

## 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. LUÍS EDMUNDO VÁSQUEZ  
ESCUELA DE MEDICINA

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE  
DOCTOR EN MEDICINA

**EFECTO DEL DIMETILSULFÓXIDO (DMSO) Y N-ACETILCISTEINA (NAC) EN  
UN MODELO ANIMAL DE ISQUEMIA-REPERFUSION RENAL**

**Alumnos:**

Patricia Eugenia Flores

Gabriel Alejandro López Vega

**Asesor:**

William Hoyos

**Patólogo:**

Dr. José Nicolás Astacio

Diciembre 2010

## AUTORIZACIÓN

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios principalmente por siempre estar con nosotros, por darnos fortaleza y perseverancia. Gracias por iluminarnos y poner en nuestro camino aquellas personas que han sido clave durante todo el periodo de nuestra carrera y por permitir finalizar este arduo trabajo.

Agradecemos hoy y siempre a nuestros padres quienes nos brindaron estabilidad emocional y económica. Gracias por su apoyo incondicional y por haber compartido con nosotros las angustias y alegrías durante toda la carrera. Definitivamente nada de esto hubiera sido posible sin ustedes. Gracias por siempre estar pendientes sin importar las distancias, los queremos mucho.

Al Dr. William Hoyos quien fue más que un asesor, un amigo, un integrante más de este equipo de trabajo. Gracias por su apoyo, disposición y entusiasmo.

Al Dr. Nicolás Astacio Soria por su espíritu trabajador y paternal, gracias por su experiencia, sabiduría y colaboración, además de ser un gran maestro.

A nuestras amigas Ligia y Bea quienes han permanecidos a nuestro lado durante toda la carrera. Gracias por su apoyo, amistad y por habernos permitido trabajar con ustedes, sepan que han sido un pilar importante en nuestras vidas y siempre permanecerán en nuestros corazones.

A Roberto, Jorge, Ileana, José Roberto, Ricardo y Marcela quienes fueron los investigadores que sentaron las bases para nuestro estudio. Su arduo trabajo dio fruto en el nuestro, gracias por la motivación.

## TABLA DE CONTENIDO

AUTORIZACIÓN .....	1
AGRADECIMIENTOS .....	2
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	7
JUSTIFICACIÓN .....	8
MARCO TEÓRICO .....	9
Anatomía y Fisiología .....	9
Irrigación.....	10
Unidad funcional del riñón .....	10
INSUFICIENCIA RENAL AGUDA.....	11
Definición.....	11
Criterios de RIFLE .....	13
Clasificación .....	14
Diagnostico .....	15
Parámetros bioquímicos de la función renal.....	16
Creatinina .....	16
Nitrógeno ureico (BUN).....	16
Relación creatinina: BUN.....	16
SÍNDROME ISQUEMIA/REPERFUSIÓN (I/R).....	17
Fase Isquemia .....	17
Fase reperfusión .....	18
Radicales libres de oxígeno.....	19
DIMETILSULFÓXIDO (DMSO) .....	21
Farmacocinética .....	22
El DMSO como Antiinflamatorio.....	22
DMSO en casos de trauma del sistema nervioso central.....	22
DMSO protector en lesión isquémica .....	22
N-ACETILCISTEÍNA (NAC).....	24
Química y farmacocinética .....	24
Mecanismo de acción.....	24
Indicaciones clínicas <sup>43</sup> .....	25
Enfermedades respiratorias .....	25

Infección por el virus de inmunodeficiencia humana .....	25
Cáncer y quimioprofilaxis .....	25
Sobredosis de acetaminofén .....	27
Efectos adversos y seguridad.....	26
Dosis .....	26
MUERTE CELULAR .....	27
HISTOPATOLOGÍA DE LA ISQUEMIA RENAL AGUDA .....	28
OBJETIVOS .....	31
OBJETIVO GENERAL.....	31
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
METODOLOGÍA.....	32
Tipo y Diseño General del Estudio. ....	32
Diseño Experimental. ....	32
Preparación Pre quirúrgica. ....	33
Preparación del área quirúrgica.....	33
Pre medicación y anestesia .....	33
Acceso venoso .....	33
Monitorización de las constantes vitales .....	34
Procedimiento Quirúrgico .....	34
Toma de muestras .....	36
Muestras sanguíneas.....	36
Muestras anatomopatológicas .....	36
Eutanasia .....	37
Universo, Selección y Tamaño de la Muestra.....	37
Aleatorización de la muestra.....	37
Criterios de inclusión y de exclusión .....	37
Procedimiento para la recolección de la información .....	39
Análisis estadístico .....	39
Variables Paramétricas.....	39
Variables no Paramétricas.....	39
Procedimientos para considerar los aspectos éticos .....	39
RESULTADOS.....	40

