

UNIVERSIDAD DR. JOSÉ MATÍAS DELGADO

RED BIBLIOTECARIA MATÍAS

DERECHOS DE PUBLICACIÓN

Basados en

El Reglamento de Graduación de la Universidad Dr. José Matías Delgado

Capítulo VI, Art. 46

“Los documentos finales de investigación serán propiedad de la Universidad para fines de divulgación”

Publicado bajo la licencia Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual de Creative Commons
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>



Se permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra siempre que se especifique el autor y el nombre de la publicación y sin objetivos comerciales, y también se permite crear obras derivadas, siempre que sean distribuidas bajo esta misma licencia

Para cualquier otro uso se debe solicitar el permiso a la Universidad

UNIVERSIDAD “DR. JOSE MATIAS DELGADO”

Facultad de Ciencias de la Salud

“Dr. Luis Edmundo Vásquez”

Escuela de Medicina

2010

TESIS PARA OPTAR POR EL TITULO DE

DOCTORADO EN MEDICINA

**DMSO Y Acido Ascórbico como Terapia de Protección en un
Modelo Animal de Isquemia-Reperusión**

ALUMNOS:

Br. Ligia María Alfaro Cruz

Br. Beatriz Eugenia García-Prieto C.

ASESOR:

Dr. William Hoyos

Dr. José Nicolas Astacio Soria

La Libertad, 15 de Diciembre de 2010

Agradecimientos

A Dios todopoderoso, por ser nuestro guía, y padre celestial, por brindarnos la sabiduría necesaria en cada momento y guiarnos con su espíritu, permitiéndonos no desfallecer y seguir adelante hasta obtener cada uno de nuestros logros. Gracias!

A nuestros padres, quienes nos han apoyado desde que empezamos esta ardua jornada, quienes nos han dado palabras de aliento, y quienes con su ejemplo han sido un modelo a seguir, de esfuerzo, trabajo y responsabilidad. Su amor ha sido incondicional, a través de los años, y ha sido nuestro motor para ser cada día mejores personas y profesionales.

Al Dr. William Hoyos, quién no solo ha sido un asesor, ha sido un mentor, un amigo, y un miembro más de este equipo, gracias por su apoyo incondicional a lo largo de esta investigación, gracias por sus consejos y su dedicación, sin ello, no hubiera sido posible.

Al Dr. José Nicolás Astacio, quien siempre nos ha apoyado, a lo largo de nuestra carrera, que ha sido un maestro excepcional, brindándonos su ayuda y sus conocimientos, impulsándonos cada día para ser los mejores.

A nuestros amigos, Paty y Gabriel, quienes han sido un pilar fundamental en esta investigación, les agradecemos por su amistad, sus consejos, sepan que tienen un lugar muy especial en nuestros corazones.

Hoja de Aprobación

Índice

Planteamiento del Problema	6
Justificación	8
Marco Teórico	10
Anatomía y Fisiología renal	10
Circulación renal	11
Nefrona: Unidad Funcional Renal	12
Daño renal agudo	14
Síndrome de Isquemia-Reperusión	18
Muerte Celular	24
Antioxidantes	31
Objetivos	39
Objetivo General	39
Objetivos Específicos	39
Metodología	40
Resultados	48
Discusión	69
Conclusiones	76

Recomendaciones	77
Cronograma	78
Presupuesto	79
Bibliografía	80

Planteamiento del Problema

El riñón es uno de los órganos que mayor susceptibilidad presenta a la isquemia, numerosas situaciones clínicas involucran mecanismos que afectan la perfusión de dicho órgano. La mortalidad asociada a la FRA se encuentra entre un 10 a 30% de todos los pacientes y continua en la actualidad sin un consenso para su tratamiento.

La terapia de dicha condición plantea la eliminación de la causa y la restitución del flujo sanguíneo con lo que se consigue una reentrada del oxígeno al órgano privado, esto supone un mayor daño hístico que el ocasionado por el periodo isquémico en donde se han visto involucrados los radicales libres.

El DMSO, barredor de radicales libres con acciones directas sobre eventos fisiopatológicos involucrados en el síndrome de isquemia reperfusión tales como: amortiguador del calcio intracelular, modulador inflamatorio, inhibidor de IL-8 entre otros e identificado como agente protector en estudios previos. Ha sido objeto de estudio por su efecto estabilizador de la membrana, disminuyendo la pérdida de sustancia de las células con lesión. El cual en estudios previos ha mostrado presentar una reducción en los daños histopatológicos y disminución de la función renal.^{1,2}

El ácido ascórbico, una vitamina hidrosoluble, con propiedades antioxidantes que participa en el crecimiento y reparación de tejidos en todas las partes del cuerpo, ha demostrado su eficacia al ser utilizados en modelos experimentales de ratas, donde disminuyó notablemente en modelos de isquemia-reperfusión el daño histológico.³

Dadas las características del DMSO y Acido Ascórbico y conocidas las implicaciones de la isquemia y reperfusión renal se busca con este estudio dar respuesta a la siguiente pregunta de investigación:

¿Tendrán el DMSO y el ácido ascórbico un efecto potenciador de la protección histica en el síndrome de isquemia reperfusión renal?

Justificación

La Falla renal aguda (FRA) es definida como un síndrome clínico caracterizado por la disminución o suspensión súbita en la filtración glomerular acompañada de la retención de productos nitrogenados y alteraciones en el equilibrio hídrico, ácido base y metabólico con un grado variable de afectación en el volumen urinario.⁴

FRA es la condición que amenaza la vida, cuya mortalidad se ha mantenido elevada a pesar de la introducción de la hemodiálisis hace 25 años. Para el nefrólogo esta condición es frustrante puesto que la fisiopatología no está claramente definida y las opciones terapéuticas con las que dispone son limitadas, siendo la diálisis el único tratamiento aprobado por la FDA con el que se cuenta; pero el cual incrementa el riesgo de falla renal crónica.⁵

Se estima que el 5% de todos los pacientes hospitalizados desarrollan FRA, con una mortalidad de 7% a 23% en pacientes sin comorbilidades la cual incrementa hasta en un 50 a 80% en pacientes que están en Unidades de Cuidados Intensivos.⁶ En El Salvador esta patología se sitió dentro de las primeras 10 causas de muerte hospitalaria para ambos sexos en el año 2008⁷, convirtiéndose en un llamado de atención nacional sobre la importancia de tomar acciones en el abordaje terapéutico.

La isquemia constituye el 50% de las causas de FRA⁴, Siendo el síndrome de Isquemia/Reperusión la principal causa de FRA, dicha entidad se hace presente en numerosas condiciones clínicas como el trasplante renal, reconstrucción de lesiones a nivel arterial, shock hipovolemico, condiciones cardíacas y aumento de la resistencia vascular renal por obstrucción vascular renal.

El síndrome de isquemia-reperusión se define como el proceso que sufre un órgano

sometido temporalmente a la falta de flujo sanguíneo y que posteriormente es reperfundido con sangre oxigenada⁸.

En la fase de isquemia los hallazgos encontrados son: vasoconstricción, edema tubular y descamación junto a la activación celular endotelial⁹. Durante la isquemia se produce un incremento de los radicales libres derivados del oxígeno que contribuyen al daño celular. Se ha demostrado que durante la reperfusión el radical anión superóxido reacciona con el óxido nítrico (NO), dando lugar a la formación de peroxinitrito el cual disminuye la vida media del NO y reduce su disponibilidad biológica llevando a un aumento del tono vascular renal y disminuyendo la excreción de agua y sodio.

La lesión posisquémica o de reperfusión esta mediada por la inactivación del óxido nítrico provocada por los radicales libres. Esto contribuye al deterioro de la función renal por una falla en la perfusión capilar que lleva a la hipoxia celular. Así mismo otros mecanismos que intervienen son el aumento en la adhesión leucocitaria al endotelio, agregación plaquetaria, edema intersticial, disminución de la vasodilatación dependiente del endotelio¹.

En consecuencia, se ha hipotetizado que la eliminación de radicales libres derivados del oxígeno o especies reactivas de oxígeno (ERO), mediante sustancias antioxidantes, reduciría la intensidad de las lesiones posreperfusión y prevendría la disfunción endotelial.

La insuficiencia renal aguda postransplante representa una morbilidad significativa ya que incrementa el riesgo de rechazo agudo o crónico al trasplante, si este fallo renal agudo se pudiera prevenir sería posible lograr una tasa de mayor éxito en trasplante renal.

Marco Teórico

Anatomía y Fisiología renal

Los riñones, ocupan una posición retroperitoneal en la pared posterior del abdomen; cada uno se encuentra a un lado de la columna vertebral, a la altura de las vértebras T12 a L3. Los riñones tienen un aspecto rojizo-pardo en vida y miden aproximadamente 10cm de longitud, 5cm de ancho y 2.5cm de grosor, con un peso entre 130gr-150gr. Por la cara superior, los riñones se relacionan con el diafragma, que los separa de las cavidades pleurales y del 12^a par de costillas. En un plano más inferior, el riñón se relaciona con el músculo cuadrado lumbar por su cara posterior. El hígado, el duodeno y el colon ascendente se sitúan anteriores al riñón derecho. El riñón izquierdo se relaciona con el estómago, el bazo, el páncreas, el yeyuno y el colon descendente.¹⁰

La cara interna de cada riñón tiene una región en forma de muesca, llamada hilio, a través de la cual pasan la arteria y la vena renal, los linfáticos, los nervios y el uréter. Al practicarse un corte longitudinal de los riñones, las dos regiones principales que pueden verse son la corteza externa y la región interna llamada médula. La médula está dividida en numerosas masas de tejido de forma cónica llamadas pirámides renales. La base de cada pirámide nace en el límite entre la corteza y la médula y termina en la papila que penetra en el espacio de la pelvis renal. El borde externo de la pelvis se divide en pequeñas bolsitas de extremos abiertas llamadas cálices mayores, los cuales se extienden por debajo y se dividen en cálices menores.¹¹

Los riñones realizan numerosas funciones, que permiten mantener la homeostasis, entre ellas se encuentran:

- 1- Excreción y biotransformación de los productos metabólicos de desecho y de sustancias químicas extrañas.
- 2- Regulación del equilibrio hídrico y electrolítico.
- 3- Regulación de la osmolalidad de los líquidos corporales y de las concentraciones de electrolitos.
- 4- Regulación del equilibrio ácido-básico.
- 5- Regulación de la presión arterial.
- 6- Secreción, metabolismo y excreción de hormonas.
- 7- Regulación de la eritropoyesis.

Circulación renal

El flujo sanguíneo renal constituye, en condiciones normales, aproximadamente el 22% del gasto cardíaco, es decir, unos 1100ml/min. La arteria renal entra en el riñón a través del hilio y, luego, se ramifica sucesivamente para formar las arterias interlobulares, las arterias arciformes, las arterias interlobulillares y las arteriolas aferentes, que dan lugar a los capilares glomerulares. Los extremos distales de los capilares de cada glomérulo confluyen y forman la arteriola eferente, que da lugar a una segunda red capilar formada por los capilares peritubulares, que rodean a los túbulos renales.^{10,11}

La circulación renal es peculiar por tener dos lechos capilares, el glomerular y el peritubular, cuyos capilares están dispuestos en serie y separados por las arteriolas eferentes, las cuales ayudan a regular la presión hidrostática. Una presión hidrostática elevada en los capilares glomerulares (+/- 60mmHg) produce una filtración de líquido rápida, mientras que una presión hidrostática mucho más baja en los capilares peritubulares (+/-13mmHg) permite la rápida reabsorción de líquidos. Ajustando las

resistencias de las arteriolas aferentes y eferentes, los riñones pueden regular las presiones hidrostáticas tanto en los capilares glomerulares como en los peritubulares, modificando de esa manera la filtración glomerular, la reabsorción tubular, para responder a las demandas homeostáticas del organismo. Los capilares peritubulares vacían en los vasos del sistema venoso, que discurren paralelamente a los vasos arteriulares y forman sucesivamente la vena interlobulillar, la vena arciforme, la vena interlobular y la vena renal que sale del riñón junto a la arteria renal y el uréter.¹¹

Nefrona: *Unidad funcional renal.*

Es la unidad funcional del riñón, cada riñón está formado por 1 millón de nefronas. El riñón no puede regenerar nefronas nuevas; por lo tanto, las lesiones o las enfermedades renales, o el envejecimiento normal, producen una pérdida progresiva del número de nefronas. Cada nefrona contiene un penacho de capilares glomerulares, denominado glomérulo, a través del cual se filtran grandes cantidades de líquido de la sangre, y un largo túbulo en el que el líquido filtrado se convierte en orina en su recorrido hacia la pelvis renal. Los capilares glomerulares están recubiertos por células epiteliales y la totalidad del glomérulo está revestido por la cápsula de Bowman. El líquido que se filtra en los capilares glomerulares discurre por el interior de la cápsula de Bowman y, luego, por el túbulo proximal, que se encuentra en la corteza del riñón. Desde el túbulo proximal, el líquido fluye al interior del asa de Henle que se hunde en la médula renal. Cada asa está formada por una rama descendente y una rama ascendente. Las paredes de la rama descendente y el extremo inferior de la rama ascendente son muy delgadas y, por eso se les llama segmento delgado del asa de Henle. Después de que la rama

ascendente del asa haya retrocedido parcialmente hacia la corteza, sus paredes se vuelven tan gruesas que recibe el nombre de segmento grueso de la rama ascendente.

Al final de la rama ascendente gruesa hay un segmento corto que, en realidad, es una placa situada en la pared, que se conoce como mácula densa, está desempeña un papel importante regulando la función de las nefronas. Pasada la mácula densa, el líquido atraviesa el túbulo distal que, al igual que el túbulo proximal, se encuentra en la corteza renal. El túbulo distal va seguido de túbulo de conexión y del túbulo colector cortical que termina en el conducto colector cortical. Las partes iniciales de estos conductos colectores se juntan para formar un solo conductor colector más grande, penetrando en la médula y se convierte en el conducto colector medular. Estos conductos confluyen para formar conductos cada vez mayores que, finalmente vacían su contenido en la pelvis renal en la punta de las papilas renales.

Las nefronas cuyos glomérulos están situados en la parte externa de la corteza se llaman nefronas corticales, y se distinguen por tener asas de Henle cortas que tienen sólo un breve recorrido dentro de la médula. Alrededor del 20 al 30% de las nefronas tienen sus glomérulos situados profundamente en la corteza renal, cerca de la médula, y se llaman nefronas yuxtamedulares que penetran profundamente en la médula. Los vasos que riegan las nefronas yuxtamedulares también se distinguen de los de las nefronas corticales. En estas últimas, todo el sistema tubular está rodeado de una extensa red de capilares peritubulares. Por otro lado, en las nefronas yuxtamedulares, las arteriolas aferentes se extienden desde los glomérulos hacia abajo penetrando en la parte externa de la médula y entonces se dividen en capilares peritubulares y especializados llamados vasos rectos, los cuales se extienden hacia abajo y dentro de la médula, adosados al asa de Henle. Al igual que las asas de Henle, los vasos rectos vuelven a la corteza para

terminar desembocando en las venas corticales. Esta red especializada de capilares de la médula desempeña un papel esencial en la formación de orina.¹¹

Daño renal agudo

Definición

Fallo renal agudo (FRA), antes conocido como Insuficiencia renal aguda (IRA), se define como un síndrome clínico caracterizado por la disminución rápida y generalmente reversible de la función renal, que conlleva a la elevación progresiva de los desechos nitrogenados y puede generar alteraciones hidroelectrolíticas, del equilibrio ácido básico o ambas.¹²

Epidemiología

Se estima que el 5% de todos los pacientes hospitalizados desarrollan FRA, con una mortalidad de 7% a 23% en pacientes sin comorbilidades la cual incrementa hasta en un 50 a 80% en pacientes que están en Unidades de Cuidados Intensivos.⁶ En El Salvador en el año 2008, 629 personas murieron por Insuficiencia Renal aguda o crónica, hubo un total de 4,549 egresos hospitalarios, convirtiéndose en la 5 causa de muerte en el país para todas las edades, representando el 7.10% del total de las muertes.⁷ En comparación con el año 2007, en donde el total de fallecidos por Insuficiencia renal, ascendía a 505 personas, con un total de egresos hospitalarios de 4,085, siendo la 6 causa de muerte en el país con un 5.73%.¹³ Lo que demuestra que cada día son más las personas que sufren dicha patología, incrementando la morbi-mortalidad en nuestro país.

La FRA es causada en un 50% por factores isquémicos, nefrotóxicos en un 35%, y se estima que un 15% puede ser causado por nefritis túbulointersticial aguda o nefritis

glomerular aguda. Sin embargo en el 50% de los pacientes hospitalizados que presentan FRA la razón es multifactorial, como por ejemplo: pacientes con sepsis manejados con aminoglucósidos, utilización de contraste en pacientes utilizando IECA, o en aquellos pacientes que presentan insuficiencia cardíaca congestiva que desarrollan sepsis; e incluso se estima que la FRA ocurre en un 15%-25% de los trasplantes renales, a pesar de optimizar el manejo con fluidos y garantizar una adecuada perfusión renal.⁵

Clasificación

La FRA puede clasificarse en tres grandes grupos según la causa que lo produce: **FRA PRERENAL:** se produce por disminución de la perfusión renal, manteniéndose el riñón indemne. El descenso del filtrado glomerular es secundario a una caída de la presión de perfusión o una vasoconstricción renal intensa que sobrepasan los mecanismos de autorregulación intrarrenales. La insuficiencia renal que se produce es reversible tras restaurar el flujo plasmático. Pero si persiste la situación que lo ha desencadenado evolucionará hacia la necrosis tubular aguda.

FRA RENAL: hay una lesión renal estructural, establecida, que se puede afectar predominantemente al túbulo, al intersticio, al glomérulo o a los vasos sanguíneos lo que da lugar a diferentes síndromes clínicos como necrosis tubular aguda (NTA), nefritis tubulointersticial (NTIA) o glomerulonefritis (GN).

FRA POSRENAL: se produce un aumento de la presión en la vía urinaria que se transmite retrógradamente comprometiendo el filtrado glomerular normal.¹⁴

La FRA puede también ser clasificada de acuerdo al volumen urinario dividiéndola en: no oligúrica (>400ml/día), oligúrica (100-400ml por día) y anúrica (menos de 100ml por día).¹⁵

En el año 2002, el grupo de Acute Quality Initiative (ADQI), propuso una clasificación sistemática del síndrome de falla renal aguda, basada en la experiencia de nefrólogos, e intensivistas internacionales llamada RIFLE por sus siglas en inglés: “Risk”, “Injury”, “Failure”, “Loss” y “End-stage.”¹⁶ RIFLE representa una clasificación que provee tres grados de severidad para FRA basado en cambios en la creatinina sérica y diuresis en condiciones basales (Figura 1). Y los dos posibles resultados que incluye la pérdida de la función renal y enfermedad renal terminal.^{17, 18}

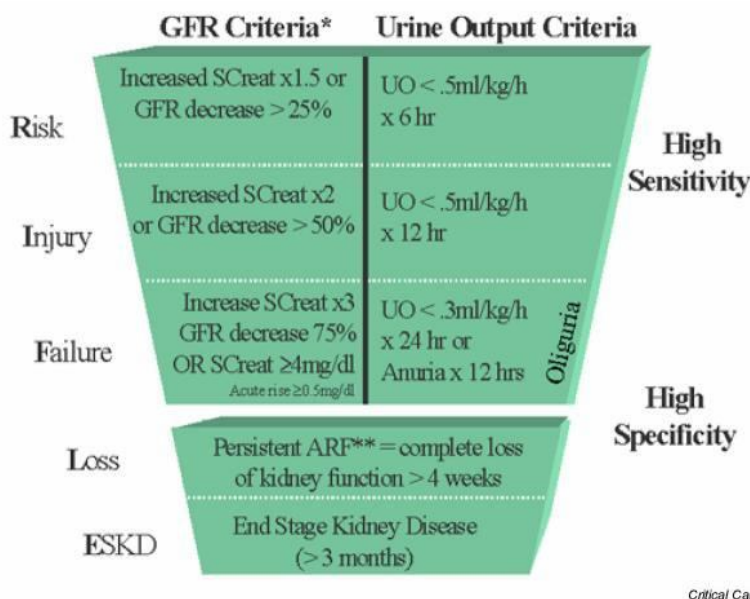


Figura N°1: Imagen tomada de Bellomo R, Ronco C, Kellum J, et al. Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Critical Care*. 2004;8(4):R204-R212.

