renal, que mostraban una mayor inmunorreactividad a la MMP9 que el resto de los túbulos, sólo el grupo control sano mostró un marcaje significativamente mayor que el resto de los grupos; los restantes grupos no mostraron diferencias significativas entre ellos.

En el análisis realizado a la inmunorreactividad a IMP-3 no se observaron diferencias en el marcaje de los túbulos de los distintos grupos experimentales.

Como en el caso anterior no se encontró tras el análisis estadístico ningún dato que indicara activación o inhibición del IMP-3 ante el daño renal ni el efecto de la atorvastatina sobre dicho proceso.

Al igual que muchos de los trabajos previos, no podemos extraer ninguna conclusión sobre la relación de MMP9 e IMP3 y el daño renal.

8.4-CARACTERIZACIÓN DE LOS CAMBIOS DE LA ESTRUCTURA VASCULAR

En fases tempranas de desarrollo de la arteriosclerosis, cuando la enfermedad coronaria es mínima, el tamaño de la luz del vaso no se afecta ni por el crecimiento de la placa, ni por la expansión de la capa elástica externa, ni por el aumento del tamaño del vaso, esto se denomina remodelado positivo. Cuando el daño vascular progresa no hay más aumento del tamaño del vaso pero la placa aumenta y encoge la luz vascular (Glagov et al, 1987).

En el remodelado vascular, los cambios en la estructura son debidos a la hiperplasia, la hipertrofia y a la alteración en la matriz extracelular. Otros procesos implicados son: el crecimiento alterado de las células musculares lisas vasculares y el aumento de moléculas de adhesión, la inflamación y la incrementada expresión de moléculas de adhesión (Heagerty, 1993).

Schiffrin en 1992, ya destaca dos tipos de remodelado: el eutrófico, en el que se da una disminución del diámetro externo e interno, sin alterarse la pared, y la relación pared/luz está incrementada y el remodelado hipertrófico, hay proliferación e hipertrofia celular, aumenta el grosor de la pared y termina invadiendo la luz; se da también un incremento de la relación pared/ luz.

Domínguez et al en 2000, realiza un estudio en ratas con diabetes tipo II alimentadas con distintas dietas; en las ratas en cuya dieta disponían de un 40% de aceite de coco y soja realizó un marcaje con

α -actina para posteriormente medir las secciones con técnicas de imagen. Destacó un engrosamiento de la pared de las arterias renales de los especímenes enfermos, este ejemplo, aún siendo distintos modelos animales es comparable a nuestros resultados obtenidos del grupo aterogénico, no incluyó sin embargo grupos de intervención con los que contrastar nuestros resultados.

En otros estudios como los de Rogler et al en 1995 demostraron los efectos de la fluvastatina inhibiendo la proliferación y crecimiento *in vitro* de células vasculares de músculo liso en modelos porcinos y humanos.

En nuestro grupo hemos estudiado el efecto de la dieta hipercolesterolémica en los vasos renales de grupos experimentales de progresión y regresión con y sin intervención con atorvastatina. Para ello hemos analizado dos tipos de vasos, las arterias intralobulares, de mayor tamaño y las arteriolas renales de menor tamaño.

8.4.1-Análisis de los cambios histológicos en las arterias intralobulares

Las arterias intralobulares son vasos de mayor tamaño que las arteriolas aferentes y eferentes. Al analizar los resultados obtenidos tras hallar el diámetro externo observamos que entre el grupo control sano ($28.37 \pm 1.07 \mu\text{m}$) y los tratados con atorvastatina D ($28.50 \pm 1.25 \mu\text{m}$) y E ($32.00 \pm 1.62 \mu\text{m}$) no se encontraban diferencias significativas lo que indica el papel relevante de la atorvastatina con respecto al crecimiento de la capa media y a la reversibilidad del daño vascular, incluso en el

grupo de progresión con intervención, aunque este tampoco mostró en el tiempo establecido diferencias significativas con los grupos C ($36.66 \pm 1.30 \mu\text{m}$) y B ($35.61 \pm 1.33 \mu\text{m}$). Estos últimos grupos sí que mostraron un diámetro externo significativamente mayor que los grupos control y regresión tratados con atorvastatina.