Creatinina Sérica .....	40
Histopatológicos .....	43
PATOLOGIA DESCRIPTIVA.....	45
Grupo I/R SSN .....	45
Grupo I/R DMSO .....	46
Grupo I/R SHAM.....	46
Grupo I/R DMSO-NAC .....	47
Resultados estadísticos de las 14 variables histopatológicas.....	48
Vacuolización .....	48
Degeneración hidrópica .....	49
Edema Intracelular .....	49
Separación membrana basal .....	50
Adelgazamiento del epitelio.....	51
Dilatación tubular .....	51
Leucocitos.....	52
Tubulorrexis.....	53
Cariorrexis.....	54
Nucleos hiperromaticos.....	54
Cariolisis.....	55
Hiperemia medular .....	56
DISCUSIÓN.....	57
La Creatinina sérica .....	59
Histopatología.....	59
CONCLUSIONES.....	62
RECOMENDACIONES.....	63
CRONOGRAMA .....	64
PRESUPUESTO .....	65
BIBLIOGRAFIA .....	66

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La principal causa de la Insuficiencia renal aguda (IRA) es la isquemia renal<sup>1</sup>, entidad clínica frecuente en escenarios hospitalarios en donde se hace presente la disminución del flujo sanguíneo renal. La IRA está presente en aproximadamente un 5% de los pacientes hospitalizados y en un 30% a 50% de los pacientes en unidades de cuidados intensivos, su mortalidad asociada oscila entre un 15% y 60%<sup>2</sup>.

A pesar de todos los esfuerzos y el desarrollo farmacológico de la medicina en las últimas décadas, esta patología continua manteniendo cifras significativas de morbimortalidad a diferencia de otras patologías isquémicas como el Infarto agudo de miocardio (IAM) y el Accidente cerebrovascular (ACV)<sup>3,4</sup>

Una de las causas de IRA es el síndrome de isquemia-reperusión (IR) renal, el cual se ha asociado a la hipoxia y acumulo de sustancias de desecho como la producción de radicales libres de oxígeno. El uso de antioxidantes como tratamiento para dicho problema ha sido y continuará siendo motivo de estudio.

El efecto de sustancias con acción antioxidante o aminoradoras del insulto oxidativo son una opción terapéutica perseguida, dado el protagonismo de los radicales libres en la fisiopatología del daño por IR.

Resultados obtenidos de investigaciones anteriores realizadas en la Universidad Dr. José Matías Delgado<sup>5,6</sup> demuestran que el uso de DMSO disminuye el daño renal por esta causa, dicha sustancia además de sus propiedades como barredor de radicales libres de oxígeno (RLO) es también un eficiente vehículo en la terapia farmacológica.

Dadas las condiciones actuales y el conocimiento previo en estudios anteriores, el grupo investigador se plantea investigar: ¿Qué efecto tiene el uso combinado de Dimetilsulfóxido y N-acetilcisteína en la protección renal de un modelo animal de isquemia-reperusión?

## JUSTIFICACIÓN

La insuficiencia renal aguda (IRA) es un síndrome clínico caracterizado por un deterioro de la función renal en un corto periodo de tiempo. Esta patología es una complicación que se encuentra en un 30% de los pacientes en las unidades de cuidados intensivos y es asociado con una alta mortalidad, entre un 25-90% en este grupo de pacientes.