Figura 1. RIFLE classification for acute renal failure

Fisiopatología

Los mecanismos involucrados en la etiología de FRA incluyen: daño endotelial y alteraciones vasculares; efecto directo de nefrotoxinas, inhabilitación de mecanismos renales autorreguladores y formación de mediadores inflamatorios¹⁹. (Figura 2). La necrosis y apoptosis de las células tubulares lleva a una obstrucción tubular, que contribuye a una reducción del filtrado glomerular. Además los elevados niveles de

calcio intracelular del daño tubular causan una serie de alteraciones celulares que culminan en un incremento del daño tubuloglomerular y la disminución del filtrado glomerular.

El compromiso vascular causa un incremento del calcio citósolico, que eleva los marcadores de injuria endotelial y producción de mediadores inflamatorios que incrementa la reducción del filtrado glomerular. Estos mecanismos fisiopatológicos son perpetuados por un imbalance persistente entre los mediadores de vasoconstricción y dilatación que resultan en una vasoconstricción intrarrenal, y eventualmente, en isquemia.¹⁹

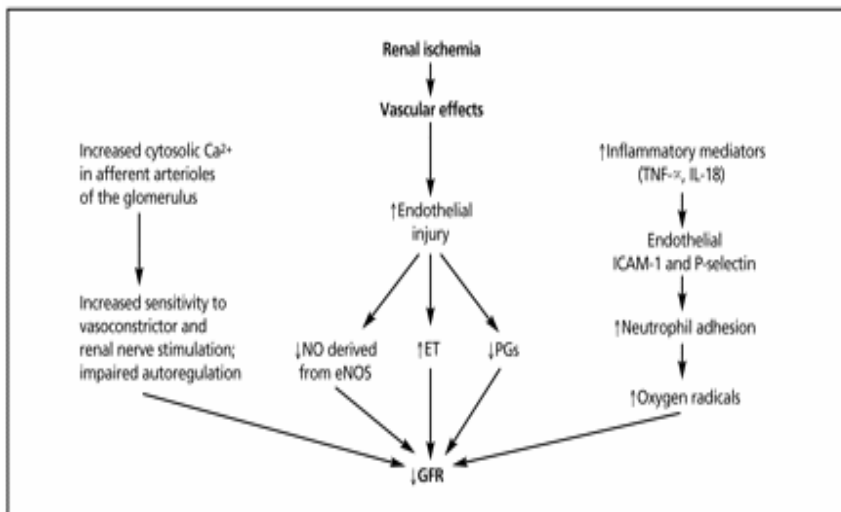


Figura N°2: Imagen tomada de: Mechanisms of acute kidney injury: a molecular viewpoint. Cascade of events involved in the pathophysiology of acute kidney injury. (Copyright 2004 by American Society for Clinical Investigation. Reproduced with permission of American Society for Clinical Investigation. J Clin

Causas

Dentro de las causas prerenales pueden encontrarse las relacionadas a hipovolemia como hemorragias, quemaduras, deshidratación, pérdida de líquido por el aparato digestivo, pérdida renal de líquidos y secuestro de líquido en el espacio extravascular, como se observa en pancreatitis, peritonitis, traumatismos, quemaduras, bajo gasto cardíaco presente en enfermedades del miocardio, válvulas y pericardio. Aumento de la

proporción entre la resistencia vascular renal y sistémica como se observa en el síndrome hepatorenal, sepsis, anafilaxis, hipocalcemia.¹²

Las causas de tipo renales incluyen obstrucción vasculorrenal, glomerulonefritis, síndrome hemolítico-urémico, coagulación intravascular diseminada, necrosis tubular aguda, agentes tóxicos, nefritis intersticial y rechazo al trasplante renal.¹²

Con respecto a los de carácter posrenal encontramos causas obstructivas como cálculos, coágulos sanguíneos, cáncer, hiperplasia prostática, estenosis, fimosis, etc.

Diagnóstico

Las diversas formas de presentación de FRA tienen criterios diagnósticos diferentes. La realización de una historia clínica completa permite establecer la etiología en la mayoría de los casos. Es necesario explorar síntomas clínicos de uremia que, de estar presentes, se deben a azoemia. El examen físico debe estar enfocado a evaluar el estado hemodinámico y buscar signos de enfermedades sistémicas o de obstrucción del tracto urinario.¹⁵

El criterio más usado para definir la FRA corresponde a un incremento en el nivel basal de la creatinina sérica, por lo menos, de 0.5mg/dl, el cual puede aumentar rápidamente entre 24 a 48 horas. El nitrógeno ureico, ácido úrico, urianálisis, cuadro hemático, potasio, sodio, suelen estar alterados y contribuyen a realizar un diagnóstico.^{15,20}

Síndrome de Isquemia/Reperusión

El síndrome de isquemia/reperusión se define como el proceso que sufre un órgano sometido temporalmente a la falta de flujo sanguíneo y que posteriormente es reperfundido con sangre oxigenada⁸.

Durante el síndrome de isquemia-reperfusión se identifican dos eventos o fases, la primera de ellas denominada isquémica y una subsiguiente fase de reperfusión, durante la fase isquémica se identifican principalmente alteraciones metabólicas a nivel celular y durante la fase de reperfusión: la lesión producida por los radicales libres y la respuesta inflamatoria.

Fase isquémica

En la isquemia prolongada ocurren cambios funcionales que incluyen: Disminución de la fosforilación oxidativa y de la actividad de las bombas de membrana dependientes de ATP. Derivándose en la entrada descontrolada de calcio, sodio, cloro y agua al interior de la célula, produciendo edema celular y activación de enzimas catalíticas que lleva a la producción de xantina oxidasa, como consecuencia del aumento del calcio intracelular.

- Catabolismo del ATP que lleva a la acumulación de hipoxantinas, la cual junto a la reentrada de O_2 y la xantina oxidasa lleva a la producción de especies reactivas del O_2 (EROS) y xantina reflejándose en un aumento en la producción de ácido úrico.

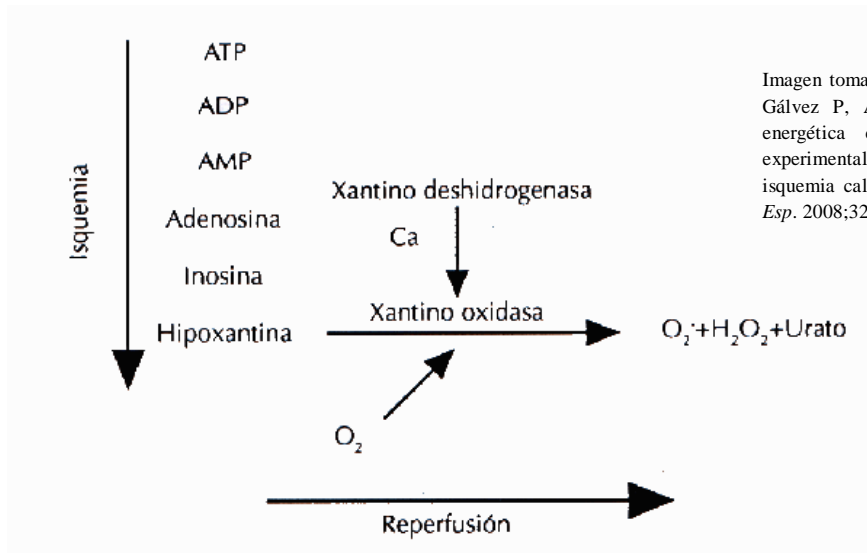


Imagen tomada de : Álvarez-Vijande R, Luque Gálvez P, Alcaraz A. Estudio de la carga energética celular en el trasplante renal experimental con diferentes periodos de isquemia caliente (0-30-45 y 90'). *Actas Urol Esp.* 2008;32:41-58.

Figura N°3: Mecanismo de producción del síndrome de isquemia-reperfusión. Los nucleótidos de la adenina se hidrolizan progresivamente durante el período de isquemia, con la consecuente acumulación de hipoxantina. Durante la reperfusión, la entrada masiva de oxígeno originará los RLO que provocarán la lesión en los tejidos.

- Expresión de productos proinflamatorios (Factor activador de plaquetas, citoquinas) y agentes bioactivos (endotelina, tromboxano A_2) a nivel endotelial.
- Reducción de mecanismos antioxidantes como la disminución de la enzima glutatión peroxidasa, prostacilinas y ON sintetasa entre otras²¹.

Todo esto contribuye a que en esta fase de isquemia se induzca un estado proinflamatorio y amplificador de la vulnerabilidad del tejido durante la reperfusión.

Fase reperfusión

En la fase de reperfusión hay una entrada masiva de oxígeno a los tejidos. Aquí se distinguen una serie de protagonistas en la lesión como lo son: mediadores inflamatorios como las citoquinas y los neutrófilos, moléculas de adhesión, mediadores

vasoactivos, especies reactivas de oxígeno, activación del complemento, alteración de la regulación de proteínas.¹

Mediadores inflamatorios

Las citoquinas son grupo de proteínas de bajo peso molecular producidas por varios tipos de células que median procesos de comunicación celular.

La asociación de las citoquinas proinflamatorias con síndromes como sepsis, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica y falla multiorgánica ha sido establecida. Hay evidencia que respalda que se encuentran relacionados con el síndrome de isquemia reperusión y su importancia en el estadio postoperatorio del trasplante de órganos donde interfieren en la no función primaria del injerto y los rechazos.

Las citoquinas inician y mantienen la respuesta inflamatoria resultante de la lesión de reperusión.

Los más importantes en la fisiopatología I/R son: IL-1 y TNF. Los cuales tienen actividad proinflamatoria e inducen la producción de IL-8 que regulan la síntesis de moléculas de adhesión que juegan papel importante en estadio postoperatorio. El TNF también juega un papel importante en la activación, quimiotaxis e inducción de radicales superóxido. Por el contrario hay una disminución de IL-10 (antiinflamatoria) la cual regula la producción de citoquinas, moléculas de adhesión, reclutamiento de neutrófilos, disminuye edema y daño celular

En este síndrome I/R hay liberación del factor activador de plaquetas (PAF) el cual se ha demostrado que incrementa significativamente 12 horas después de la reperusión de

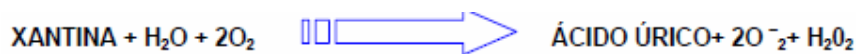
órganos trasplantados, y pico a las 24 horas. Además media procesos del daño endotelial, migración neutrófilos y producción de radicales libres de oxígenos (RLO).

Neutrófilos, moléculas de adhesión celular y mediadores vasoactivos

Durante esta reperfusión hay una activación, quimiotaxis, adhesión y transmigración de los leucocitos en el endotelio. Que causaran daño endotelial al interactuar con el mismo por la liberación de sustancias proinflamatorias. Y el desbalance entre prostaglandinas y oxido nítrico (ON) como vasodilatadoras vs. Tromboxano A₂ y endotelina como vasoconstrictores inducidos por las citoquinas conllevan a vasoconstricción influyendo en el insulto hístico por isquemia.

Estrés Oxidativo

En la fase de isquemia se habló de una entrada de calcio citoplasmático excesivo el cual formaba la producción de xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa junto al NADPH. En isquemia la xantina deshidrogenasa pasa a xantina oxidasa utiliza el oxígeno molecular en lugar del NAD⁺ (a diferencia de tejidos no hipóxicos) produciendo anión superóxido y peróxido de hidrogeno⁸:



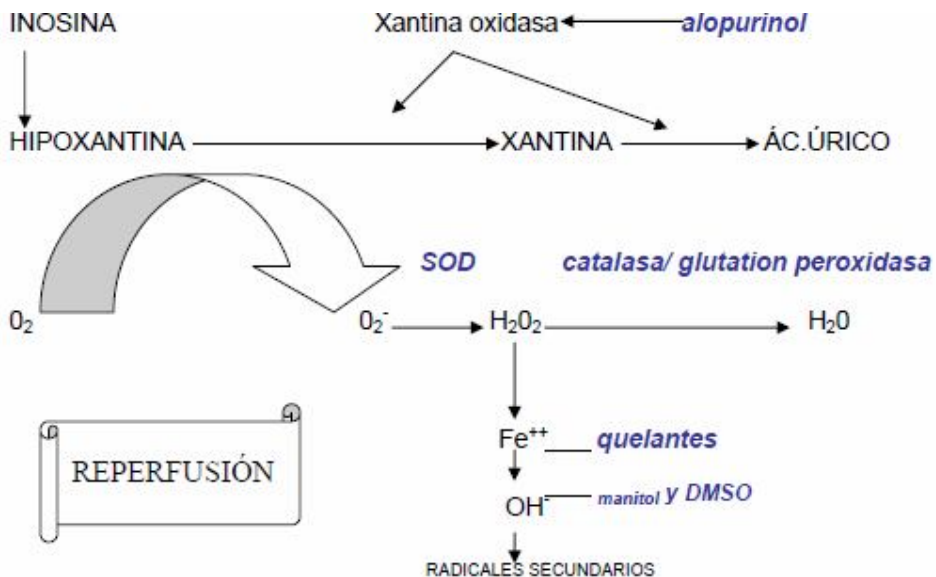
El estrés oxidativo es un estado en la que la cantidad de especies de oxígeno reactivo exceden la capacidad del sistema antioxidante endógeno. Este sistema antioxidante está compuesto:

- Formación de peroxinitrato a partir del O_2 al interactuar con el óxido nítrico (ON).
- Formación de H_2O por la catalasa y glutatión peroxidasa, a partir del peróxido de hidrógeno producido por la superóxido dismutasa a partir del O_2 .

Entre los radicales libres están:

- Algunas especies reactivas del Oxígeno (ERO): alto potencial oxidante son el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo.
- Los lipoperóxidos (R-COO): son ácidos grasos en las que el grupo hidroxilo se encuentra activado permitiéndole propiedades de radical libre.

Durante la reperfusión hay conversión de la hipoxantina a ácido úrico por medio de la xantina oxidasa y por ende una producción de radicales libres de oxígeno.



Todos los fenómenos involucrados llevan como consecuencias deficiencia de DNA, de oxidación crónica de proteínas, fenómenos de apoptosis-necrosis acelerados y falla en injertos²².

El complemento

El complemento es uno de los sistemas de defensa del huésped y responsable de la inmunidad humoral.

Como producto final es la convergencia del componente C3 y activación del complejo de ataque de membrana C5b-C9. Siendo el agente proinflamatorio más potente el factor C5a el cual hace producción de TNF e Il-1. La lesión por reperfusión origina la activación de complejos inmunes y forma anticuerpos que activan el complemento.

Muerte Celular

La apoptosis se encuentra dentro de la homeostasis ya que son muertes autoprogramadas de células que han cumplido su ciclo de vida útil y es controlada a través de genes. En el síndrome de isquemia –reperfusión hay un proceso dependiente de energía y hay alteración de la homeostasis del calcio y favorece el estrés oxidativo que lleva a daño en el DNA. La apoptosis depende de la disponibilidad de ATP y la reperfusión puede potenciarla al restablecer los depósitos de energía y activar RLO.²³

Los fenómenos de necrosis empiezan cuando hay pérdida de energía con la depleción del ATP por la hipoxia celular. El síndrome de reperfusión se caracteriza por la simultaneidad de necrosis y apoptosis¹.

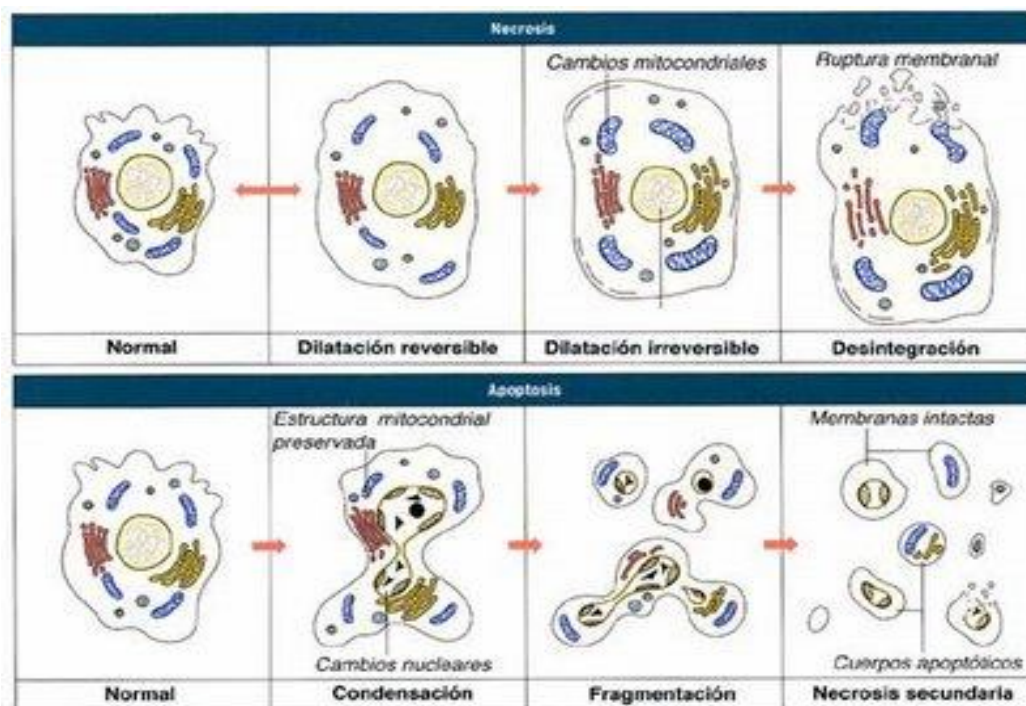
Uno de los primeros intentos por clasificar los fenotipos de muerte celular, basado en el análisis morfológico de modelos del desarrollo, fue hecho por Schweichel y Merker, quienes identificaron 3 tipos de muerte celular²³:

Tipo 1 (apoptosis) se manifiesta por condensación nuclear y picnosis, con reducción del volumen citoplasmático, con fragmentación celular tardía y fagocitosis.

Tipo 2, (autofagis) o degeneración autofágica, se caracteriza por la vacuolización autofágica del citoplasma.

Tipo 3 o muerte citoplasmática, (necrosis) se caracteriza por una desintegración general con pérdida de los organelos.

Figura N°4: Esquema comparativo con necrosis



En el síndrome de isquemia-reperfusión se distinguen 2 periodos:

- El periodo de isquemia: la falta de oxígeno a nivel mitocondrial ocasiona acidosis intracelular y una alteración de la membrana plasmática que conduce al edema celular y la muerte por citólisis.
- El periodo de reperfusión: se originan los radicales libres de oxígeno, que conducen a un aumento de la permeabilidad capilar, produciendo una disfunción del endotelio vascular, y disminución en la liberación de NO, que junto con factores quimiotácticos promueven un reclutamiento de polimorfonucleares al lugar reperfundido. La respuesta inflamatoria aguda iniciada se caracteriza por una cascada de citocinas proinflamatorias, expresión de moléculas de adhesión e infiltración celular.

La isquemia renal severa resulta en un daño renal irreversible con cambios notables y característicos de necrosis en las células tubulares. La muerte celular puede resultar directamente de las condiciones hipóxicas durante la isquemia sin embargo muchas células mueren durante la reperfusión. En la actualidad hay estudios recientes muestran, que además del proceso inflamatorio, la muerte celular por apoptosis se incrementa durante el síndrome de isquemia-reperfusión. En análisis microscópicos muestran que en periodos de isquemia renal completa de aproximadamente 5 min muestra cuerpos apoptóticos en reperfusión con pocos cambios de necrosis celular. Estos cuerpos apoptóticos se incrementan más en periodos de isquemia de 30 o 45 min. Hay estudios que establecen que hay muchas células que mueren durante la reperfusión no porque sean sensibles a la anoxia sino que hay una inadecuada reperfusión de ese tejido (fenómeno del “no-reflujo”). Se establece que el edema celular durante la isquemia

transitoria comprime la vasculatura llevando a una hipoxia crónica aun en reperfusion^{23,24}.

La muerte celular programada es un proceso celular fundamental que es esencial para el desarrollo y para el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos adultos. Su misión es eliminar las células superfluas, dañadas, infectadas o transformadas. Esta forma de muerte celular o apoptosis se realiza mediante la activación de un programa intrínseco y se caracteriza por el mantenimiento de las membranas celulares intactas permitiendo así su eliminación por fagocitosis.²⁴

En la muerte por apoptosis, la serie de acontecimientos sucede de manera tan ordenada, que este proceso de suicidio celular se denomina muerte celular programada. Pueden diferenciarse varias fases en la apoptosis²⁴:

Fase efectora

Aumento en el contenido de Ca⁺⁺ intracelular que origina la activación de ciertos grupos enzimáticos (endonucleasas y proteasas -caspasas), junto con cambios en el citoesqueleto celular que producen cambios en el tamaño y forma celular²⁴.