Tras hallar el diámetro de la luz de los diferentes grupos no se observaron diferencias significativas en los resultados, lo que nos hace situarnos en etapas iniciales del remodelado vascular, donde aún no está afectada la luz vascular.

Cuando obtenemos los resultados del factor grosor de la pared de las arterias intralobulares, observamos que, de forma coherente con los resultados obtenidos al hallar el diámetro externo, el grupo A ($9.08 \pm 0.51 \mu\text{m}$) no presenta diferencias significativas con el grupo D ($11.00 \pm 0.73 \mu\text{m}$). Lo que indica que la atorvastatina con una dieta adecuada acelera la regresión de la enfermedad. No parece en este caso afianzar su papel para frenar la progresión de la enfermedad al no hallar diferencias significativas entre el grupo B ($15.23 \pm 0.69 \mu\text{m}$) y el E ($14.55 \pm 0.83 \mu\text{m}$) como también ocurría con el diámetro externo.

Al hallar la relación pared/luz en las arterias intralobulares nos encontramos que el grupo A mostraba una relación pared/luz menor ($0.52 \pm 0.05 \mu\text{m}$) de forma significativa que los grupos B, C y D.

Al igual que Domínguez et al en 2000 hemos observado cómo la dieta hipercolesterolémica causa un engrosamiento de la pared de las arterias renales y un aumento del diámetro externo sin afectar la luz del

vaso lo que nos hace situarnos en etapas tempranas de la arteriosclerosis. En el caso de las arterias intralobulares, podemos postular que la atorvastatina posee unas importantes propiedades para acelerar la regresión. Sin embargo no está tan claro su papel para frenar la progresión, para lo que se necesitarían estudios a más largo plazo.

8.4.2-Análisis de los cambios histológicos en las arteriolas.

Estudiamos también las arteriolas aferentes y eferentes del glomérulo.

Con respecto al diámetro externo la alimentación con dieta aterogénica, lo aumenta significativamente con respecto al control sano. Este proceso de daño vascular se ve disminuido con la retirada de la dieta. Al añadir atorvastatina a la retirada de la dieta se produce una regresión significativa del tamaño del diámetro renal. Sin embargo la atorvastatina por sí sola si no va acompañada de una dieta adecuada no produce una mejoría significativa.

Tras hallar el factor diámetro de la luz comprobamos que, al igual que en las arterias intralobulares, no existen diferencias significativas entre los resultados de los distintos grupos. Igualmente en el caso de estas pequeñas arterias estamos en fases iniciales de arteriosclerosis.

En el caso del grupo D la atorvastatina demostró de nuevo sus propiedades al acelerar la regresión, no hallando diferencias significativas entre el grosor de la pared grupo control ($5.55\pm 0.40\mu\text{m}$) y el del grupo de regresión con intervención ($4.51\pm 0.31\mu\text{m}$).

También mostró una mejoría significativa en el caso del grupo E ($9.72\pm 0.44\mu\text{m}$), de progresión con intervención, al compararlo con el grupo aterogénico B ($11.84\pm 0.55\mu\text{m}$) lo que indica que la atorvastatina constituye un freno a la progresión de la proliferación de la capa media, es decir, frena el remodelado vascular.

En el caso de la relación pared/luz, los grupos A y D mostraron unos resultados significativamente menores que los de los grupos restantes. El grupo E, de progresión con intervención, no mostró diferencias significativas con respecto a los grupos C y B.

Los resultados en ambos tipos de vasos, arteriolas y arterias intralobulares, nos llevan a postular el papel beneficioso de la atorvastatina sobre el remodelado vascular, se puede decir que acelera la regresión en ambos tipos de vasos. Sin embargo mientras que en las arterias intralobulares no podemos asegurar, en el tiempo que ha durado la experimentación, que esta estatina tenga un papel inhibitor de la progresión del remodelado vascular. En las arteriolas los resultados avalan el papel de la atorvastatina frenando la progresión.