En El Salvador, la IRA fue una de las primeras diez causas de muerte hospitalaria en el año 2008<sup>7</sup> y es una de las complicaciones más frecuentemente encontradas en el ámbito médico-quirúrgico. La mayoría de pacientes que sobreviven a eventos de IRA recuperan la función normal del riñón, sin embargo el 50% presentan un defecto funcional, requiriendo tratamientos invasivos como la hemodiálisis, o el trasplante renal donde el síndrome de IR también posee importancia.

La IRA es un síndrome de etiología multifactorial y se clasifica en pre renal, post renal e intrínseca<sup>8</sup>. Esta última se caracteriza principalmente por una disminución de la perfusión renal prolongada, situación observada en shock hemorrágico, shock séptico, arresto cardiaco, cirugías, etc.

El insulto renal no solo es producido por evento isquémico, posterior a éste en la mayoría de situaciones sobreviene el fenómeno de reperfusión. En la etapa de la hipoperfusión, la disponibilidad de glucógeno se agota y se inicia el daño isquémico que aumenta por la etapa subsiguiente de reperfusión en donde la producción de radicales libres y los cambios micro circulatorios multiplican el daño.<sup>9</sup>

Investigaciones anteriores utilizando un modelo de IR renal realizadas en la Universidad Dr. José Matías Delgado demostraron que la aplicación del DMSO posterior a una injuria isquémica evita la progresión de la necrosis tisular aguda, y disminuye el deterioro de la función renal durante el periodo de reperfusión<sup>5,6</sup>. El DMSO es un barredor de radicales libres, analgésico tópico, crioprotector, y ha sido utilizado como vehículo en la terapia farmacológica<sup>10</sup>.

Actualmente se están investigando distintas sustancias con características similares, con el fin de disminuir el daño provocado por el síndrome isquemia reperfusión. La N-acetilcisteína (NAC) se considera un agente que cumple dichas características, ya que gracias a sus propiedades antioxidantes protege el riñón ante una injuria por isquemia reperfusión. Nitescu realizó un estudio utilizando NAC en un modelo de IR renal en ratones donde concluyó que esta sustancia mejora la función renal, y reduce la inflamación intersticial<sup>11</sup>.

En esta investigación se evaluará el efecto de las sustancias antes mencionadas en el daño renal, utilizando un modelo animal de IR.

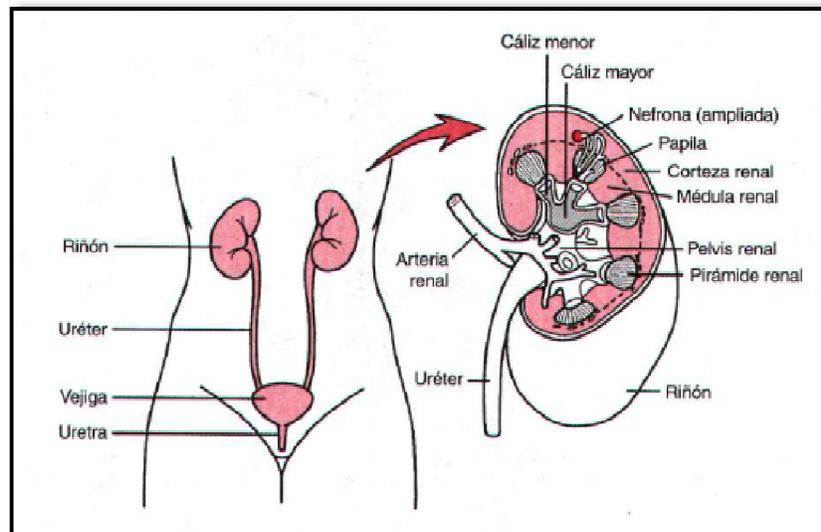
## MARCO TEÓRICO

La homeostasis es de vital importancia para la supervivencia, entra en juego el volumen de líquidos, composición y distribución de éstos en el cuerpo. La piel, las pérdidas intestinales y los pulmones forman parte de este proceso; sin embargo, la mayor responsabilidad recae en el riñón.