Fase degradativa

Degradación de proteínas y los ácidos nucleicos y cambios en la membrana celular. Los cuerpos apoptóticos son fagocitados por macrófagos impidiendo la salida del contenido celular al exterior y evitando inflamación. En esta fase las endonucleasas se encargan de fragmentar el DNA, las caspasas degradan las proteínas, se producen cambios marcados en el citoesqueleto, y se condensa la cromatina²⁴.

Fase de eliminación

Los macrófagos fagocitan los cuerpos apoptóticos.

Inducción de la apoptosis

Para que una célula sea inducida a morir por apoptosis se necesita que dicha célula deje de recibir señales de supervivencia y comience a recibir señales de muerte. Las señales estimuladoras de la supervivencia son necesarias para que las células se mantengan vivas (factores del crecimiento y las hormonas)²⁴.

Las señales de muerte que conducen a la apoptosis son muy diversas:

- Altos niveles de oxidantes en el interior de la célula
- Lesión del DNA por oxidantes, luz ultravioleta, radiaciones ionizantes, fármacos quimioterapéutico y activadores de muerte como TNFalfa entre otros

La apoptosis está conducida por dos clases de proteasas especializadas, las caspasas iniciadoras y las caspasas efectoras. Las caspasas son cisteína proteasas que se expresan como zimógenos inactivos y que se procesan a estado activo por proteólisis.

Las caspasas iniciadoras se activan después de un estímulo apoptótico por autoproteólisis. Las caspasas efectoras o ejecutoras se activan por las caspasas iniciadoras en una cascada amplificadora.²⁴

La activación de las caspasas es una etapa crucial para la activación de la apoptosis cualquiera que sea el estímulo. Son las verdaderas ejecutoras de la apoptosis. Existe el grupo *iniciador* de la apoptosis que incluye las caspasas -2, -8, -9, -10, y el grupo *efector o ejecutor* de la apoptosis que incluye caspasas 3, 6 y 7.²⁵

Son dos las vías que conducen a la activación de las caspasas.

La vía intrínseca:

Esta se encuentra mediada por estrés celular o por lesión en el DNA en donde están involucrados los receptores de la pared mitocondrial los cuales regulan la transcripción de proteínas Bcl que pueden ser anti o pro apoptóticas. Requiere la disrupción de la membrana mitocondrial y la liberación de proteínas mitocondriales tales como el citocromo y smac/diablo²⁵.

El citocromo C funciona uniéndose a Apaf-1 (factor activador de la proteasa apoptótica) para inducir la activación de la caspasa-9 y con ello la cascada de las caspasas, mientras que smac/diablo se une y antagoniza al inhibidor de las proteínas apoptóticas (IAP).

Se ha demostrado que la proteína proapoptótica Bax puede inducir la apertura del poro al formar un complejo que se localiza en la membrana interna mitocondrial. La apertura del poro trae consigo un descenso en el potencial de membrana y la salida de factores apoptóticos como citocromo C²⁵.

En una célula sana la membrana externa de la mitocondria expresa la proteína Bcl-2 en su superficie. Bcl-2 se une a una molécula de proteína denominada Apaf-1 (factor activador de las proteasas apoptogénicas). De esta manera Apaf-1 se mantiene en forma inactiva. Cualquier alteración del equilibrio interno de la célula, por ejemplo elevación

de las especies reactivas de oxígeno, causa que la mitocondria libere citocromo C. A su vez Bcl-2 deja libre a Apaf-1 que se une al citocromo C²⁵.

La liberación regulada de factores pro-apoptóticos de la mitocondria causa la inducción de las caspasas iniciadoras y efectoras.

La vía extrínseca:

Esta mediada por ligandos que se unen a receptores en la superficie celular. Se inicia por unión de un ligando con su receptor transmembrana (FAS, TNFR, TRAIL, etc) para activar a las caspasas iniciadoras (caspasas-9 y -10), que a su vez, activan por proteólisis a las caspasas efectoras, tales como las caspasas-3 y -7²⁵.

Los receptores de muerte más conocidos son eL Fas y el TNFR1 (receptor TNF). Son proteínas transmembrana con sus receptores expuestos en la superficie de la célula.

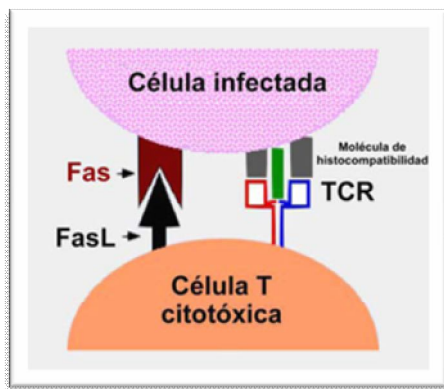


Imagen tomada de: Cascales angosot, M.
Bases moleculares de la apoptosis. *Anal. Real Acad. Nal. Farm.* 2003;69:39-43.

Figura N°5: Vía utilizada por las células T citotóxicas para inducir la apoptosis en células infectadas.

La unión de un activador complementario o ligando, FasL y TNF (factor de necrosis tumoral), respectivamente, transmite una señal al citoplasma que conduce a la activación de la caspasa-8. La caspasa-8 al igual que la caspasa-9 inicia una cascada

amplificadora de activación que conduce a la formación de cuerpos apoptóticos y a la fagocitosis de la célula²⁵.

Necrosis

A diferencia de la apoptosis, la necrosis no requiere síntesis de nuevas proteínas. En otros estudios se deduce que el origen de todos los desordenes necróticos es un desequilibrio osmótico. La permeabilidad de la membrana plasmática se altera y se establece un flujo anormal de iones principalmente de calcio al interior de la célula, el cual va acompañado por una entrada pasiva de agua. El volumen celular aumenta y se alteran las demás rutas metabólicas. El calcio intracelular en mayores concentraciones inhibe la producción de ATP. La cromatina nuclear pierde su conformación nuclear y constituye pequeños agregados. Algunos organelos como el retículo endoplasmático o mitocondria se dilatan por entrada de agua, se desorganizan los ribosomas y los lisosomas se rompen, como etapa final los orgánulos estallan, la membrana plasmática y la envoltura nuclear se fragmentan, y el contenido intracelular se vierte al exterior.²⁶

Antioxidantes

DMSO

El Dimetilsulfóxido (DMSO) (C_2H_6OS), es un compuesto orgánico constituido por una molécula anfipática con un dominio altamente polar y dos grupos apolares haciéndolo así al DMSO un compuesto soluble en medios orgánicos y acuosos²⁷.

El DMSO ha sido utilizado por la industria de la madera como solvente desde 1953. De igual forma posee un efecto antioxidante que brinda propiedades protectoras actuando en diferentes procesos de isquemia-reperusión.

Dentro de las propiedades farmacocinéticas, el DMSO posee una vida media en el ser humano de 12 a 15 horas. Es metabolizado en los humanos por la oxidación a Dimetilsulfona, (DMSO_2) o por la reducción a dimetilsulfuro (DMS), los cuales son excretados en la orina y heces. La excreción en humanos cuando el DMSO se administra por vía oral se completa en 120 horas, con la excreción urinaria como método primario de eliminación. El metabolito DMSO_2 puede persistir en los humanos hasta por 2 semanas. No se ha demostrado acumulación residual del DMSO en humanos o animales por períodos prolongados sin importar la ruta o dosis administrada.²⁸

En 1961, Dr. Jacobs utilizó el DMSO por primera vez como agente farmacéutico, para la preservación de órganos, al descubrir su capacidad de rápida penetración en la piel, llegando a las capas más profundas sin causar daño alguno. Y a pesar que ha sido uno de los compuestos más estudiados, sus acciones terapéuticas siguen sin ser comprendidas en un 100%.²⁹

Una de las primeras características, observadas del DMSO fue su facilidad de penetrar a través de las membranas. El cual variaba proporcionalmente de acuerdo a la concentración utilizada, fue así como se identificó que concentraciones de 70 a 90% eran efectivas a través de la piel, y a concentraciones arriba de 90% disminuía la efectividad del producto.³⁰

De igual forma el DMSO, posee capacidades de transportar otros medicamentos a través de las membranas, incluyendo morfina, penicilinas, esteroides y cortisona. Esta

capacidad de transportar otros fármacos dependerá del peso molecular, forma y otras características electroquímicas. Esta propiedad confiere al DMSO la capacidad de reducir el riesgo de infecciones, que ocurren cuando se penetra la piel.²⁹

El DMSO ha sido utilizado como analgésico tópico en concentraciones al 70%, gracias a estudios que sugieren que su acción analgésica se debe al bloqueo de fibras tipo C de nervios periféricos, ya que al ser rápidamente absorbido por la piel, alivia el dolor muscular, e incluso con concentraciones de 5 a 7% reduce la velocidad de conducción a través de las fibras nerviosas, constituyendo un excelente analgésico.³¹

Las capacidades antiinflamatorias del DMSO, se deben a distintos mecanismos, entre ellos, su capacidad antioxidante, al recolectar radicales libres que se sitúan en el lugar de la lesión y su actividad estabilizadora de membrana que evita la secreción de mediadores inflamatorios de células lesionadas.³² El DMSO ha sido estudiado en desórdenes inflamatorios del aparato genitourinario, donde se demostró una notable mejoría de los síntomas, sobre todo en condiciones inflamatorias no asociadas a tumores o infecciones muy severas.³³

Debido a sus propiedades analgésicas y antiinflamatorias, ha sido carácter de estudio en patologías como la artritis. Un estudio clínico realizado por la Japanese Rheumatism Association concluyó que el DMSO alivia el dolor en las articulaciones, incrementa el rango de movimiento de estas y las fortalece.³⁴ Sin embargo la FDA nunca ha aprobado su uso en esta patología, denegando en muchas ocasiones la realización de ensayos clínicos.²⁹

Una de las aplicaciones más ventajosas, fue la utilización en 1971, por el Dr. De la Torre en la Universidad de Chicago del DMSO en modelos animales con lesiones del

sistema nervioso central. Él descubrió que el DMSO disminuía la presión intracraneal rápidamente y mas efectivamente en comparación a otros fármacos. De igual forma estabilizaba la presión arterial, mejorando la respiración, incrementaba la diuresis, y la circulación a través de la medula espinal. A partir de esto, el DMSO ha sido utilizado en pacientes que sufren de traumas craneoencefálico severos, y en aquellos en los cuales dosis iniciales de manitol, esteroides y barbitúricos fallan en disminuir la presión intracraneal.^{35,36}

En múltiples estudios se ha demostrado el efecto protector del DMSO frente a la injuria renal causada durante procesos de isquemia-reperfusión.^{2,37} En un estudio realizado en ratas, donde se administro cloruro de mercurio, el DMSO aparte de tener acción quelante sobre el mercurio, demostró reducir el incremento de creatinina sérica y daño tubular, disminuyendo la actividad del cloruro de mercurio sobre la glutatión peróxidasa y la superóxido dismutasa.³⁷

El DMSO ha mostrado poseer un efecto sobre la plaquetas, ya que ellas juegan un papel importante en la liberación de sustancias vasoactivas, las cuales pueden generar obstrucción del lumen y vasoconstricción del vaso sanguíneo. El DSMO antagoniza gran variedad de estas sustancias liberadas, actuando a través del aumento del cAMP e inhibición de la liberación de calcio a partir de células isquémicas y de las plaquetas.³⁸

Estudios han demostrado que el DMSO puede aumentar la síntesis de Prostaglandina E-1 (PGE-1), un vasodilatador moderado. La PGE-1 puede reducir la agregación plaquetaria al producir un aumento de los niveles del cAMP y al inhibir la liberación de calcio inducida por la noradrenalina en las terminales nerviosas, un efecto que antagoniza la vasoconstricción.³⁹ El DMSO puede bloquear los receptores de PFG-2 y reducir la síntesis de PFE-2, ambos compuestos relacionados en la agregación

plaquetaria³⁸. El efecto del DMSO sobre los tromboxanos es desconocida, pero se cree puede inhibir la biosíntesis del Tromboxano A-2, lo que aumenta los niveles de cAMP.³⁸

La habilidad del DMSO para proteger la integridad de la membrana celular se encuentra bien documentada a través de varios modelos de daño por isquemia-reperfusión, por lo que el efecto protector del DMSO puede deberse a los mecanismos de reducción de la adhesión plaquetaria por el colágeno y reducción de la adhesión plaquetaria al proteger el endotelio vascular y asegurar la liberación de PGI-2.²⁹

Durante los procesos de isquemia, se ha notado la presencia de radicales hidroxilos formados dentro de la mitocondrias. Y debido a la capacidad recolectora de radicales hidroxilos que posee el DMSO, a través de la fosforilación oxidativa mitocondrial. Se sugiere el DMSO puede neutralizar los efectos citóxicos de los radicales libres sobre la misma mitocondria. La fosforilación oxidativa es una de las primeras actividades bioquímicas que afecta negativamente durante el proceso de isquemia. El DMSO ha mostrado reducir la actividad ATPasa en partículas submitocondriales, un efecto que reduce la utilización de oxígeno durante la isquemia celular. Por lo que es probable que la actividad neutralizadora del DMSO sobre el daño de los radicales libres seguido a una injuria pudiera disminuir los resultados negativos del proceso I/R.^{40,41,42,43,44}

En un estudio realizado en El Salvador, en un modelo animal, donde se utilizó el DMSO vs el manejo convencional de líquidos endovenosos, se demostró las ventajas del DMSO al disminuir la muerte celular por apoptosis de las células renales, disminución del daño tubular renal desde un punto de vista histopatológico y la disminución del deterioro de la función renal durante el período de perfusión.^{24,45}

Acido Ascórbico

Las vitaminas antioxidantes son agentes reductores que son capaces de donar electrones a especies oxidadas como son los radicales libres y los lipoperoxidos y neutralizan el poder oxidativo de estos.⁴⁶

El **ácido ascórbico** es un ácido de azúcar con propiedades antioxidantes. El enantiómero L- del ácido ascórbico se conoce popularmente como vitamina C.

El ácido ascórbico o vitamina C es un antioxidante monosacárido encontrado en animales y plantas. Se considera una vitamina ya que no puede ser sintetizado por los seres humanos y debe ser obtenido de la dieta.⁴⁷ El ácido ascórbico es un agente reductor y puede reducir y neutralizar especies reactivas del oxígeno tal como el peróxido de hidrógeno⁴⁸.

En 1937, el premio Nobel de química fue concedido a Walter Haworth por su trabajo en la determinación de la estructura del ácido ascórbico, y el premio Nobel de medicina se otorgó a Albert von Szent-Györgyi Nagyrápolt por sus estudios acerca de las funciones biológicas del ácido ascórbico.

A la vitamina C se le han atribuido varias funciones a través de estudios a lo largo del tiempo, entre los cuales están:

- Funciona como coenzima o como cofactor
- Necesario para funcionamiento normal de las células y unidades subcelulares.
- Dona y acepta hidrogeno durante el metabolismo

- Parte importante de las síntesis de neurotransmisores (serotonina, en la conversión de dopamina a noradrenalina)
- Importante para la producción de colágeno, una proteína importante en el tejido fibroso⁴⁹, ya que es necesaria junto con el O₂ y el Fe⁺² para formar hidroxiprolina e hidroxilisina (componentes del colágeno).
- Mantiene la integridad capilar
- Favorece la absorción de hierro y calcio
- La vitamina C tópica tiene los siguientes efectos a nivel de la piel: estimulación de la síntesis de colágeno, prevención de inmunosupresión por radiación UV, prevención del fotodaño y del fotoenvejecimiento, actuando como coadyuvante de los filtros solares. Ejerce su acción principalmente como captador de especies reactivas de oxígenos producidas por las luces ultravioleta y contaminantes ambientales.⁵⁰

En estudios de isquemia reperfusión en ratas utilizando la vitamina C previo a evento isquémico mostraron actividad de la PAF reducido considerablemente en comparación al grupo control⁴⁶. Así mismo la evaluación histológica de los riñones de estas ratas mostro que a los que se les administro acido ascórbico presentaron menos daño histológico a nivel tubulointersticial. En conclusión presentaron menos necrosis tubular, edema y hemorragia en comparación con el grupo de ratas que no recibió agente antioxidante.

Hay estudios donde determinan el poder antioxidante del Ácido ascórbico en modelos de isquemia-reperfusión como protectores renales⁵¹ y que influyen en un descenso del nitrógeno ureico en sangre³. En otros estudios donde se quiso ver su efecto en trasplantes renales no fueron concluyentes que beneficiaran a la protección renal en

dicho procedimiento⁵². En cambio hay otros que establecen que la administración de Ácido ascórbico podría atenuar la lesión renal durante el evento un trasplante renal⁵³.

En reportes de eficacia clínica se han determinado casos en los que a los pacientes se les prescribieron Ácido ascórbico y Vitamina E por 3 meses en donde hubo disminución de la creatinina en un 20% lo cual podría mejorar la función durante un trasplante renal⁵⁴.

Objetivos

Objetivo General

Determinar la actividad protectora sobre el tejido renal de la asociación DMSO – AC. ASCORBICO y DMSO como sustancia única en un modelo animal de isquemia reperfusion.

Objetivos específicos

- Medir el efecto protector de la asociación DMSO – AC. ASCORBICO y DMSO como sustancia única en un modelo animal de isquemia reperfusion mediante la evaluación de variables histológicas.

- Medir el efecto protector de la asociación DMSO – AC. ASCORBICO y DMSO como sustancia única en un modelo animal de isquemia reperfusion mediante la evaluación de los niveles de creatinina.

Metodología

Tipo y diseño general de estudio

Diseño experimental de un modelo animal de isquemia reperfusión renal en el que se midió el efecto protector de DMSO como sustancia única Vs la asociación de DMSO-Acido Ascórbico.

Unidades experimentales

Cuarenta conejos machos, raza Nueva Zelanda, con peso entre 2.5 Kg \pm 1Kg, fueron estudiados. El bienestar animal se aseguró mediante el seguimiento de los lineamientos del Consejo Canadiense para el cuidado animal del año 2007^{55,56}. Cada animal permaneció en jaulas aisladas, donde se les administró agua ad libitum y alimentación especial para su raza. Una vez finalizado el experimento, se procedió a la realización de la eutanasia siguiendo las normas de la American Veterinary Medical Association.⁵⁷

Grupos

40 conejos divididos en forma aleatoria en los siguientes 4 grupos:

- Grupo A (Grupo sham o de intervención simulada): conformado por 10 unidades experimentales a las que se anestesiaron y realizaron sus nefrectomías unilaterales sin inducir isquemia/reperfusión y a los cuales se administraron líquidos EV con el fin de eliminar confundidores y establecer diferencias entre el grupo isquemia reperfusión/SSN y grupo sham.

- Grupo B: Grupo isquemia-reperfusión/SSN, conformado por 10 unidades experimentales a las cuales se les realizó nefrectomía unilateral, con inducción por clamp atraumático de riñón por 30 minutos y posterior perfusión por 8 horas, y administración de SSN durante la fase de perfusión.
- Grupo C: Grupo isquemia-reperfusión/DMSO-Ácido ascórbico conformado por 10 unidades experimentales a las cuales se les realizó nefrectomía unilateral, con inducción por clamp atraumático de riñón por 30 minutos y posterior perfusión por 8 horas, administrando como fármaco de perfusión la asociación DMSO-ACIDO ASCORBICO.
- Grupo B: Grupo isquemia-reperfusión/DMSO conformado por 10 unidades experimentales a las cuales se les realizó nefrectomía unilateral, con inducción por clamp atraumático de riñón por 30 minutos y posterior perfusión por 8 horas, administrando como fármaco de perfusión el DMSO.

Aleatorización de la muestra

La selección de las unidades experimentales se realizó asignando un número a cada conejo, el cual fue marcado sobre la piel de la oreja del mismo. Los números fueron colocados en una tómbola, de donde un miembro del equipo experimental extrajo uno a uno, los cuales fueron colocados en cada grupo complementando el total de animales asignado para cada uno.

Criterios de Inclusión y Exclusión

Criterios de Inclusión

- Conejos machos de raza Nueva Zelanda

- Conejos con peso entre 2.5 Kg ± 1Kg
- Conejos en buen estado de salud.

Criterios de exclusión

- Conejos con anomalías estructurales evidentes.
- Conejos que fallezcan posterior a la inducción anestésica, previa finalización del procedimiento quirúrgico.
- Conejos con anomalías renales macroscópicas.

Definiciones operacionales

Nombre	Tipo	Definición	Unidades
Niveles séricos de creatinina	Variable cuantitativa	Prueba química sanguínea, utilizada como marcador de función renal (valor normal en conejo: 0.5-2.5mg/dl)	Mg/dl
Histología renal	V. cualitativa	<p>Evaluación de la estructura histopatológica del tejido renal.</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Hiperemia medular ➤ Presencia de leucocitos ➤ Dilatación tubular ➤ Presencia de cilindros hialinos ➤ Adelgazamiento del epitelio tubular ➤ Presencia de células intratubulares ➤ Tubulorrexis ➤ Cariólisis ➤ Cariorrexis ➤ Separación de la membrana basal. ➤ Edema celular ➤ Vacuolización 	<p>Ausente: 0% (0 puntos)</p> <p>Leve: 1-10% (1 puntos)</p> <p>Moderado: 11-24% (2 puntos)</p> <p>Severo: 25-49%</p>

		<ul style="list-style-type: none"> ➤ Degeneración hidrópica ➤ Núcleos Hiper Cromáticos 	(3 puntos) Muy severo: 50% (4 puntos)
RIFLE	V. Cualitativa	“Risk” (Riesgo) “Injury” (Injuria) “Failure” (Falla)	Incremento de creatinina basal: “Risk” 1.5 “Injury” 2.0 “Failure” 3.0

Preparación prequirúrgica

Cada animal fue evaluado por un médico veterinario para corroborar su estado general, posterior a esto fue pesado y se preparó para el procedimiento, rasurando el área quirúrgica. Seguido de la asepsia del campo quirúrgico, mediante la aplicación de Digluconato de Clorhexidina al 20%, y seguido de la aplicación subcutánea de Procaína al 2% como anestésico local. Se colocaron campos quirúrgicos estériles sobre el área de trabajo.

Anestesia

Se premedicaron, mediante la inyección IM de Maleato de Acepromacina (20mg/ml) 0.2mg/kg y Ketamina (10mg/ml) 30mg/kg, respectivamente, como dosis inicial. Luego se administraron una dosis de mantenimiento que consistía en Maleato de Acepromacina 0.1mg/kg y Ketamina a 15 mg/kg por vía IV cada 15 a 30 minutos según fuera la necesidad y en base a los parámetros de evaluación del plano anestésico, específicos para los conejos que consistían en: tono mandibular, reflejo de retirada en la extremidad anterior y posterior frente a estímulos dolorosos.⁵⁸

Acceso venoso

Para la administración de líquidos endovenosos se procedió a ubicar el área submandibular derecha, la cual fue disecada en planos hasta ubicar la vena yugular común para canalizarla con Venocat flexible #18G y se administró Solución Salina Fisiológica 0.9%, a un volumen de 0.8cc/kg/h y anestésicos. Finalmente dicho acceso venoso fue utilizado para la administración de cloruro de potasio IV a dosis de 2 mmol/kg y así realizar la eutanasia de la unidad experimental.⁵⁹



Figura N°6: (A) Disección por planos, hasta vena yugular común. (B) canalización de vena. (C) Administración de SSN 0.9%

Monitorización de las constantes vitales

Las constantes vitales de las unidades experimentales consistieron en la utilización de monitores que evalúen la frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria y la temperatura corporal tomada a nivel rectal⁶⁰.

Procedimiento quirúrgico

Las unidades experimentales se colocaron en decúbito prono donde se practicó una incisión paravertebral bilateral 2cm bajo los rebordes costales, disecando por planos hasta ubicar ambos riñones y su respectivo hilio. Se realizó nefrectomía unilateral derecha. Luego se disecó la arteria renal izquierda y se interrumpió el flujo sanguíneo

mediante clampaje atraumático durante un periodo de 30 minutos³⁷. Durante este tiempo se mantuvo al riñón dentro de la cavidad abdominal. Finalizado el tiempo de isquemia, se administró intraperitonealmente al Grupo B, un bolus de SSN al 0.9% ; al Grupo C DMSO al 40% a una dosis de 3.8ml/kg y Ácido Ascórbico a razón de 150mg/Kg. Y al Grupo D, DMSO al 40% a una dosis de 3.8ml/kg. Luego se restituyó el flujo sanguíneo verificando la permeabilidad arterial evaluando el retorno de la coloración renal pre isquémica.

Cerrando mediante sutura la cavidad y reperfundiendo la unidad por un período de 8 horas⁶¹, seguido de nefrectomía y eutanasia de la unidad experimental.

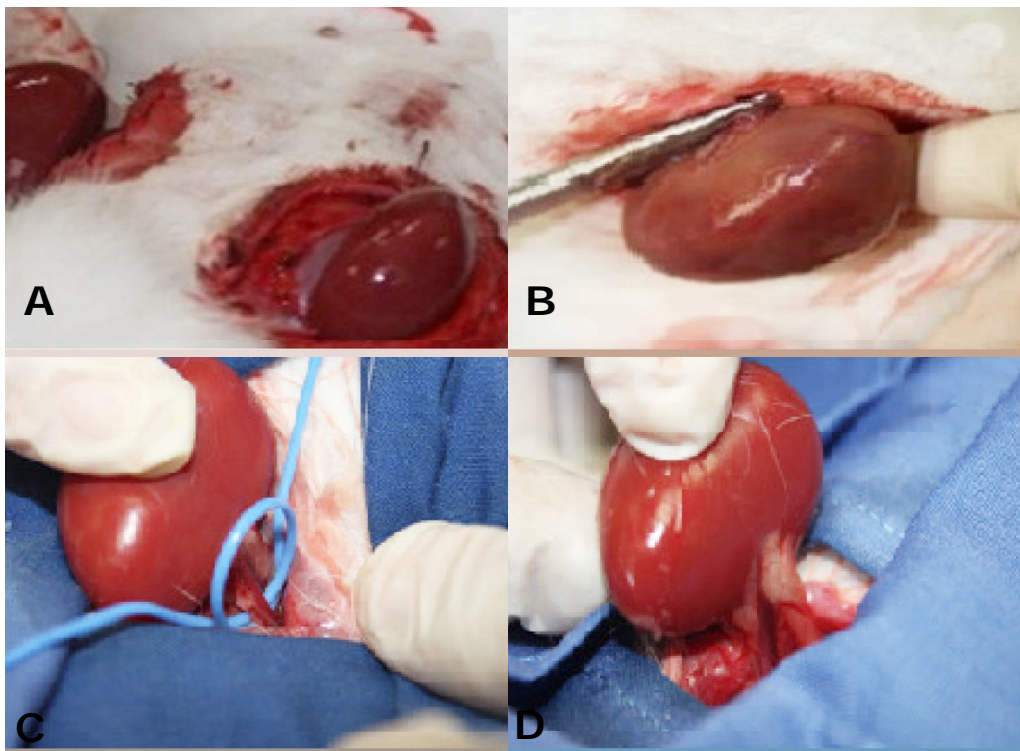


Figura N°7: (A) Identificación de ambos riñones. (B) Nefrectomía de riñón derecho. (C) Clampaje de riñón izquierdo provocando proceso de isquemia. (D) Restitución de flujo sanguíneo.

Toma de muestras

Muestras sanguíneas

Se extrajo las muestras de sangre de la vena marginal de la oreja, con el fin de no causar alteraciones hemodinámicas en las unidades experimentales. El volumen total de extracción de muestras sanguíneas fue de 1cc. La cual fue extraída en dos tomas:

- 1 toma: Previo al inicio del procedimiento quirúrgico, en su estado basal.
- 2 toma: Ocho horas posteriores a la realización de la reperfusión, previo eutanasia.

Cada muestra fue procesada en un equipo automatizado, utilizando tiras reactivas para el análisis de creatinina.

Muestras anatomopatológicas

Una vez realizada la nefrectomía izquierda, la muestra fue pesada y seccionada mediante corte coronal en la línea media con posterior colocación de papel filtro y fijación en formalina buferizada para garantizar la preservación de la muestra hasta su fijación y posterior análisis histopatológico con tinción histoquímica de hematoxilina eosina.

Estos estudios fueron realizados por un patólogo, quien desconoció el grupo al cual cada espécimen pertenece.

Eutanasia

Una vez finalizado el procedimiento se realizó eutanasia de la unidad experimental siguiendo las normas de la American Veterinary Medical Association, con la administración de Cloruro de Potasio por vía IV a dosis de 2 mmol/kg.

Procedimiento para la recolección de la información

Los valores obtenidos fueron tabulados Microsoft Excel 2007, analizados en el programa estadístico Graph Pad Prism v 5.0 para Windows. Cada una de estas variables fue explorada para determinar su distribución mediante el test de D`Agostino-Pearson y así definir su valor estadístico como paramétrica o no paramétrica.

- Variables paramétricas: Fueron analizadas mediante prueba One Way ANOVA para explorar su significancia, al encontrarse un valor p de menos de 0.05 se procedió al análisis mediante Test de Dunnett para determinar la significancia de los grupos respecto al control.
- Variables no paramétricas: Fueron analizadas mediante la prueba de Kruskal Wallis, seguido de Test de Dunn para establecer la significancia entre cuatro grupos.

Procedimientos para garantizar los aspectos éticos

El bienestar de las unidades experimentales se realizó bajo los lineamientos generales del Consejo Canadiense para el Cuidado Animal dictaminado en el año 2007. Cada animal permaneció en jaulas separadas, administrándosele agua ad libitum y alimentación especial. Las unidades fueron sometidas a procesos anestésicos previo cualquier manipulación quirúrgica. Una vez finalizado el procedimiento se realizó eutanasia siguiendo las normas de la American Veterinary Medical Association,⁵⁷ administrándoles Cloruro de Potasio I.V a dosis de 2mmol/Kg.

Resultados

A continuación se presentan los datos obtenidos del análisis de las pruebas de laboratorio y muestras histopatológicas de las 40 unidades experimentales.

Creatinina sérica

La variable creatinina sérica basal se analizó mediante pruebas estadísticas paramétricas One Way ANOVA y post Test de Dunnett encontrando una homogeneidad de los grupos con respecto al grupo control, la creatinina post reperfusión muestra una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos Sham y DMSO/AA. Las medias, valores mínimos y máximos son presentados en la tabla 1.

Esto es reflejado en los valores máximos, mínimos y medias de cada grupo representados en la tabla N° 1.

Tabla N°1 Comportamiento de la Creatinina Media (basal y final)

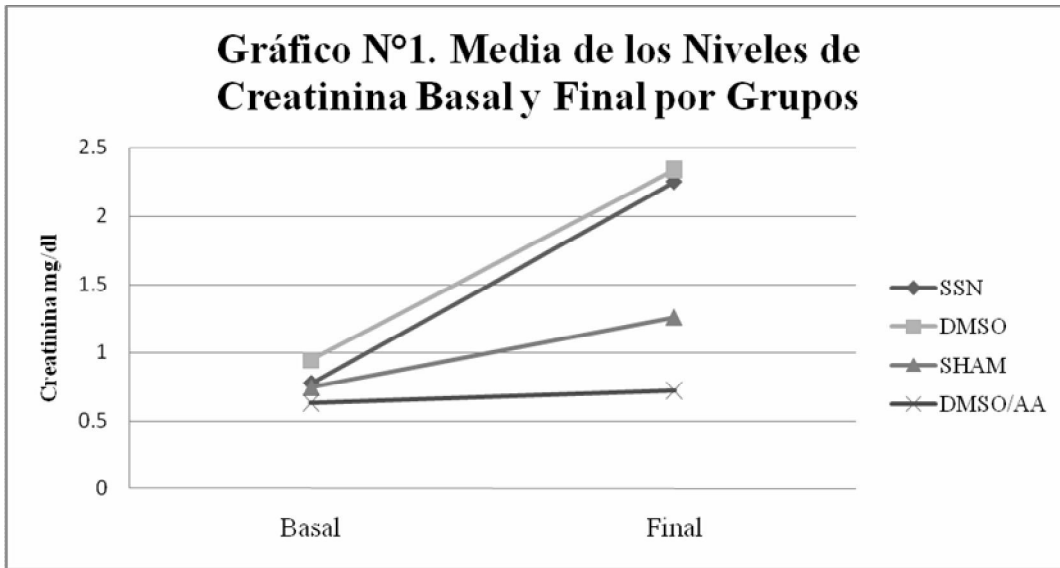
		Grupo I/R SSN	Grupo I/R DMSO	Grupo I/R SHAM	Grupo I/R DMSO/AA	One Way Anova P
BASAL	<i>Creatinina</i>	0.77mg/dl	0.94mg/dl	0.74mg/dl	0.63mg/dl	0.0036
	<i>(min-max)</i>	(0.5-1.1)	(0.74-1.1)	(0.5-1.1)	(0.5-0.85)	
FINAL	<i>Creatinina</i>	2.25mg/dl	2.34mg/dl	1.26mg/dl	0.72mg/dl	<0.0001
	<i>(min-max)</i>	(1.1-3.89)	(1.8-3.2)	(0.48-1.87)	(0.5-0.8)	

Grupo I/R-SSN: Isquemia- Reperusión- Solución Salina Normal

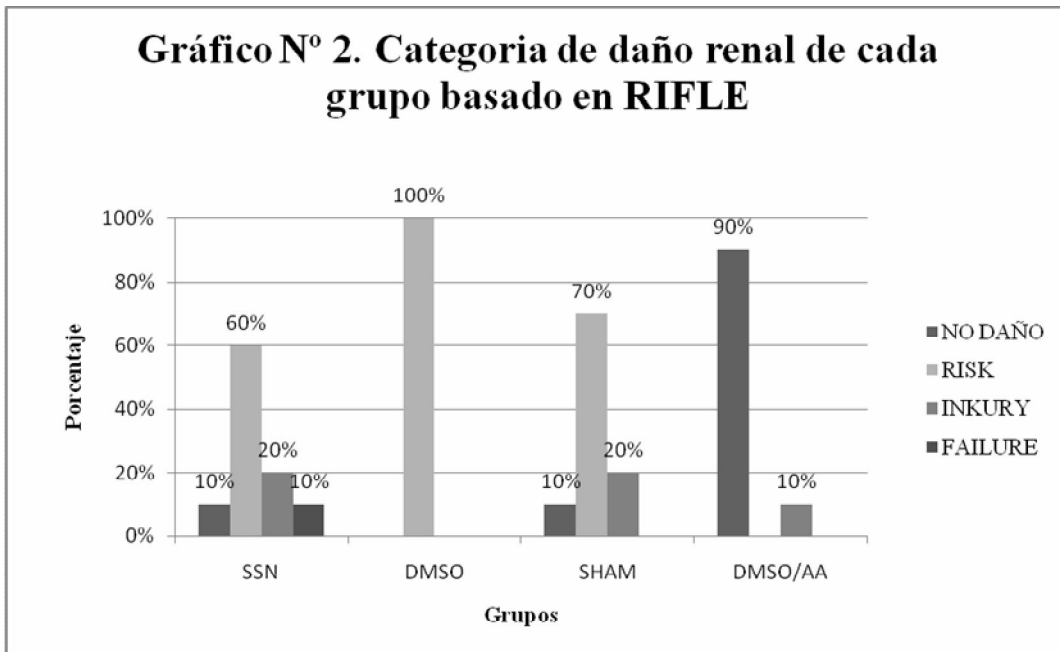
Grupo I/R- DMSO: Isquemia-Reperusión-Dimetilsulfóxido

Grupo I/R-DMSO-AA: Isquemia-Reperusión- Dimetilfóxido- Ácido Ascórbico

Los valores de creatinina post reperfusión mostraron un incremento en todos los grupos al compararlos con los valores de creatinina basal, siendo el aumento más notable en el grupo I/R –SSN de 2.9 (292%), seguido por los grupos I/R- DMSO de 2.4 (248%), I/R Sham de 1.7 (170%) y finalmente el grupo I/R DMSO+AA de 1.14 (114%). Mostrando significancia estadística con valores menores a $p = <0.0001$ para todos ellos.



El grado de daño renal se catalogó en tres niveles: *Risk*, *Injury* o *Failure* según la clasificación de RIFLE, basado en el incremento de creatinina final en comparación a la creatinina basal.



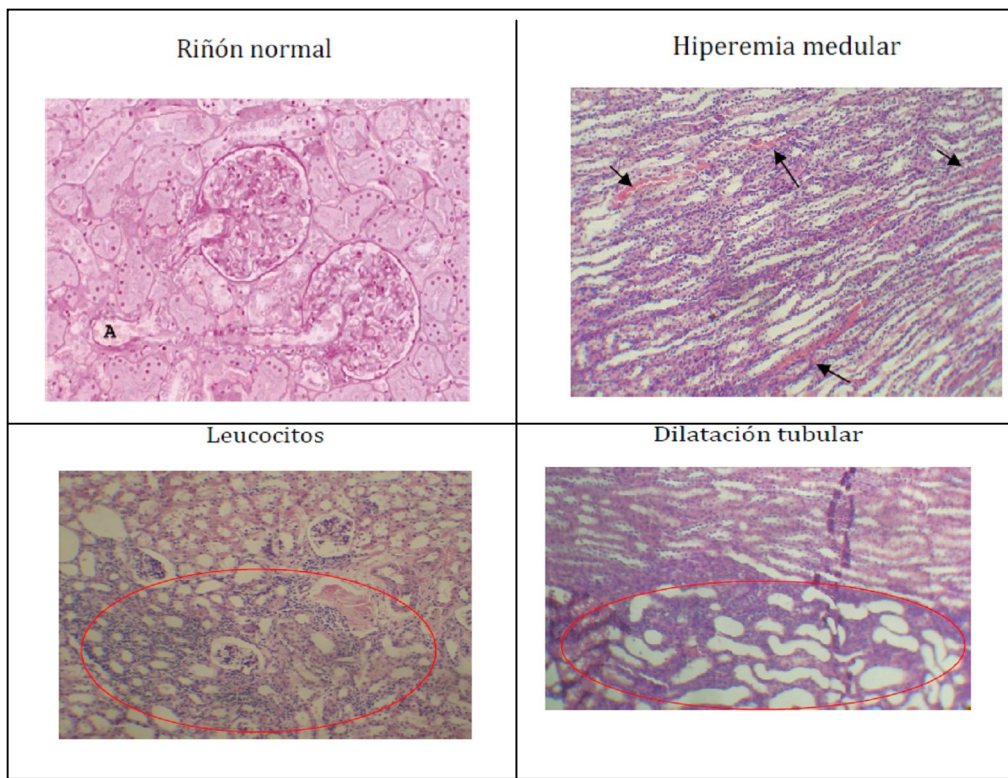
El grupo I/R- SSN mostró las tres categorías de daño de risk, injury y failure con un 60%, 20% y 10% respectivamente. En el caso del grupo I/R DMSO el 100% entro a la categoría de *Risk*, en el grupo Sham predominó en un 70% la categoría *Risk* a

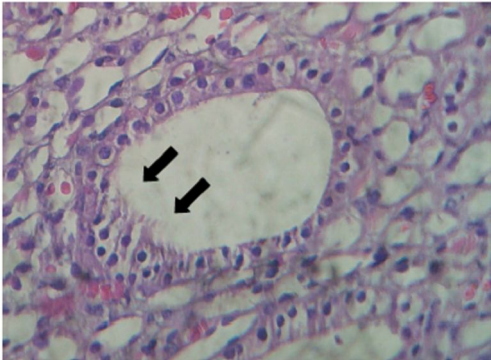
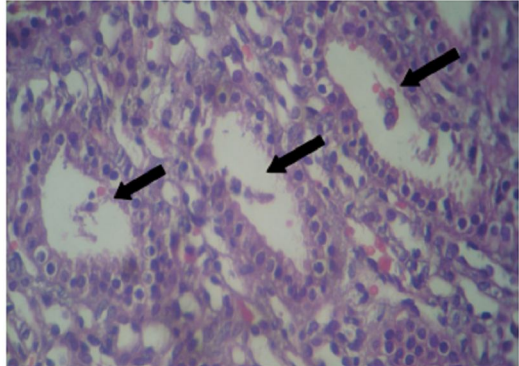
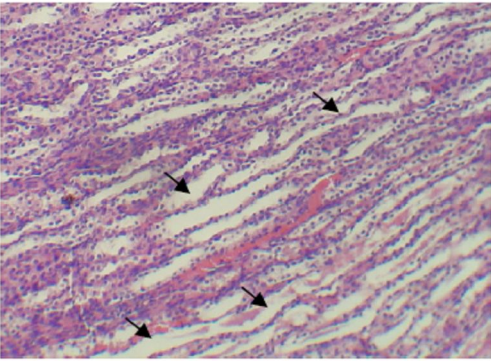
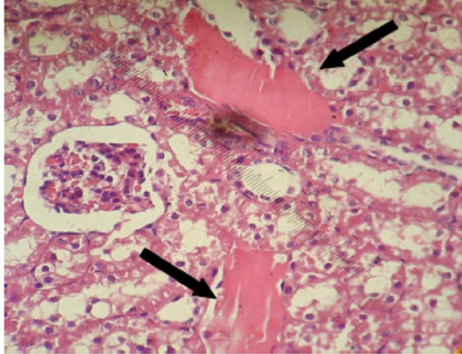
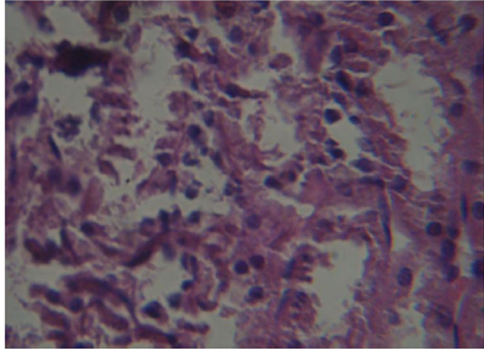
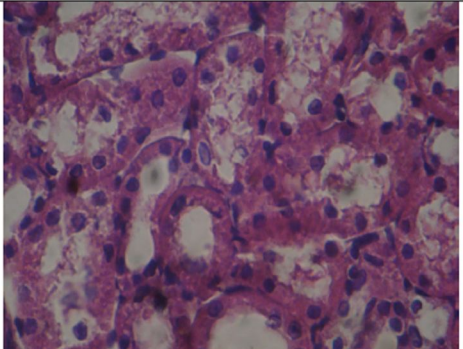
diferencia del último grupo que unía al DMSO- ácido ascórbico donde solo un 10% presentó *Injury* y un 90% no presentó incremento de Creatinina significativo para ser ubicado dentro de las categorías de un mayor daño. (Gráfico N°2)