### Anatomía y Fisiología

El riñón es un órgano simétrico situado en la pared posterior del abdomen en el espacio conocido como retroperitoneo. Se estima que su peso aproximado es de 150 g, con una longitud de +-10 cm, +-5 cm ancho y +-2.5 cm de grosor. Posee un hilio renal situado en la cara medial, es aquí donde penetra la arteria renal y emergen la pelvis y la vena renal. La vena renal se encuentra anterior a la arteria renal, la cual a su vez esta delante de la pelvis renal.<sup>12</sup>

**Figura 1. Organización general de los riñones y del sistema urinario**



Guyton AC, Hall JE. *Textbook of Medical Physiology: With STUDENT CONSULT Online Access*. 11ª ed. Saunders; 2005.

Al practicar un corte longitudinal se observan dos regiones: corteza y medula, la última cuenta con numerosas masas de tejido llamadas pirámides renales cuyas bases emergen en el límite entre la corteza y medula terminando en la papila la cual penetra en el espacio de la pelvis renal. El borde externo de la pelvis se divide en los cálices mayores, los cuales se extienden por abajo y forman los cálices menores que recogen la orina de los túbulos de cada papila.<sup>4</sup>

## **Irrigación**

El flujo sanguíneo renal constituye aproximadamente el 22% del gasto cardiaco. La arteria renal, rama de la aorta abdominal, penetra en el riñón a través del hilio, ramificándose internamente convirtiendo al riñón en un órgano muy vascularizado. La vena renal se encarga del drenaje venoso desembocando en la vena cava inferior.<sup>13</sup>

## **Unidad funcional del riñón**

La nefrona es la unidad funcional del riñón, está formada por el glomérulo, capsula renal y túbulo renal. Cada riñón posee aproximadamente 1 millón de nefronas, cada una de ellas tiene la capacidad de producir orina. La mayor parte de ellas se encuentran en la zona cortical y sólo la porción conocida como asa de Henle se encuentra en la zona medular.

El glomérulo está conformado por capilares glomerulares ramificados y unidos entre ellos, recubiertos por dos capas de epitelio. El epitelio visceral incorpora y forma parte de la pared capilar separada de las células endoteliales por la membrana basal. El epitelio parietal delimita el espacio de Bowman, cavidad en la cual el primer producto del filtrado del plasma se colecta.<sup>14</sup>

Filtrar el plasma y eliminar sustancias de este filtrado según las necesidades del organismo es la principal función del riñón. De igual forma eliminar productos del metabolismo como urea, creatinina y ácido úrico corre por cuenta del riñón.

El inicio de la formación de orina se da en el glomérulo el cual filtra una gran cantidad de líquido a través de los capilares glomerulares hacia la cápsula de Bowman. La tasa

de filtración glomerular (TFG) depende del equilibrio de las fuerzas hidrostáticas y coloidosmóticas que actúan a través de la membrana capilar y el coeficiente de filtración capilar. En un adulto la TFG promedio es de 125mL/min lo que equivale a 180 L/día, la fracción de filtración normal es de 0.2 lo que significa que aproximadamente 20% del plasma que pasa por el riñón se filtra en los capilares glomerulares.<sup>13</sup>

## INSUFICIENCIA RENAL AGUDA

### Definición

La insuficiencia renal aguda (IRA) o falla renal aguda es un síndrome caracterizado por retención de productos nitrogenados, una disminución brusca del filtrado glomerular y alteraciones del equilibrio hidroelectrolítico y ácido básico. Se caracteriza por un aumento del 50% sobre el nivel basal de creatinina sérica o por una disminución del 50% en la depuración de creatinina<sup>8</sup>.