Histopatológicos

El análisis histopatológico de los riñones de las unidades experimentales se realizó con el fin de determinar el grado de severidad de las lesiones así como los cambios necróticos en cada grupo según los parámetros establecidos en la metodología. (Ver cuadro N°2)

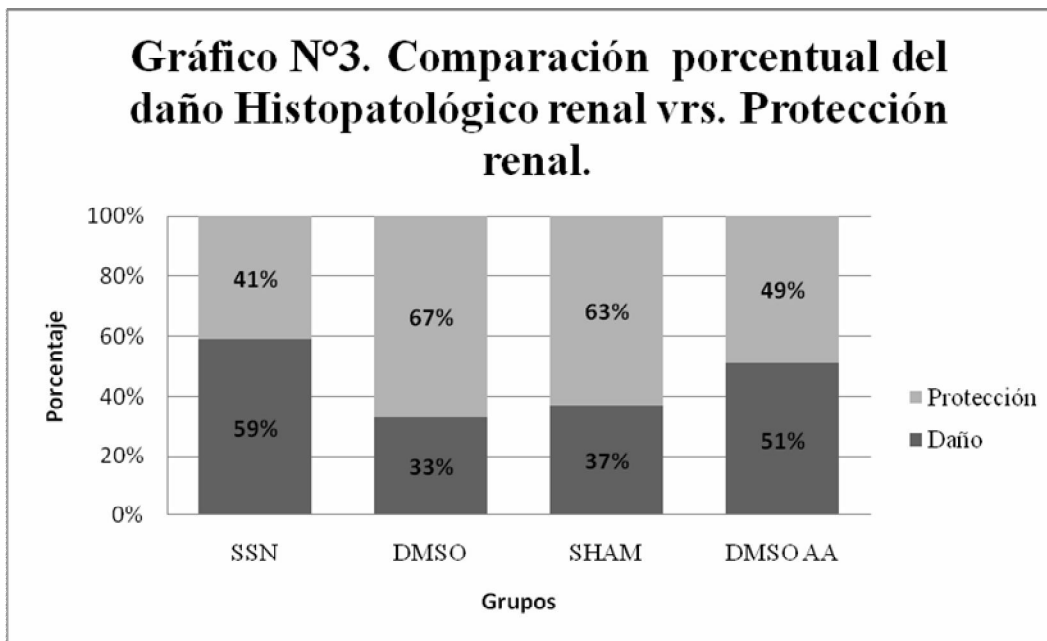
Cuadro N°2. Hallazgos histopatológicos encontrados en riñones sometido a isquemia



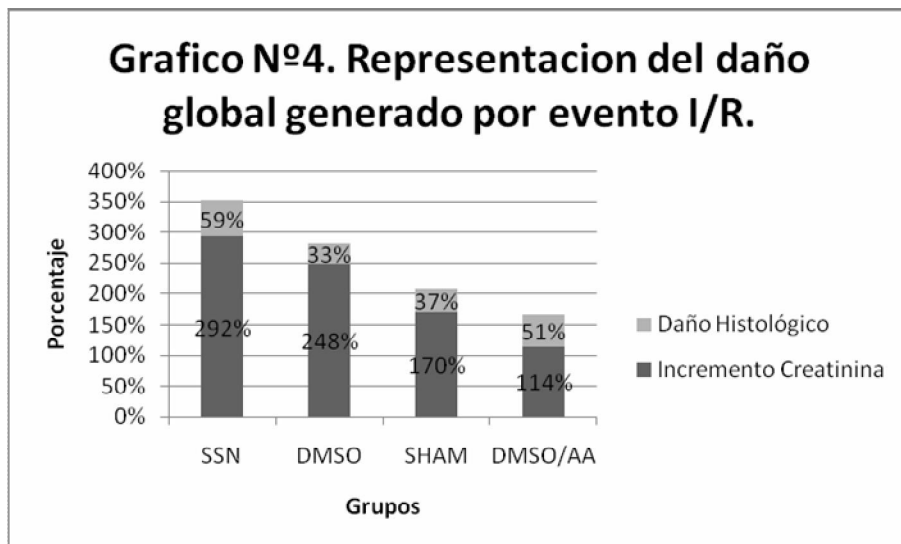
<p>Ruptura de membrana celular</p> 	<p>Células Intratubulares</p> 
<p>Adelgazamiento de Epitelio Tubular</p> 	<p>Cilindros Hialinos</p> 
<p>Tubulorrexis</p> 	<p>Vacuolización citoplasmática</p> 

Se evaluaron 14 variables histológicas, categorizadas como ausente, leve, moderado, severo, y muy severo respecto al daño hístico. Se cuantificó por grupo experimental el número de asignaciones a cada categoría, en cada una de las variables estudiadas, determinando el porcentaje de ocurrencia. (Gráfico N°5-Grafico N°18).

Se comparó el daño histológico total por cada uno de los grupos, en el cual el grupo I/R-SSN tuvo mayor daño histológico en un 59% seguido del grupo I/R DMSO-AA con un 51%, y finalmente por los grupos Sham y grupo I/R-DMSO con un 37% y 33% respectivamente.



El puntaje de daño histológico se obtuvo de la sumatoria total de los puntajes asignados a cada variable, obteniendo así un valor total que representa el porcentaje global de daño, correspondiendo el porcentaje restante, a muestras histopatológicas que presentaron protección. (Gráfico N°3)



El daño global generado por el evento de Isquemia-repercusión en las unidades experimentales tratadas con SSN expresan mayor daño histológico y mayor disfuncionalidad renal. El grupo que se trato con DMSO-AA presenta mejores niveles de creatinina en comparación con todos los demás grupos y con respecto a su histológica solo presenta menor daño en comparación con el grupo de SSN. (Grafico N°4)

Patología Descriptiva

Entre los grupos, se observaron diferencias histopatológicas entre el grado de severidad de cada variable, las más relevantes se exponen a continuación:

Grupo I/R-SSN

En este grupo se observó vacuolización severa y degeneración hidrópica. Acompañada de separación de la membrana basal y un edema intracelular notable. De igual manera se observó abundante presencia de leucocitos en comparación a los otros grupos, acompañado de una leve cariorrexis y moderada cariólisis. Hay presencia de moderada tubulorrexis junto a hiperemia medular moderada.

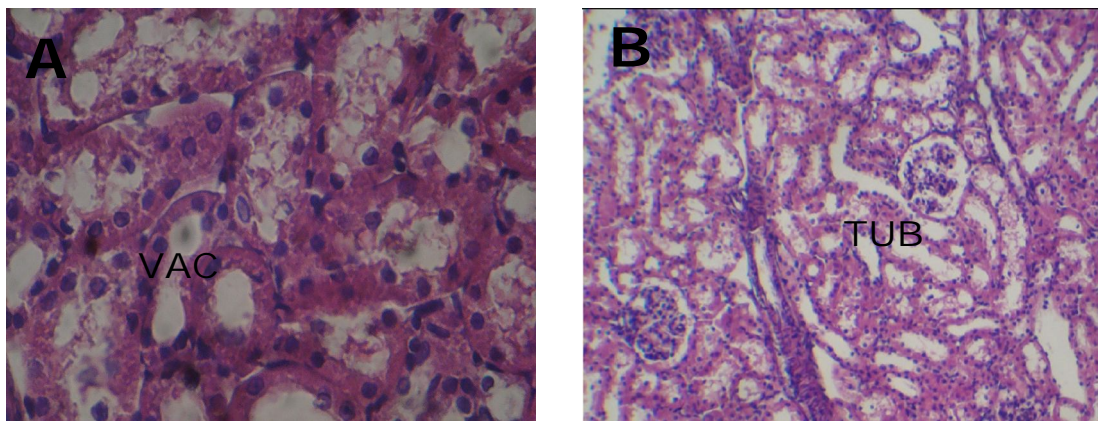


Figura N°8: (A) presencia de vacuolas e hiperemia medular. (B) Dilatación tubular.

Grupo I/R-DMSO

En estas muestras histopatológicas se encontró edema intracelular moderado junto a dilatación tubular significativa con cilindros intratubulares marcados. Hay presencia de tubulorrexis y núcleos hipercromáticos, acompañado de una hiperemia medular moderado.

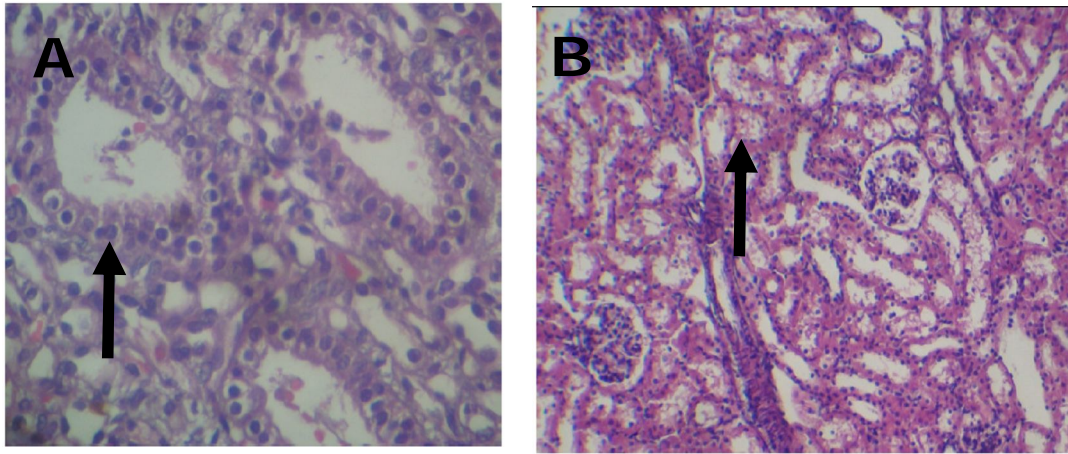


Figura N°9: (A) Núcleos hiper Cromáticos con cilindros intratubulares. (B) Dilatación tubular e hiperemia severa.

Grupo Sham

En este grupo se observa importante dilatación tubular y células intratubulares moderadas, De igual manera se encontró degeneración hidrópica de leve a moderada con un adelgazamiento del epitelio en su mayoría leve. Así mismo hay presencia de 80% de leucocitos con mínimo daño al núcleo.

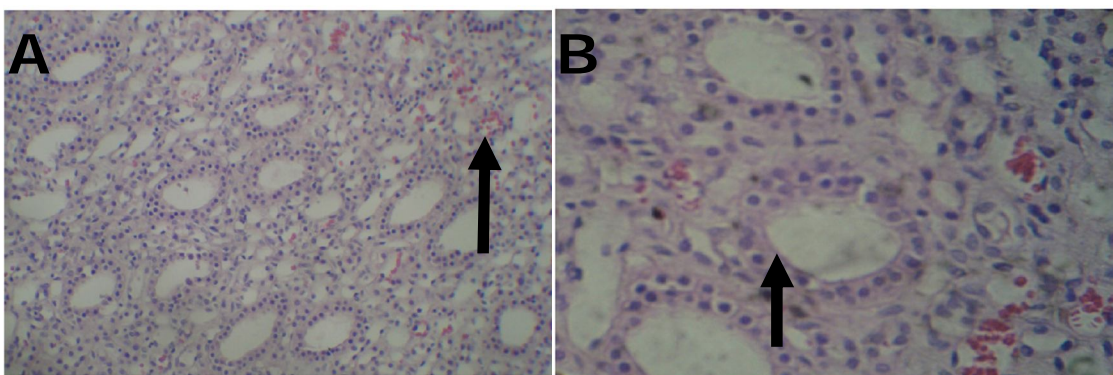


Figura N°10: (A) Presencia de leucocitos. (B) Degeneración hidrópica

Grupo I/R DMSO-AA

Estas muestras histopatológicas, presentaron moderado edema celular y degeneración hidrópica con separación de la membrana basal y adelgazamiento del epitelio. Encontrándose escasos cilindros intratubulares y leucocitos. Hay presencia de moderada cariólisis e hiperemia medular leve.

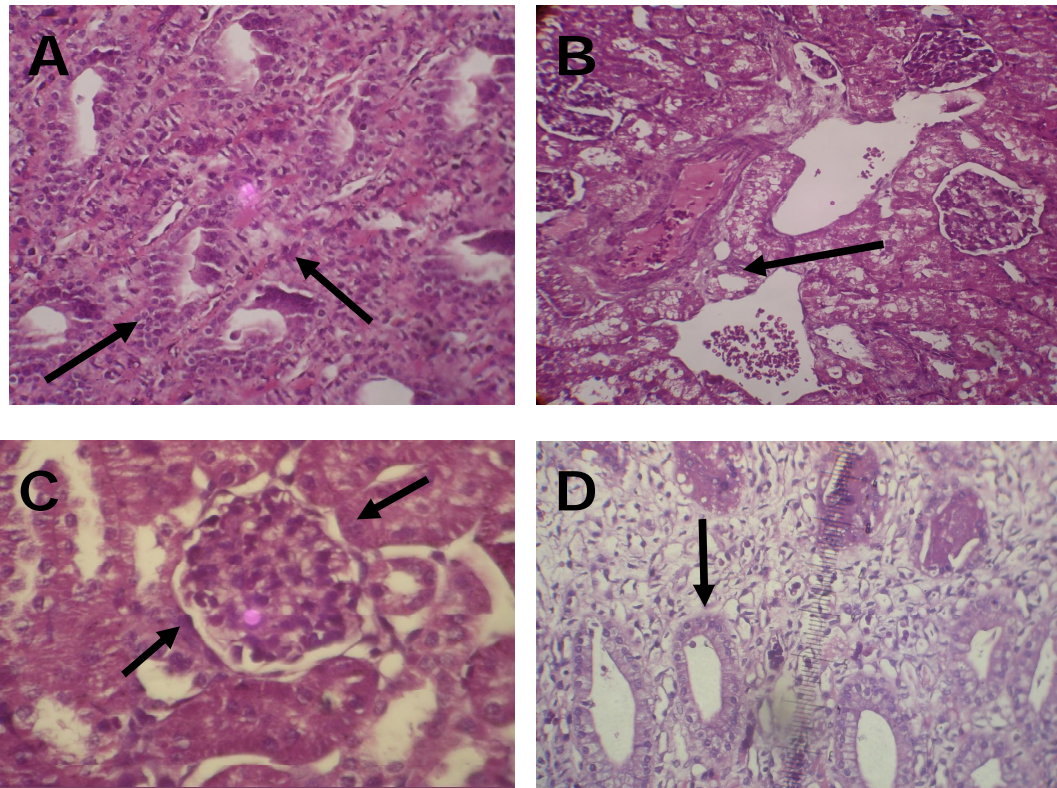


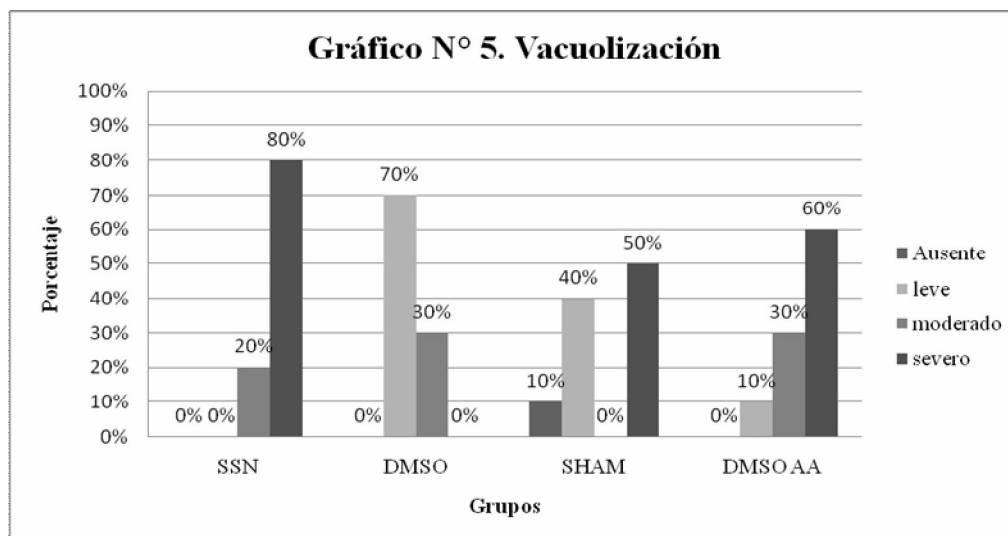
Figura N°11: (A) Hiperemia medular y degeneración turbia. (B) Glomerulo, degeneración turbia, dilatación tubular y vacuolización con presencia de leucocitos. (C) Presencia de cilindros intratubulares. (D) Glomérulo con engrosamiento capilar.

Cada variable histopatológica, fue analizada por estadística no paramétrica mediante el test de Kruskal-Wallis, una vez determinada la diferencia entre los grupos, ($p < 0.05$) se analizó la diferencia estadística entre pares mediante la prueba estadística de Dunn.

Resultados estadísticos de las 14 variables histopatológicas basadas en Kruskal-Wallis y Test de Dunn

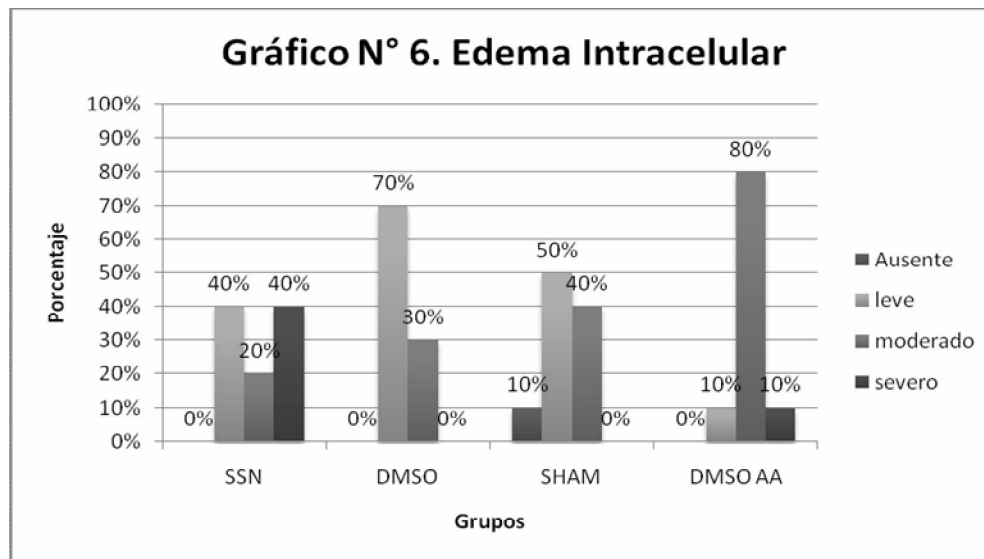
Vacuolización

Esta variable presentó un valor p de 0.0015 por Kruskal-Wallis, encontrándose valores significativos entre tres grupos, los cuales correspondieron a I/R SSN vs I/R DMSO, y I/R DMSO vs I/R DMSO-AA. De esta manera se observó que un 80% de los sujetos a los que se les administró SSN habían presentado vacuolización severa comparado con aquellos sujetos en donde se utilizó DMSO quienes presentaban un grado leve de vacuolización correspondiente a un 70%. Al comparar el grupo I/R DMSO vs I/R DMSO-AA, se observó que en aquellos sujetos donde se utilizó ácido ascórbico y DMSO el 60% había presentado daño severo, mientras que aquellos en los que solo se utilizó DMSO no presentaron daño severo. (Gráfico N°5)



Edema Intracelular

Esta variable presentó un valor p equivalente a 0.0317 por Kruskal-Wallis, al utilizar el test de Dunn, se observó que ninguno de los grupos presentó resultados significativos entre sí. (Gráfico N°6)

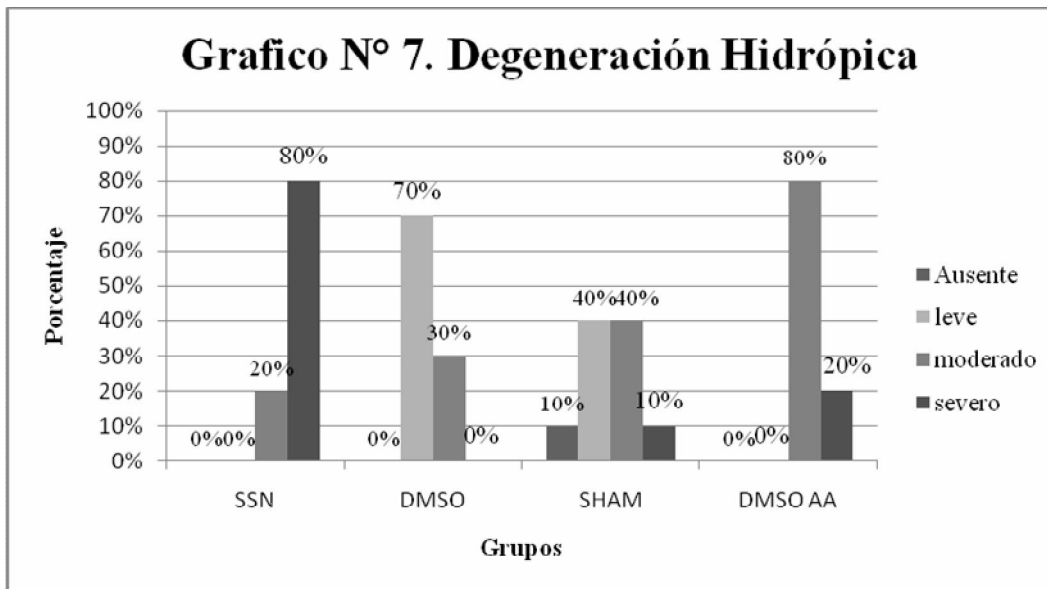


Degeneración Hidrópica

Esta variable presentó un valor p <0.0001 por Kruskal-Wallis, encontrándose valores significativos entre tres grupos, los cuales correspondieron a I/R SSN vs I/R DMSO, y I/R SSN vs I/R SHAM. De esta manera se observó que un 80% de los sujetos a los que se les administró SSN habían presentado degeneración hidrópica severa comparado con aquellos sujetos en donde se utilizó DMSO quienes presentaban un grado leve de degeneración hidrópica correspondiente a un 70% y ninguna de las muestras presentaba daño severo. Al comparar el grupo I/R SSN vs I/R SHAM, se observó que en aquellos

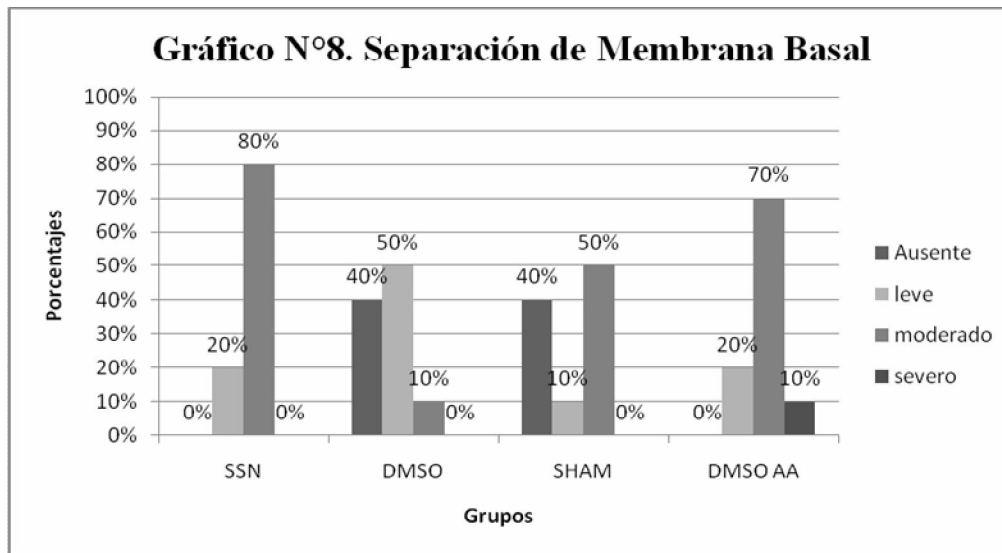
sujetos perteneciente al grupo SHAM solo un 10% había presentado daño severo.

(Gráfico N°7)



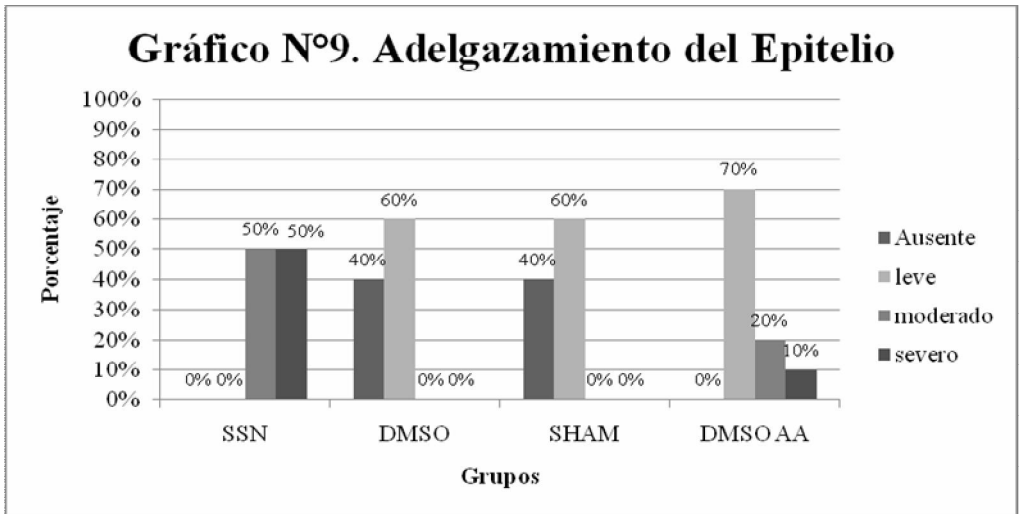
Separación de Membrana basal

Con respecto a esta variable, presentó un valor $p < 0.0027$ por Kruskal-Wallis, encontrándose valores significativos entre tres grupos, los cuales correspondieron a I/R SSN vs I/R DMSO, y I/R DMSO vs I/R DMSO-AA. De esta manera se observó que un 80% de los sujetos a los que se les administró SSN habían presentado degeneración hidrópica moderada comparada con aquellos sujetos en donde se utilizó DMSO quienes presentaban sólo un 10% de degeneración hidrópica moderada. Al comparar el grupo I/R DMSO vs I/R DMSO-AA, se observó que en aquellos sujetos perteneciente al grupo DMSO solo un 10% había presentado daño moderado en comparación al 70% que había presentado daño moderado en el grupo DMSO-AA. (Gráfico N°8)



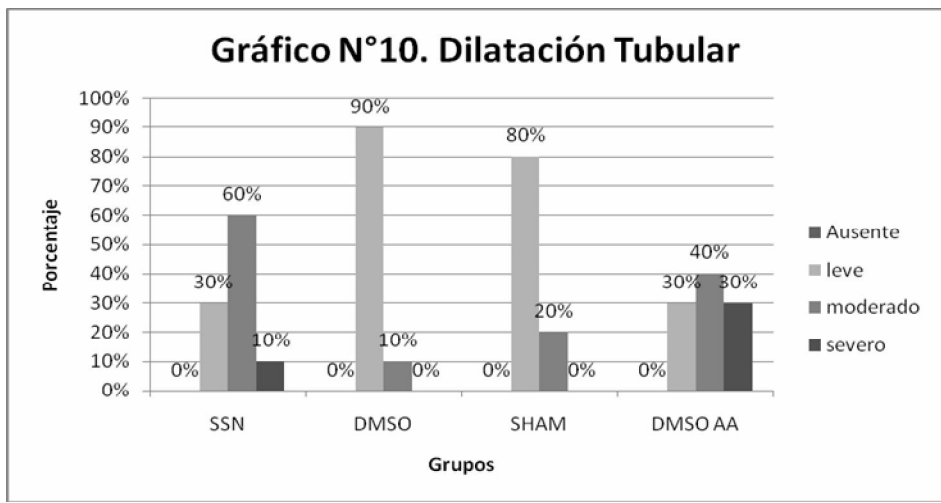
Adelgazamiento del Epitelio

Esta variable presentó un valor $p < 0.0025$ por Kruskal-Wallis, encontrándose valores significativos entre dos grupos, los cuales correspondieron a I/R SSN vs I/R DMSO. De esta manera se observó que un 50% de los sujetos a los que se les administró SSN habían presentado un moderado adelgazamiento del epitelio y un 50% lo había presentado de manera severa, comparada con aquellos sujetos en donde sólo se utilizó DMSO, en quienes un 40% no presentó adelgazamiento del epitelio y sólo un 60% lo presentaron de forma leve. (Gráfico N°9)



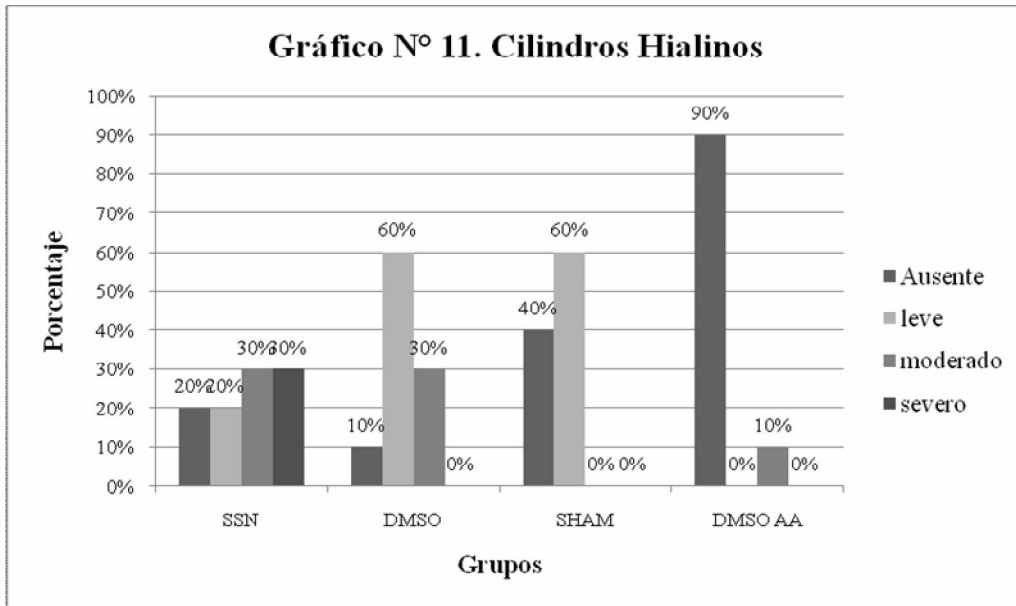
Dilatación tubular

Esta variable presentó un valor p de 0.0047 por Kruskal-Wallis, encontrándose valores significativos entre dos grupos, los cuales correspondieron a I/R DMSO vs I/R DMSO-AA. De esta manera se observó que un 90% y 10% de los sujetos a los que se les administró DMSO habían presentado una leve y moderada dilatación tubular respectivamente, comparada con aquellos sujetos en donde se utilizó DMSO junto al ácido ascórbico, en quienes un 30% presentó una dilatación tubular severa y un 40% una dilatación moderada, siendo el daño más prominente en el grupo conformado por DMSO-AA. (Gráfico N°10)



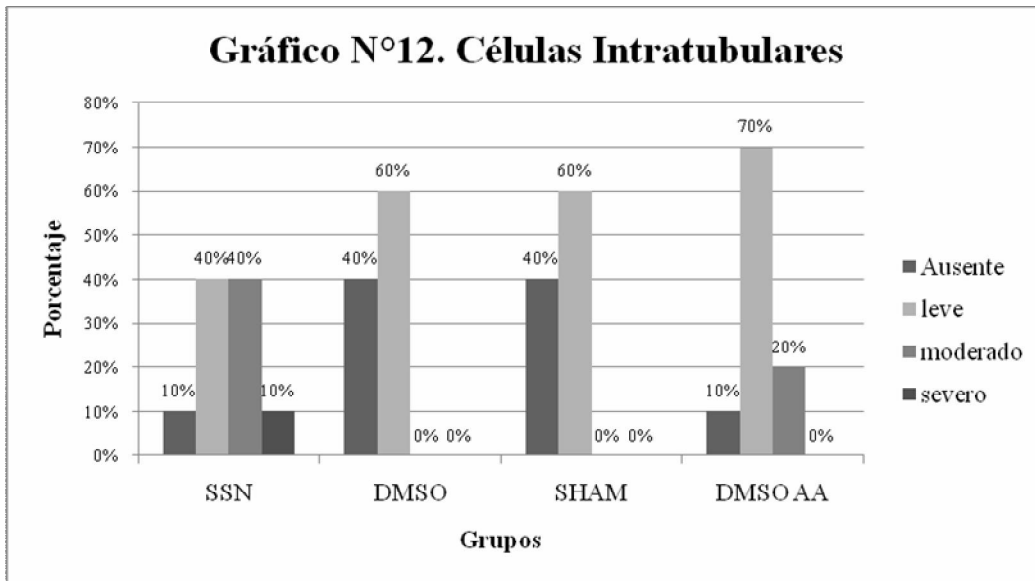
Cilindros Hialinos

Con respecto a esta variable, presentó un valor p de 0.0019 por Kruskal-Wallis, encontrándose significancia entre tres grupos, los cuales correspondieron a I/R SSN vs I/R DMSO-AA, y I/R DMSO vs I/R DMSO-AA. De esta manera se observó que un 80% de los sujetos a los que se les administró SSN habían presentado cilindros hialinos comparada con aquellos sujetos en donde se utilizó DMSO y ácido ascórbico quienes presentaban sólo un 10% de cilindros hialinos. Al comparar el grupo I/R DMSO vs I/R DMSO-AA, se observó que en aquellos sujetos perteneciente al grupo DMSO solo un 10% no había presentado cilindros comparado al 90% del grupo DMSO-AA, en quienes se observó ausencia de cilindros. Demostrando que dentro de los 4 grupos la ausencia de los cilindros hialinos predominó en el grupo DMSO-AA. (Gráfico N°11)



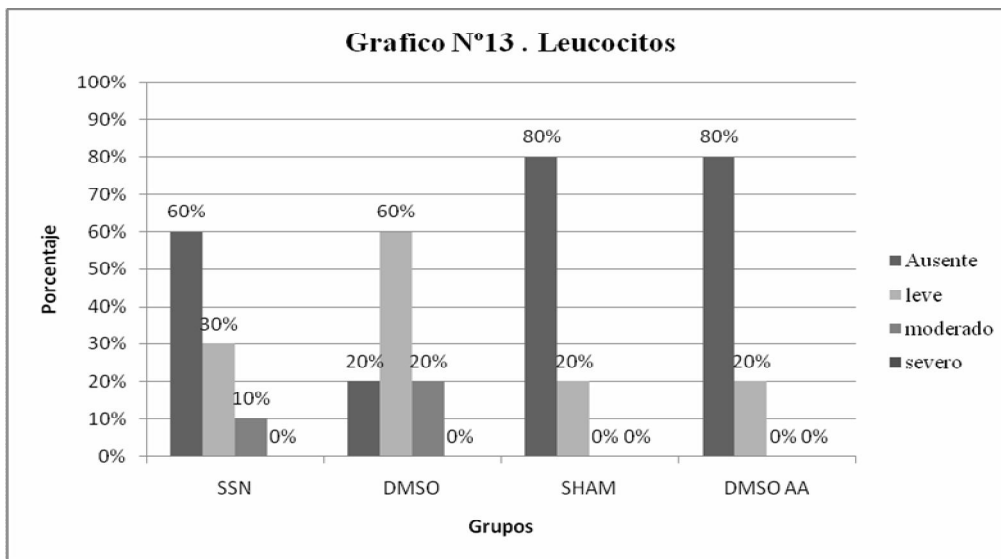
Células Intratubulares

Esta variable presentó un valor p de 0.0049 por Kruskal-Wallis, encontrándose valores significativos entre tres grupos, los cuales correspondieron a I/R SSN vs I/R DMSO, y I/R SSN vs I/R SHAM. De esta manera se observó que un 40% de los sujetos a los que se les administró DMSO no habían presentado células intratubulares comparado con aquellos sujetos en donde se utilizó SSN en quienes sólo un 10% no presentó células intratubulares. Al comparar el grupo I/R SSN vs I/R SHAM, se observó que en aquellos sujetos pertenecientes al grupo SHAM 40% no presentaba células y un 60% las presentaba en forma leve, en comparación al grupo SSN, quienes presentaban en un 10% células intratubulares de forma severa y 40% de forma moderada.. (Gráfico N°12)



Leucocitos

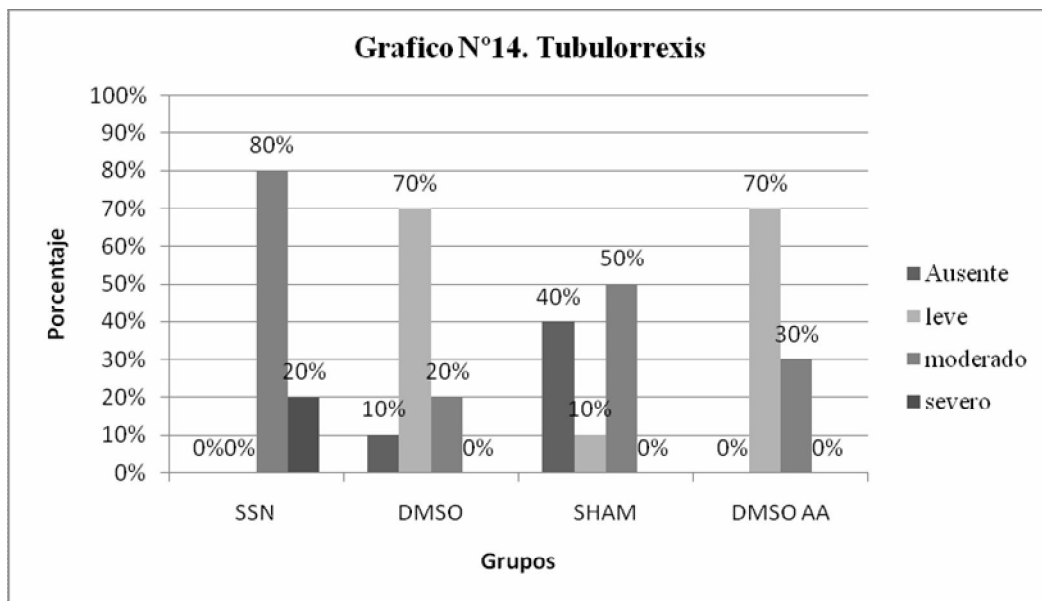
Esta variable presentó un valor p de 0.0148 por Kruskal-Wallis, encontrándose valores significativos entre tres grupos, los cuales correspondieron a I/R DMSO vs I/R SHAM, y I/R DMSO vs I/R DMSO-AA. De esta manera se observó que un 80% de los sujetos a los que se les administró DMSO habían presentado leucocitos comparado con aquellos sujetos pertenecientes al grupo SHAM, en quienes solo un 20% presentaba leucocitos. Al comparar el grupo I/R DMSO vs I/R DMSO-AA, se observó que en aquellos sujetos perteneciente al grupo DMSO-AA un 80% no presentaba leucocitos y se habían encontrado de forma leve en un 20%. (Gráfico N°13)