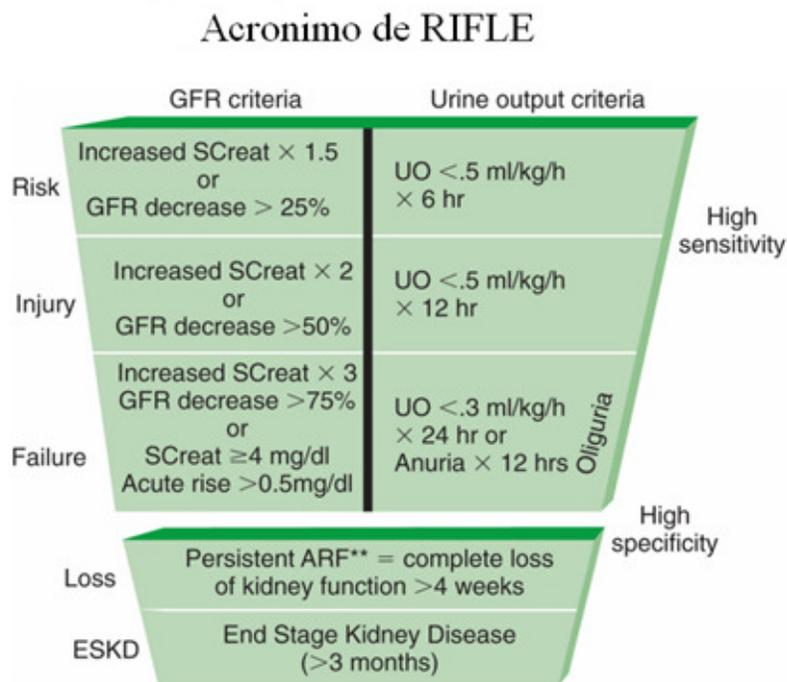
Esta entidad se produce en un 5 hasta un 30% de los ingresos hospitalarios y en unidades de cuidados intensivos respectivamente.<sup>8</sup> La IRA complica numerosas enfermedades, en su mayoría es reversible, sin embargo es una causa significativa de morbilidad y mortalidad intrahospitalaria. Este síndrome se puede presentar como un proceso de adaptación a una depleción del volumen e hipotensión, sin daño intrínseco renal; así como en respuesta a un daño renal por citotóxicos, isquemia o proceso inflamatorio que provoca un daño estructural y funcional del riñón; o por una obstrucción del flujo urinario. Por lo que se clasifica en tres categorías<sup>15</sup>:

1. IRA prerenal (en trastornos de hipoperfusión),
2. IRA renal o intrínseca (en enfermedades del parénquima renal)
3. IRA posrenal (en obstrucciones)

El consenso de la Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI)<sup>16,17</sup>, que involucró a intensivistas y nefrólogos publicó la definición de falla renal aguda con el acrónimo de RIFLE, por sus siglas en inglés: “*Risk*”, “*Injury*”, “*Failure*”, “*Loss*” y “*End Stage*”, clasificando a la IRA en tres estadios de severidad aumentada (riesgo, daño y falla renal) y dos estadios de resultado del daño (Pérdida y estadio final) (figura 2), esto se basa en cambios de creatinina sérica o gasto urinario de la condición inicial. Los estadios de severidad aumentada poseen una mayor sensibilidad y los estadios del resultado del daño poseen mayor especificidad.

Dicha iniciativa llevó a cabo un estudio retrospectivo en siete unidades de cuidados intensivos (UCI) de un centro de nivel terciario durante un periodo de un año. Se logró asociar mayor severidad de la enfermedad con una edad avanzada en los usuarios, de igual forma aquellos pacientes con una insuficiencia renal crónica pre-existente y una admisión hospitalaria no en UCI se asociaron a riesgo aumentado para la presencia de falla renal aguda y el máximo estadio según RIFLE clase F. Más de la mitad de los pacientes con clasificación RIFLE R progresaron a clase RIFLE I o F, y más de un tercio de paciente Clase I progresaron a Clase F. Se estimó que el tiempo promedio para progresar a la Clase I fue de 1 día y a la Clase F de 4 días. Dicho estudio concluyó que el incremento de la severidad de la falla renal aguda se asoció a un aumento en el tiempo del paciente en UCI así como un doble incremento de peligro para la mortalidad hospitalaria.<sup>18</sup>

## Crterios de RIFLE



**Figura 2. Criterios de RIFLE**

FG: Filtrado Glomerular

IRA: Insuficiencia Renal Aguda

ESKD (End Stage Kidney Disease): IRC (Insuficiencia Renal Estadio Terminal)

*Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P; Acute Dialysis Quality Initiative workgroup. 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. Crit Care. 2004 Aug;8(4):R204-12. Epub 2004 May 24.*