Tubulorrexis

Esta variable presentó un valor p de 0.0027 por Kruskal-Wallis, encontrándose significancia entre los cuatro grupos, los cuales correspondieron a I/R SSN vs I/R DMSO, I/R SSN vs I/R SHAM y I/R SSN vs I/R DMSO-AA. De esta manera se observó que un 20% de los sujetos a los que se les administró DMSO habían presentado tubulorrexis en forma moderada comparado con aquellos sujetos en donde se utilizó

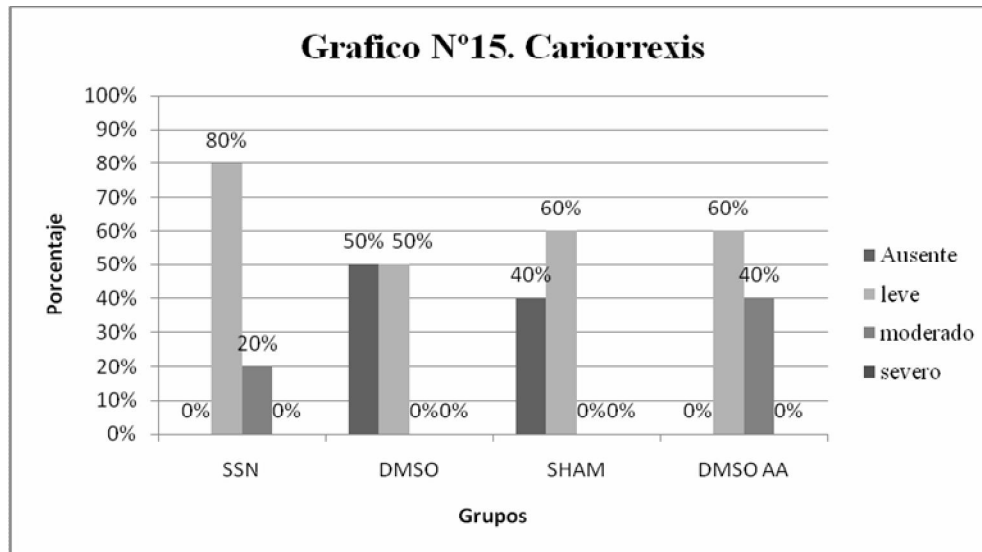
SSN en quienes se observaba un 80% de tubulorrexis en forma moderada. Al comparar el grupo I/R SSN vs I/R SHAM, los sujetos perteneciente al grupo SHAM, un 40% no presentaba tubulorrexis y un 50% la presentaba en forma moderada, en comparación al grupo SSN, quienes presentaba en un 80% tubulorrexis en forma moderada y en un 20% en forma severa. Al analizar el grupo DMSO-AA vs SSN, un 70% se observaba tubulorrexis en forma leve y un 30% de forma moderada. Al evaluar los cuatro grupos, el grupo perteneciente a SSN fue el más afectado significativamente. (Gráfico N°14)



Cariorrexis

Al evaluar esta variable presentó un valor p de 0.0014 por Kruskal-Wallis, obteniéndose valores significativos entre tres grupos, los cuales correspondieron a I/R DMSO vs I/R DMSO-AA, y I/R SHAM vs I/R DMSO-AA. De esta manera se observó que un 50% de los sujetos a los que se les administró DMSO no presentaron cariorrexis comparado con aquellos sujetos pertenecientes al grupo DMSO-AA, en donde el 100% presentó cariorrexis de forma leve o moderada. Al comparar el grupo I/R SHAM vs I/R

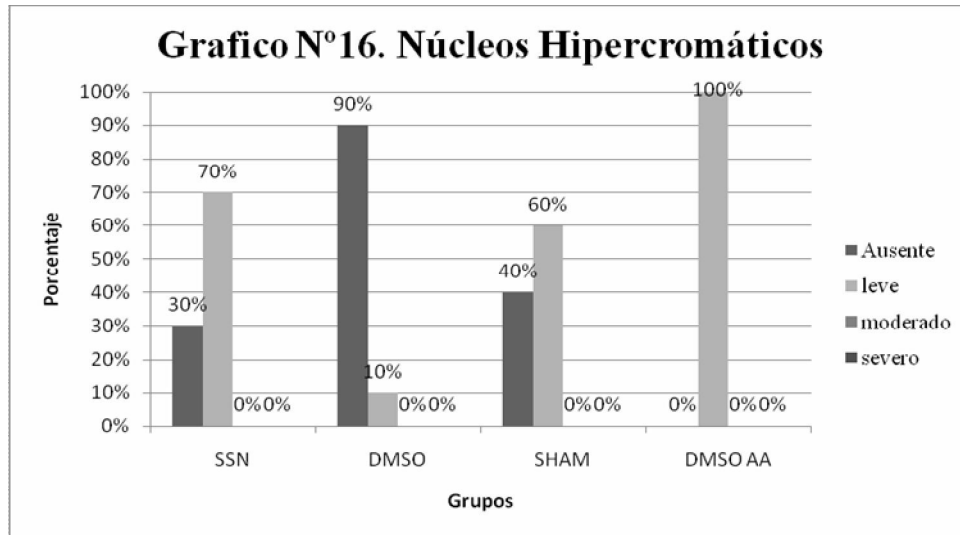
DMSO-AA, se observó que en aquellos sujetos perteneciente al grupo SHAM un 40% no presentaba cariorrexis, algo no visto en el grupo DMSO-AA. El grupo menos afectado en esta ocasión fue el perteneciente al DMSO. (Gráfico N°15)



Núcleos Hiper Cromáticos

Esta variable presentó un valor p de 0.0007 por Kruskal-Wallis, encontrándose valores significativos entre tres grupos, los cuales correspondieron a I/R SSN vs I/R DMSO, y I/R DMSO vs I/R DMSO-AA. Observándose que un 30% de los sujetos a los que se les administró SSN no habían presentado núcleos hiper cromáticos, comparado con aquellos sujetos en donde se utilizó DMSO, en quienes un 90% no presentaba núcleos hiper cromáticos. Al comparar el grupo I/R DMSO vs I/R DMSO-AA, se observó que en

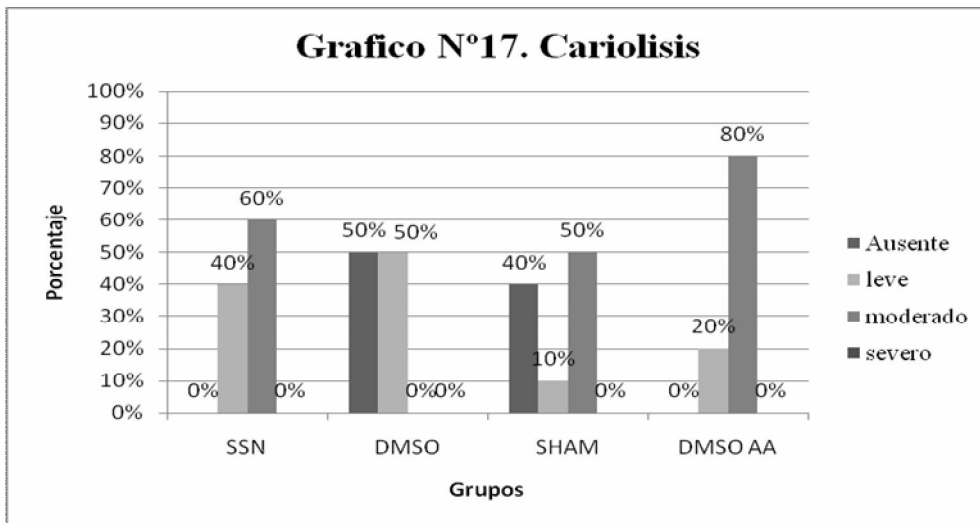
aquellos sujetos donde se utilizó ácido ascórbico y DMSO el 100% había presentado daño leve, mientras que aquellos en los que solo se utilizó DMSO el porcentaje afectado era de un 10%. (Gráfico N°16)



Cariólisis

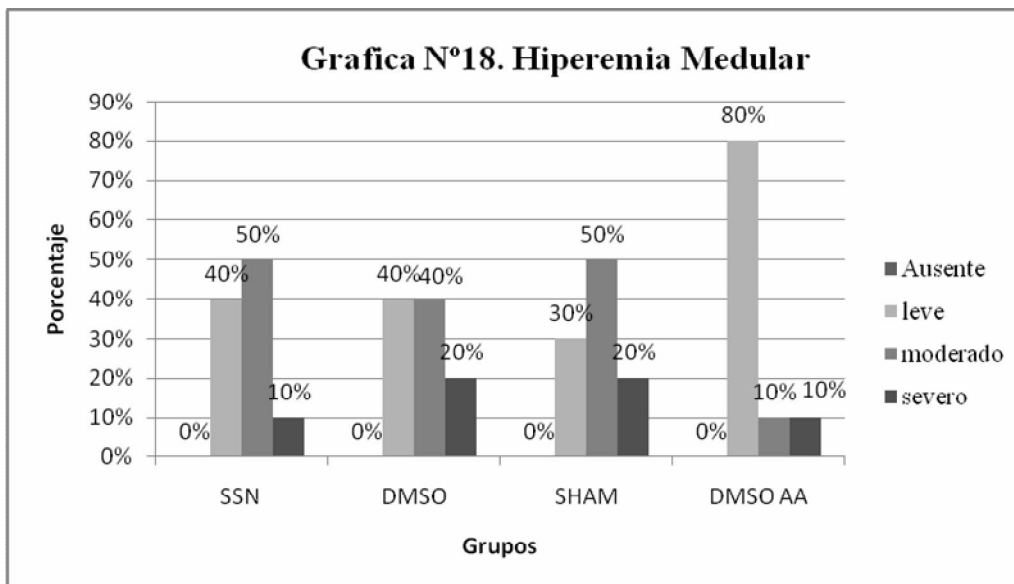
Esta variable presentó un valor p de 0.0015 por Kruskal-Wallis, encontrándose valores significativos entre tres grupos, los cuales correspondieron a I/R SSN vs I/R DMSO, y I/R DMSO vs I/R DMSO-AA. Observándose que en un 50% de los sujetos a los que se les administró DMSO no habían presentado cariólisis, comparado con aquellos sujetos en donde se utilizó SSN, en quienes un 100% presentó cariólisis de forma leve moderada. Al comparar el grupo I/R DMSO vs I/R DMSO-AA, se observó que en aquellos sujetos donde se utilizó ácido ascórbico y DMSO el 80% había presentado daño moderado y el 20% de forma leve, mientras que aquellos en los que solo se utilizó

DMSO el porcentaje afectado era de un 50% en forma leve y el 50% restante no presentaba cariólisis. (Gráfico N°17)



Hiperemia Medular

Esta variable presentó un valor p equivalente a 0.2034 por Kruskal-Wallis, al utilizar el test de Dunn, se observó que ninguno de los grupos presentó resultados significativos entre sí. (Gráfico N°18)



Discusión

Los riñones son órganos complejos que realizan numerosas funciones, permitiendo mantener la homeostasis del cuerpo humano¹¹, pero cuya funcionabilidad depende de la perfusión sanguínea, la cual puede verse afectada por distintas entidades clínicas: como el síndrome de isquemia-reperusión en donde el riñón es sometido temporalmente a la falta de flujo sanguíneo, ocasionando un daño que lleva al fracaso de su función excretora, con una consecuente acumulación de desechos nitrogenados y alteraciones hidroelectrolíticas que conllevan al fallo renal agudo (FRA)¹². Que a pesar de los nuevos conceptos sobre éste y los avances en su manejo, continua teniendo una mortalidad de un 50% a 80% en pacientes ingresados en Unidades de Cuidados Intensivos⁶.

Según Romanque y cols, durante el fenómeno I/R, existen cambios metabólicos, morfológicos y funcionales producidos por alteraciones de los niveles de ATP, alteraciones de la membrana celular incrementando la permeabilidad de entrada de calcio, sodio y agua a la célula, generación de radicales libres, acumulación de mediadores inflamatorios, redistribución de los componentes del citoesqueleto, etc. Todos estos cambios observables en mayor o menor extensión en función de la severidad y duración del proceso de isquemia²¹.

En la actualidad, el criterio más utilizado para definir la FRA corresponde a un incremento en el nivel basal de la creatinina sérica, por lo menos de 0.5mg/dl^{15,20}, y dentro de la función renal, la creatinina resulta un excelente marcador del daño renal en las primeras 72 horas, como fue demostrado por O'Donnell y cols, quienes en estudios realizados en ratones sometidos a procesos de isquemia y reperusión, midieron los

niveles de depuración de insulina comparándolos con los niveles de creatinina plasmática, mostrando como la creatinina podía ser un indicador temprano de disfunción renal post isquémica⁶². Lo que se demuestra en el grupo control con una tendencia general al incremento de los valores plasmáticos sobre los otros grupos, sometidos igualmente al proceso de isquemia por 30 minutos, confirmando el deterioro de la función renal y la presencia de una falla renal en dichas unidades experimentales. (Tabla N°1)

La investigación de sustancias con efectos protectores, o neutralizadores de radicales libres que disminuyan el daño renal post isquemia, constituye un paso más para el establecimiento de alternativas terapéuticas en pacientes que presentan daño isquémico, y el conocer más acerca de sus efectos antioxidantes, resulta útil por la importancia de los radicales libres en la fisiopatología de la I/R.⁸

En estudios anteriores, en donde Hoyos y cols, establecieron modelos utilizando DMSO como sustancia protectora durante episodios de isquemia y reperfusión. En este modelo se observó cambios histológicos más severos en unidades experimentales sometidas a tiempos prolongados de isquemia que no utilizaron DMSO. En aquellas unidades experimentales con tiempos prolongados de isquemia, la administración endovenosa de DMSO mostraba características profilácticas en los parámetros histopatológicos.⁴⁵ Este mismo fenómeno se presenta en este estudio en cuyas unidades experimentales tratadas con el DMSO, presentaron menor daño hístico comparándolas con el grupo control. (Gráfico N°4).

El ácido ascórbico, un antioxidante con agentes reductores, capaces de neutralizar el poder oxidativo de los RLO, el cual utilizado en modelos de ratas disminuyó la actividad del PAF y cuya histología presentó menos daño a nivel intersticial,

presentando menos hemorragia, necrosis y edema en comparación al grupo que no recibió el antioxidante.⁴⁶ Este efecto protector se demostró nuevamente en este estudio, al ser utilizado junto al DMSO, potencializando su efecto, disminuyendo los daños histológicos sobre el grupo control, en donde los parámetros de necrosis tales como vacuolización, edema celular y dilatación tubular⁶³ fueron predominantes. (Ver Gráfico N° 4 y Patología descriptiva)

Histopatología

Como complemento a las pruebas químicas, se realizó una evaluación histopatológica a los riñones, puesto que la caracterización morfológica celular por microscopía sigue siendo el gold estándar para la identificación de los procesos apoptóticos y necróticos, a pesar de la existencia de métodos cuantitativos más novedosos⁶⁵.

Estos resultados reflejaron los efectos nocivos creados por la isquemia y la reperfusión sanguínea, en donde la falla de los mecanismos antioxidantes y otros procesos moleculares llevan hacia una lesión tubular ocasionando cambios progresivos que se manifiestan como una Necrosis tubular aguda.²⁰ Fenómenos, como vacuolización, dilatación tubular, formación de cilindros hialinos, pérdida focal de células del epitelio tubular proximal con falta de continuidad del mismo,⁶⁶ son cambios necróticos observados predominantemente en el grupo control con un 59%, sobre los otros grupos en el que se utilizaron antioxidantes, (Grupo DMSO-AA 51% y Grupo DMSO 33%).

Un fenómeno observado en la Necrosis Tubular Aguda, es la formación de cilindros hialinos intratubulares, causado por el desprendimiento de células epiteliales que se unen entre sí. Esta alteración del citoesqueleto juega un papel importante en la obstrucción al flujo tubular y en el escape tubular del mismo, lo que contribuye poderosamente a la disminución al filtrado glomerular en la fase inicial de la FRA y a pesar que su repercusión funcional no está totalmente aclarada es probable que la obstrucción generada, ocasione alteraciones hemodinámicas renales^{67,68,69,70,71,72}. Fenómeno que está ausente en un 90% en el grupo que utiliza DMSO-AA, comparado al grupo control en el cual se observa la presencia de cilindros hialinos de un 80% (Gráfico N° 11). Lo que explicaría la función protectora de ambos antioxidantes, el DMSO como scavenger de RLO y el ácido ascórbico como scavenger y antioxidante en medios acuosos, en la prevención del deterioro de la filtración glomerular y por ende en la función renal. Este fenómeno de igual manera fue observado en el estudio realizado por Lee y col, donde se realizó auto-trasplantes renales en 8 caninos, a quienes posteriormente se les colocó 100mg/kg de ácido ascórbico, realizando una nefrectomía 21 días posterior a la intervención, obteniendo resultados histológicos que demostraban una menor presencia de cilindros intratubulares, células inflamatorias y alteraciones tubulares, en el grupo que había utilizado ácido ascórbico sobre aquel manejado con líquidos endovenosos.⁵³

Durante el período de isquemia, existe una disfunción retrograda del filtrado glomerular que lleva a un edema celular provocando cambios tubulares, éstos junto a otras alteraciones como destrucción de la membrana basal, dilatación tubular, cariorrexis y presencia de polimorfonucleares evidencian la presencia de una FRA⁷³. En los 40 riñones estudiados, todos evidenciaban la presencia de dichos cambios, pero la

diferencia de severidad entre cada grupo era notable al compararse entre sí. En el grupo SSN, el 40% mostraba edema severo y 20% presentaba cariorrexis severa, mientras que en los grupos DMSO Y DMSO-AA, el edema correspondía a un 0% y 10% respectivamente y la cariorrexis a 0% para ambos grupos. Mostrando nuevamente la superioridad de la utilización de agentes antioxidantes en la mitigación de daño histopatológico renal. (Gráfico N°6 y 15) Hallazgos que concuerdan, con otros estudios realizados como el de Liu y col, quienes utilizaron el ácido ascórbico como una sustancia de acondicionamiento al proceso de isquemia y reperfusión en un grupo de conejos, obteniendo una menor dilatación tubular, adelgazamiento de las células epiteliales y separación de membrana celular, en aquellos que usaron el antioxidante sobre el grupo control.⁷⁴

Al examinar la presencia de leucocitos en las muestras renales, llama la atención, que el 80% del grupo DMSO-AA no presentó dichos componentes celulares, semejándose al grupo Sham, pero superando al grupo DMSO y grupo SSN quienes presentaron leucocitos en un 80% y 40% respectivamente. Lo que plantearía la interrogante si el efecto del DMSO se vería potenciando por el uso de ácido ascórbico, en la reducción de la expresión de productos proinflamatorios y por ende disminuir el estado proinflamatorio que se genera en los procesos de I/R.^{53, 74, 75} (Gráfico N° 13)

Creatinina sérica

Basándose en la clasificación mundialmente aceptada de *RIFLE*, podemos establecer que las creatininas plasmáticas obtenida en el grupo I/R DMSO-AA, presentaron menor

elevación que los otros grupos. Clasificando sólo un 10% del total de las unidades experimentales dentro de la categoría *Injury*, dejando al 90% restante, fuera de los criterios de RIFLE. Observando en los grupos SSN, DMSO, SHAM, un promedio de incrementos de 2.92, 2.48 y 1.79 respectivamente. Colocando al 10% del grupo de SSN en *Failure*, al 100% del grupo DMSO en *Risk* y al 20% del grupo Sham en *Injury*. La superioridad de la combinación de ambos antioxidantes es significativa, cuando establecemos que en escenarios clínicos, estas creatininas no predicen el destino de la funcionabilidad renal, sin embargo muestran una tendencia de ella. Otros estudios apoyan las ventajas del uso del ácido ascórbico, como el realizado por Loong y cols, donde el utilizar ácido ascórbico en una dieta por 3 meses en pacientes con falla renal presentando una disminución de la creatinina en un 20%.⁵⁴ Estudios, realizado por Korkmaz y cols, quienes investigaron el efecto del ácido ascórbico, en un modelo isquemia-reperfusión en ratas, colocando dicho antioxidante una hora previa a la realización de la isquemia. Al realizar la medición de los parámetros bioquímicos posterior a la perfusión, los resultados demostraron un notable incremento de la creatinina, nitrógeno ureico y lactato deshidrogenasa, a excepción del grupo que utilizó ácido ascórbico en donde se observó una mejoría en los valores de los parámetros bioquímicos y menores alteraciones histopatológicas.⁶⁴

Es importante hacer notar los efectos beneficiosos del tratamiento combinado de un doble antioxidante en el presente modelo de isquemia reperfusion renal, sobre todo en el aspecto de evaluación bioquímica, donde la utilización de ambos, repercute en un incremento mínimo de la Creatinina, colocándola en los porcentajes más bajos de la clasificación sistemática del síndrome de falla renal y por ende en pronóstico más favorable. De igual manera los hallazgos histopatológicos sugieren que la presencia de

DMSO y AA, continúa siendo una opción terapéutica superior sobre el uso de líquidos, ofreciendo un grado de menor intensidad en los cambios esperados y observados en la FRA de origen isquémica. En la actualidad, los tratamientos convencionales de dicha patología, se han enfocado en el manejo sistémico de las alteraciones hemodinámicas, así como el control de las alteraciones hidroelectrolíticas, pero no se contempla el uso de medicamentos que se enfoquen en el riñón y en reducir su deterioro, por lo que mientras en el transcurso del tiempo en el que no se restablece la perfusión sistémica, éste sigue expuesto a los radicales libres de oxígeno y mecanismos proinflamatorios. Es aquí donde el uso ya sea sólo de DMSO o combinado con Ácido ascórbico, juega un rol decisivo, ya que su administración previa a la reperfusión sanguínea, ha mostrado resultados que permitan considerarlo como una alternativa terapéutica en la prevención secundaria de la Falla renal aguda.

Los resultados histológicos son concluyentes, mostrando cambios en la integridad tubular y glomerular semejante a los obtenidos por otros autores^{45,53,74,75,76}. Todos los grupos presentan cambios propios del proceso de isquemia-reperfusión, pero de igual manera se pueden observar el efecto de las sustancias antioxidantes sobre la protección de células epiteliales, mitigando o retrasando el proceso de destrucción celular, colaborando en la búsqueda de un tratamiento del daño renal secundario al fenómeno de isquemia-reperfusión.

El camino está preparado, pero se requiere de muchos más estudios que demuestren sus beneficios en procesos más complejos como trasplantes renales, y esto se lograra solo conociendo más acerca de los mecanismos de acción, interacciones entre sí, dosis ideales y efectos adversos, de tal manera puedan ser utilizados para el beneficio y preservación de los seres humanos.

Conclusiones

- El modelo experimental creado logra simular el escenario fisiopatológico de un evento de isquemia-reperfusión renal.
- Se observaron características histopatológicas compatibles con el síndrome isquemia-reperfusión y un aumento de la creatinina sérica posterior al evento.
- La combinación DMSO-AA, presenta menores incrementos en los valores de la creatinina que los demás grupos.
- El uso combinado DMSO-AA durante el síndrome de isquemia reperfundida parece disminuir el daño renal desde el punto de vista histopatológico.
- El uso de DMSO-AA logra reducir el número de unidades experimentales que puedan ser clasificadas dentro de las categorías RIFLE,
- El grupo manejado con DMSO sometido al evento isquemia y posterior reperfundida a los 30 minutos, presentó menor daño renal histopatológicamente.
- El daño renal observado presentó una distribución generalizada en todos los grupos, tanto en la corteza renal, túbulo proximal, distal y pelvis renal.
- Los resultados obtenidos permiten identificar la superioridad del uso de antioxidantes versus el manejo convencional con líquidos endovenosos.
- Los daños histopatológicos encontrados en el grupo DMSO-AA son moderados, en comparación con el grado de severidad que presenta el grupo SSN.

Recomendaciones

- Mejorar el modelo experimental para futuros estudios, teniendo en cuenta un mejor monitoreo del gasto urinario y optimizando la administración de líquidos endovenosos.
- Realizar estudios que evalúen el uso de ácido ascórbico como agente único en el fenómeno isquemia.-reperfusión.
- Realizar estudios que evalúen la sobrevivencia de las unidades experimentales en períodos de 24 a 72 horas.
- Realizar estudios que evalúen mayor cantidad de parámetros bioquímicos, relacionándolo con los daños histopatológicos.
- Futuros estudios bajo este mismo tema, se enfoquen en las variables independientes en las que el DMSO- ácido ascórbico, haya mostrado un mayor beneficio.
- Demostrar la actividad enzimática desencadenada en el modelo y como la actividad antioxidante repercute en la minorización del daño tisular
- Utilizar técnicas de inmunohistoquímica para evaluar el modelo.

Cronograma

Cronograma de actividades

Mes \ Actividad	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre
Entrega de protocolo al comité de tesis.									
Entrega de solicitud de asesor.									
Resolución de comité de tesis.									
Modificaciones de protocolo									
Actividades de gestión de insumos.									
Adquisición de insumos.									
Realización de prueba piloto.									
Realización de experimentos.									
Obtención de resultados.									
Tabulación de resultados.									
Análisis de resultados.									
Redacción de tesis									
Entrega de tesis.									
Defensa de tesis.									

Presupuesto

Material	Cantidad	Precio Unitario	Total
Conejos machos Nueva Zelanda	41	\$10.60	\$434
Ketamina	15	\$22.62	\$339.3
Acepromacina	1	\$16.5	\$16.5
Dimetilsulfóxido	10	\$6.09	\$60.9
Ácido Ascorbico	7	\$5.29	\$37.03
Solucion Salina Normal 0.9%	40	\$0.67	\$27.12
Insumos médicos	Variable	\$300	\$300
Pruebas de laboratorio	120 tiras	\$1.5 /tira	\$180
Patólogo	60 cortes	\$5	\$300
Gastos de alimentación y transporte	31 conejos	\$5	\$155
Papelería	Variable	\$50	\$50
Imprevistos	Variable	20%	\$400
Total			\$2299.85

Bibliografía

1. Domínguez Torres, L;Gómez Morales, G. Síndrome de reperfusión en el paciente quirúrgico: fisiopatología, manifestaciones clínicas y nuevas alternativas de manejo. *Univ med.* 2005;46(3):94-102.
2. Kedar I, Jacob ET, Bar-Natan N, Ravid M. Dimethyl sulfoxide in acute ischemia of the kidney. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1983;411:131-134.
3. Lee J, Kim M, Park C, Kim M. Influence of ascorbic acid on BUN, creatinine, resistive index in canine renal ischemia-reperfusion injury. *J. Vet. Sci.* 2006;7(1):79-81.
4. Hernán, Carlos. Insuficiencia renal aguda. *Bioline International.* 2001;32(2):83-85.
5. Star RA. Treatment of acute renal failure. *Kidney Int.* 1998;54(6):1817-1831.
6. Chertow GM, Christiansen CL, Cleary PD, Munro C, Lazarus JM. Prognostic stratification in critically ill patients with acute renal failure requiring dialysis. *Arch. Intern. Med.* 1995;155(14):1505-1511.
7. Diez Primeras causas de muertes hospitalarias. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, El Salvador, 2008. Available at: http://www.mspas.gob.sv/pdf/causas_frecuentes2008/Muertes_Todas_las_Edades_2008.pdf [Accessed March 5, 2010].
8. Aguilar Ruíz, A. Papel de los antioxidantes en la lesión por Isquemia-Reperfusión, Estudio experimental de trasplante renal con donante a corazón partido. 2004. Available at: http://www.tesisenxarxa.net/TESIS_UB/AVAILABLE/TDX-0309105-090001/TESIS_A_AGUILAR.pdf.
9. Singbartl K, Green SA, Ley K. Blocking P-selectin protects from ischemia/reperfusion-induced acute renal failure. *FASEB J.* 2000;14(1):48-54.
10. Moore KL, Dalley AF, Agur AM. *Clinically Oriented Anatomy, Sixth Edition: Softcover North American Edition.* 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2009.
11. Guyton AC, Hall JE. *Textbook of Medical Physiology.* 10th ed. W.B. Saunders Company; 2000.
12. Kasper DL, Braunwald E, Hauser S, et al. *Harrison's Principles of Internal Medicine 16e.* 16th ed. McGraw-Hill Professional; 2004.
13. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Diez Primeras causas de muertes hospitalarias. Ambos sexos Todas las edades. 2007. Available at: http://www.mspas.gob.sv/pdf/causas_frecuentes2008/Muertes_Todas_las_Edades_2007.pdf.

14. Rodríguez R, Roca A. Insuficiencia Renal Aguda. 2006. Available at: <http://www.cht.es/mir2006/MANUAL/Capitulo%20091.pdf> [Accessed March 6, 2010].
15. Martínez T, Delgado VA, Achiardi R. Insuficiencia Renal Aguda. 2004;45(2):57-64.
16. Melnikov ,, Molitoris B. Improvements in the Diagnosis of Acute Kidney Injury. 2008;19(4):537-544.
17. Hoste E, Clermont G, Kersten A, et al. RIFLE criteria for acute kidney injury are associated with hospital mortality in critically ill patients: a cohort analysis. *Critical Care*. 2006;10(3):R73.
18. Kellum J, Bellomo R, Ronco C. The Concept of Acute Kidney Injury and the RIFLE Criteria. 2007;156:10-16.
19. Lattanzio MR, Kopyt NP. Acute Kidney Injury: New Concepts in Definition, Diagnosis, Pathophysiology, and Treatment. *J Am Osteopath Assoc*. 2009;109(1):13-19.
20. Schrier RW, Wang W, Poole B, Mitra A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *J. Clin. Invest*. 2004;114(1):5-14.
21. Romanque U P, Uribe M M, Videla LA. Mecanismos moleculares en el daño por isquemia-reperusión hepática y en el precondicionamiento isquémico. *Rev. méd. Chile*. 2005;133(4). Available at: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0034-98872005000400012&script=sci_arttext [Accessed March 6, 2010].
22. Jassem W, Fuggle SV, Rela M, Koo DDH, Heaton ND. The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury. *Transplantation*. 2002;73(4):493-499.
23. Linares Quevedo A, Burgos Revilla F, Villafruela Sanz J, et al. Análisis comparativo de la función del injerto renal de donante vivo tras nefrectomía abierta y laparoscópica: modelo experimental. *Actas Urol Esp*. 2008;32(1). Available at: http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S0210-48062008000100014&script=sci_arttext [Accessed July 7, 2010].
24. Schumer M, Colombel M, Sawczuk I, Globe G. Morphologic, Biochemical, and Molecular Evidence of Apoptosis During the Reperfusion Phase After Brief Periods of Renal Ischemia. *American Journal of Pathology*. 1992;140(4):831-833.
25. Cascales angosot, M. Bases moleculares de la apoptosis. *Anal. Real Acad. Nal. Farm*. 2003;69:39-43.
26. De Toro, G. Muerte celular progamada. Revisión del paradigma apoptosis-necrosis y formas alternativas de muerte celular. 2006. Available at:

<http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/histologia/apoptosis1.pdf> [Accessed June 30, 2010].

27. Santos NC, Figueira-Coelho J, Martins-Silva J, Saldanha C. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochem. Pharmacol.* 2003;65(7):1035-1041.

28. Hoyos W, Medina I, Lopez R, et al. Dimethyl sulphoxide administration decreases renal ischemic-reperfusion injury. *Critical Care.* 2009;13(Suppl 1):P366.

29. Muir M. DMSO: Many uses, much controversy. 2001. Available at: <http://www.dmsol.org/articles/information/muir.htm> [Accessed March 7, 2010].

30. Kolb KH, Jaenicke G, Kramer M, Schulze PE. Absorption, Distribution and Elimination of Labeled Dimethyl Sulfoxide in Man and Animals. *New York Academy Sciences Annals.* 1967;141:85-95.

31. Evans MS, Reid KH, Sharp JB. Dimethylsulfoxide (DMSO) blocks conduction in peripheral nerve C fibers: a possible mechanism of analgesia. *Neurosci. Lett.* 1993;150(2):145-148.

32. Salim AS. Role of oxygen-derived free radical scavengers in the management of recurrent attacks of ulcerative colitis: a new approach. *J. Lab. Clin. Med.* 1992;119(6):710-717.

33. Shirley SW, Stewart BH, Mirelman S. Dimethyl sulfoxide in treatment of inflammatory genitourinary disorders. *Urology.* 1978;11(3):215-220.

34. Matsumoto J. Clinical trials of dimethyl sulfoxide in rheumatoid arthritis patients in Japan. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1967;141(1):560-568.

35. De la Torre JC, Rowed DW, Kawanaga HM, Mullan S. Dimethyl sulfoxide in the treatment of experimental brain compression. *J. Neurosurg.* 1973;38(3):345-354.

36. de la Torre JC, Kawanaga HM, Johnson CM, et al. Dimethyl sulfoxide in central nervous system trauma. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1975;243:362-389.

37. Jo S, Hu X, Yuen PST, et al. Delayed DMSO administration protects the kidney from mercuric chloride-induced injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2004;15(10):2648-2654.

38. Schiffer CA, Whitaker CL, Schmukler M, Aisner J, Hilbert SL. The effect of dimethyl sulfoxide on in vitro platelet function. *Thromb. Haemost.* 1976;36(1):221-229.

39. Kirschner RE, Fantini GA. Role of iron and oxygen-derived free radicals in ischemia-reperfusion injury. *J. Am. Coll. Surg.* 1994;179(1):103-117.

40. Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit. Rev. Toxicol.* 1993;23(1):21-48.

41. Ashwood-Smith MJ. Current concepts concerning radioprotective and cryoprotective properties of dimethyl sulfoxide in cellular systems. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1975;243:246-256.
42. Ghosh AK, Tatsuji I, Ghosh S, Sloviter HA. Effects of dimethylsulfoxide on metabolism of isolated perfused rat brain. *Biochem. Pharmacol.* 1976;25(9):115-117.
43. Panganamala RV, Sharma HM, Heikkila RE, Geer JC, Cornwell DG. Role of hydroxyl radical scavengers dimethyl sulfoxide, alcohols and methional in the inhibition of prostaglandin biosynthesis. *Prostaglandins.* 1976;11(4):599-607.
44. Shlafer M, Kane PF, Kirsh MM. Effects of dimethyl sulfoxide on the globally ischemic heart: possible general relevance to hypothermic organ preservation. *Cryobiology.* 1982;19(1):61-69.
45. Hoyos W, Medina I, Lopez R, et al. Dimethyl sulphoxide administration decreases renal ischemic-reperfusion injury. *Critical Care.* 2009;13(Suppl 1):P366.
46. Benítez Zequeira D. Vitaminas y oxidorreductasas antioxidantes: defensa ante el estrés oxidativo. *Revista cubana de Investigaciones Biomédicas.* 2006;25(2):1-8.
47. Kostman TA, Tarlyn NM, Loewus FA, Franceschi VR. Biosynthesis of l-Ascorbic Acid and Conversion of Carbons 1 and 2 of l-Ascorbic Acid to Oxalic Acid Occurs within Individual Calcium Oxalate Crystal Idioblasts. *Plant Physiol.* 2001;125(2):634-640.
48. Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, et al. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr.* 2003;22(1):18-35.
49. Murad S, Grove D, Lindberg KA, et al. Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981;78(5):2879-2882.
50. Herane MI. Vitamina C tópica: usos en dermatología / Topic vitamin C: use in dermatology. 2001;17(3):191-196.
51. Korkmaz A, Kolankaya D. The protective effects of ascorbic acid against renal ischemia-reperfusion injury in male rats. *Ren Fail.* 2009;31(1):36-43.
52. Kuntscher V, Treska V, Racek J, et al. Does the administration of antioxidants as scavengers of reactive oxygen species in kidney transplantation really have sense? *Bratisl Lek Listy.* 2007;108(9):385-387.
53. Lee J, Son H, Kim M. Attenuation of ischemia-reperfusion injury by ascorbic acid in the canine renal transplantation. *J. Vet. Sci.* 2006;7(4):375-379.
54. Loong CC, Chang YH, Wu TH, et al. Antioxidant supplementation may improve renal transplant function: a preliminary report. *Transplant. Proc.* 2004;36(8):2438-2439.

55. Baar M, Cleland S, Delaney K, Kilborn S. Guidelines on Procurement of animals used in science. 2007. Available at: http://www.ccac.ca/en/CCAC_Programs/Guidelines_Policies/PDFs/Procurement_Guidelines_EN.pdf [Accessed March 12, 2010].
56. Olfert E, Cross B, McWilliam A. Manual sobre el cuidado y uso de los animales de experimentación. *Consejo Canadiense de Protección de Animales*. 2005;1. Available at: http://www.ccac.ca/en/CCAC_Programs/Guidelines_Policies/GUIDES/SPANISH/toc_v1.htm [Accessed March 12, 2010].
57. American Veterinary Medical Association. Guidelines on Euthanasia. 2007. Available at: http://www.avma.org/issues/animal_welfare/euthanasia.pdf [Accessed March 12, 2010].
58. Martínez Fernández MA. Anestesia inhalatoria en conejos. *Portal veterinaria Aragos*. 2010;493'521.
59. Ray, D. Blood collection and administration of fluids and drugs (rabbit) - Animal Research - The University of Iowa. *Animal Research*. 2002. Available at: [http://research.uiowa.edu/animal/?get=rbt_tech#Administration%20of%20Fluids%20and%20Drugs%20\(Overview\)](http://research.uiowa.edu/animal/?get=rbt_tech#Administration%20of%20Fluids%20and%20Drugs%20(Overview)) [Accessed July 7, 2010].
60. Cabrero M, Rilera A. Animales Exóticos. 2008. Available at: http://www.axon.es/paginas/pdf/71709_1.pdf [Accessed March 16, 2010].
61. Wagner M, Cadetg P, Ruf R, et al. Heme oxygenase-1 attenuates ischemia/reperfusion-induced apoptosis and improves survival in rat renal allografts. *Kidney Int*. 2003;63(4):1564-1573.
62. O'Donnell MP, Burne M, Daniels F, Rabb H. Utility and limitations of serum creatinine as a measure of renal function in experimental renal ischemia-reperfusion injury. *Transplantation*. 2002;73(11):1841-1844.
63. Hotchkiss R, Strasser, A, McDunn J. Cell Death. *N Engl J Med*. 2009;361:1570-1583.
64. Korkmaz A, Kolankaya D. The protective effects of ascorbic acid against renal ischemia-reperfusion injury in male rats. *Ren Fail*. 2009;31(1):36-43.
65. Henery S, George T, Hall B, et al. Quantitative image based apoptotic index measurement using multispectral imaging flow cytometry: a comparison with standard photometric methods. *Apoptosis*. 2008;13(8):1054-1063.
66. Racusen L, Nast C. Renal Histopathology, Urine Cytology, and Cytopathology of Acute Renal Failure. In: *Atlas od diseases of the Kidney*. Vol 1. 1st ed. 9. ISN Informatics Comission; 2000:9.1-9.12. Available at: http://www.kidneyatlas.org/book1/adk1_09.pdf [Accessed October 26, 2010].
67. Barranco F, Blasco J, Morales A. Insuficiencia renal aguda. *Principios de*

Urgencias, Emergencias y Cuidados Críticos. 2002. Available at: <http://tratado.uninet.edu/c070103.html> [Accessed October 27, 2010].

68. Finckh ES. Experimental acute tubular nephrosis following subcutaneous injection of glycerol. *J. Pathol.* 1957;73(1):69-85.

69. Ruiz-Guiñazú A, Coelho J, Paz R. Methemoglobin-Induced Acute Renal Failure in the Rat. *Nephron.* 1967;4(5):257-275.

70. Venkatachalam MA, Bernard DB, Donohoe JF, Levinsky NG. Ischemic damage and repair in the rat proximal tubule: Differences among the S1, S2, and S3 segments. *Kidney Int.* 1978;14(1):31-49.

71. Hoyer JR, Seiler MW. Pathophysiology of Tamm-Horsfall protein. *Kidney Int.* 1979;16(3):279-289.

72. Rodríguez-Barbero, E Bosque, López-Novoa J. Modelos experimentales de fracaso renal agudo. *Revista de Nefrología de Universidad Salamanca.* 1992;XII(4):48-54.

73. Díaz MDL. *Insuficiencia Renal Aguda*. Primera. Mexico: Editorial Limusa S.A. De C.V.; 2002.

74. Liu L, Lin Y, Yan L, et al. Extracellular ascorbic acid fluctuation during the protective process of ischemic preconditioning in rabbit renal ischemia-reperfusion model measured. *Chin. Med. J.* 2010;123(11):1441-1446.

75. Korkmaz A, Kolankaya D. The protective effects of ascorbic acid against renal ischemia-reperfusion injury in male rats. *Ren Fail.* 2009;31(1):36-43.

76. Kocoglu H, Ozturk H, Ozturk H, Yilmaz F, Gulcu N. Effect of dexmedetomidine on ischemia-reperfusion injury in rat kidney: a histopathologic study. *Ren Fail.* 2009;31(1):70-74.