## Clasificación

La IRA prerenal es la entidad más frecuente y responde a un estado de hipo perfusión renal. Es importante recalcar que la integridad del tejido parenquimatoso renal está intacta gracias a la liberación de vasodilatadores y óxido nítrico, manteniendo así la función adecuada de estos órganos. La IRA prerenal representa la causa más común de daño renal<sup>2,19</sup>, ya que suele presentarse en escenarios clínicos caracterizados por hipovolemia, disminución de la función cardiaca, vasodilatación sistémica o vasoconstricción intrarrenal<sup>20</sup>; esto se puede observar en las pérdidas del volumen sanguíneo por infecciones gastrointestinales, quemaduras, hemorragias, entre otros, así como en escenarios de disminución de la perfusión renal en pacientes con insuficiencia cardiaca congestiva y choque<sup>19</sup>. Los estados de hipoperfusión severos, pueden ocasionar lesiones al parénquima renal y convertirse en una IRA intrínseca.

La IRA intrínseca acompaña numerosos trastornos que afectan el parénquima renal. Esta a su vez se divide en:

1. Enfermedad de los grandes vasos renales
2. Enfermedades de la micro circulación renal y los glomérulos
3. IRA isquémica y nefrotóxica
4. Enfermedades túbulo intersticiales

La IRA pos renal se observa comúnmente en aquellos casos de obstrucción del flujo urinario.

La IRA prerenal y la Necrosis Tubular aguda (NTA) isquémica son parte de un espectro de manifestaciones del fenómeno de hipoperfusión prerenal, observando IRA en casos de hipoperfusión leve a moderada y la NTA isquémica en los casos de exposición prolongada o severa<sup>21</sup>.

La NTA se observa con mayor frecuencia en casos de una cirugía mayor, traumas e hipotensión severa, quemaduras y sepsis graves. Es una de las complicaciones más prevalentes en las cirugías donde se debe de obstruir el flujo sanguíneo aórtico o renal por más de 60 minutos.

Morfológicamente la IRA causada por disminución del flujo sanguíneo y/o isquemia se observa principalmente en la médula externa y corteza del riñón. Estos daños celulares inducen estados de apoptosis, necrosis y otros tipos de disfunción celular<sup>21</sup>. Estos cambios se pueden observar bajo un microscopio de luz y se presentan a continuación.

**Tabla 1. Cambios microscópicos característicos de la Necrosis Tubular Aguda.**

• Hiperemia medular	• Células intratubulares
• Vacuolización citoplasmática	• Cilindros Hialinos
• Edema Intracelular	• Dilatación tubular
• Degeneracion hidrópica esponjosa	• Presencia de leucocitos
• Citoplasma epitelial basófilo	• Núcleos hipercromáticos
• Pérdida del borde en sepillo	• Cariorrexis
• Ruptura de membrana celular	• Cariolisis
• Adelgazamiento del epitelio	• Núcleos picnóticos
• Separación de membrana basal	• Prominencia del epitelio parietal de la cápsula de Bowman
• Tubulorrexis	

### Diagnóstico

Para establecer el diagnóstico se requiere de una historia clínica exhaustiva, un examen físico y exámenes de laboratorios. Como lo menciona la definición de IRA, existe un aumento de los niveles de creatinina y de nitrógeno ureico.

En la investigación se tomarán en cuenta los siguientes exámenes de laboratorio para identificar este síndrome:

1. Creatinina
2. Nitrógeno Ureico

## **Parámetros bioquímicos de la función renal**

### **Creatinina**

La creatinina es un compuesto orgánico derivado del metabolismo normal de degradación de los músculos. Es un componente liberado constantemente en el plasma filtrado en el glomérulo y no es reabsorbido o metabolizado por el riñón es una de sus características principales. En la IRA los niveles séricos de creatinina aumentan rápidamente debido al daño por isquemia renal. Los niveles normales en los hombre son 1 a 1.2 mg/dl y en mujeres de 0.8 a 1 mg/dl. Es el parámetro más usado para el diagnostico de esta enfermedad.<sup>18,22</sup>

### **Nitrógeno ureico (BUN)**

La concentración de urea normalmente se reporta como nitrógeno ureico sanguíneo, la urea es un compuesto nitrogenado que se produce en el ciclo hepático, los niveles de BUN son utilizados para evaluar la función renal basada en la capacidad de riñón de extraer desechos nitrogenados en sangre. Su sensibilidad no es tan buena ya que aproximadamente el 75% del tejido renal debe haber perdido su función para poder detectar valores altos en sangre. En animales sanos la urea es filtrada del plasma por el glomérulo renal aunque alguna urea es reabsorbida a la sangre en los túbulos renales, la mayoría se excreta en orina. La isquemia renal disminuye la función renal evitando que se remueva eficientemente la urea causando un aumento del nivel de BUN.<sup>23</sup> En la IRA los valores del nitrógeno ureico oscilan en valores superiores a lo normal de 10 y 20 mg/dl.

### **Relación creatinina: BUN**

La relación normal es de 1:10, dependiendo el daño esta relación se ve alterada o preservada como en el caso de la necrosis tubular aguda.

## SÍNDROME ISQUEMIA/REPERFUSIÓN (I/R)

Varios factores entran en juego al hablar del síndrome isquemia/reperfusión, estudios morfológicos han demostrado que el daño provocado por la isquemia en el segmento distal del túbulo proximal es irreversible, mientras que el segmento proximal sufre un daño reversible, esto aumenta la disminución de la filtración glomerular jugando un papel crucial en este síndrome <sup>24</sup>. Dentro de los factores más reconocidos como causantes de la lesión por I/R se encuentran: El daño tisular por radicales libres, aumento del ion calcio, activación del complemento y plaquetas, activación de citoquinas y liberación de óxido nítrico<sup>4 25</sup>. La sensibilidad y resistencia de cada órgano o tejido es distinta al hablar de pérdida parcial o total del flujo sanguíneo, las extremidades toman más tiempo que el cerebro<sup>26</sup>.

La literatura menciona dos tipos de isquemia: La isquemia caliente, que sucede con la interrupción del flujo sanguíneo pero la temperatura del órgano se mantiene al mismo nivel que tiene normalmente en el organismo, y la isquemia fría que se desarrolla cuando el órgano está fuera del organismo, a una temperatura de 4°C, esta posee la finalidad de enlentecer el metabolismo del órgano antes de ser implantado<sup>27</sup>. La investigación en el trasplante de órganos ha creado una serie de técnicas de preservación de los órganos *in situ* donde la temperatura se mantiene entre 12 - 14°C, esto se conoce como isquemia tibia <sup>27 26</sup>. Una serie de procesos se llevan a cabo desde la restricción del flujo sanguíneo y su posterior reperfusión, dichos procesos son decisivos en la viabilidad funcional de los órganos<sup>27</sup>.

### Fase Isquemia

Esta fase es donde se interrumpe el flujo sanguíneo bloqueando el aporte de oxígeno al órgano y el metabolismo celular sufre una transformación de aerobio en anaerobio. La presencia del metabolismo anaerobio y el aumento de ácido láctico provocan una acidosis metabólica produciendo disminución del nivel energético asociado a una alteración en el gradiente intermembrana celular alterando la homeostasis<sup>28</sup>. Durante este periodo se da el catabolismo del ATP que lleva a la acumulación de hipoxantina con generación de radicales libres de O<sub>2</sub> con la reentrada del O<sub>2</sub>, de igual forma hay

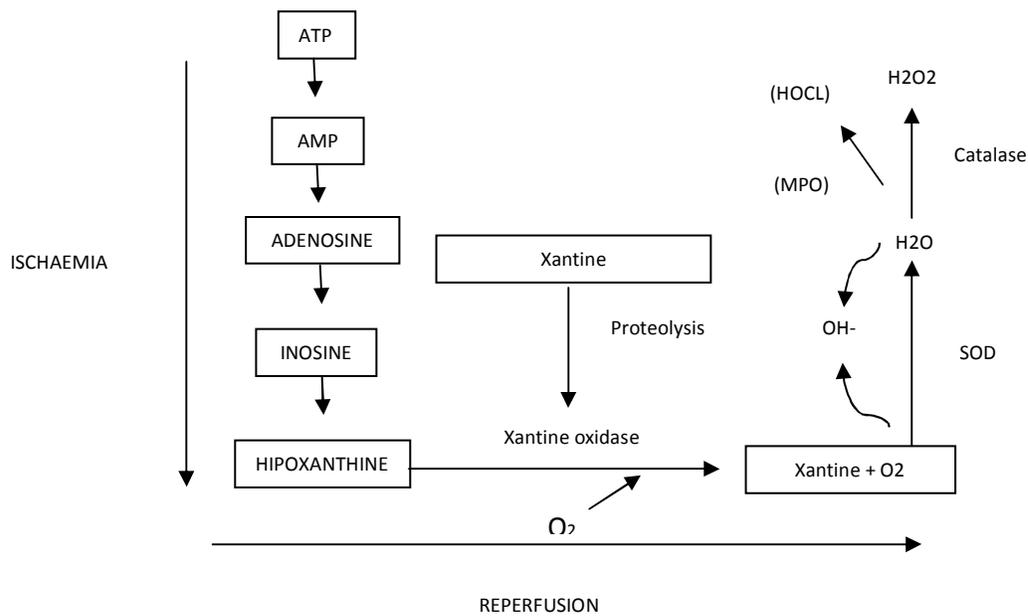
una promoción de la expresión de productos génicos pro inflamatorios y supresión de algunos productos genicos protectores. De esta forma la fase de isquemia produce un estado pro inflamatorio que aumenta la vulnerabilidad del tejido durante la reperfusión. La investigación ha comprobado que períodos de tiempo de isquemia superiores a 1 hora son capaces de producir alteraciones irreversibles en la estructura renal, y estas lesiones irreversibles empeoran ante un periodo de reperfusión<sup>28</sup>.

### **Fase reperfusión**

Durante la reperfusión se recupera el flujo sanguíneo aumentando el nivel energético, regresando a un ambiente aeróbico. Los mecanismos que se activan debido a este proceso conllevan a un mayor daño hasta culminar en muerte celular, comienza desde pocos minutos de iniciada la reperfusión hasta días después de la injuria.<sup>29</sup>

Al haber una reintroducción del O<sub>2</sub> se crea el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) y otros metabolitos reactivos del oxígeno, como el peróxido de hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a través de la superóxido dismutasa (SOD). El radical hidroxilo (OH<sup>-</sup>) puede producirse a partir de la reacción del superóxido y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia de iones Fe<sup>2+</sup> y Cu<sup>2+</sup> (Reacción de Haber-Weiss) o sólo por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia de Fe<sup>2+</sup> (Reacción de Fenton). Luego de la activación de los neutrófilos, la mieloperoxidasa (MPO) neutrofilica genera acido hipoclorhídrico (HOCl) (figura3)<sup>29</sup>.

**Figura 3. Fisiopatología del síndrome isquemia-reperfusión**



Extraído de Welbourn CRB, Goldman G, Paterson IS, et al. Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: Central role of the neutrophil. *British Journal of Surgery*. 1991;78(6):651-655.

### Radicales libres de oxígeno.

Un radical libre de oxígeno se considera a cualquier especie con capacidad de existencia independiente que posee uno o más electrones sin apareamiento, convirtiéndose en altamente reactiva.<sup>30</sup>

El complejo citocromo oxidasa situado en la mitocondria es uno de los responsables en la reducción del oxígeno en condiciones normales, al final de la cadena transportadora de electrones actúa aceptando los iones hidrógeno, formando agua<sup>26</sup>.

Los productos de la reducción del oxígeno son, superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radical hidroxilo ( $OH^-$ ). El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) es citotóxico debido a su moderada capacidad oxidativa. El radical hidroxilo se considera altamente reactivo e inestable así como potente oxidante. El superóxido es químicamente un buen reductor y una sustancia moderadamente reactiva y puede iniciar una reacción de radical libre.

La producción de radicales libres se considera en tres contextos: exógenos, fisiológicamente endógenos, y fisiopatológicamente endógenos<sup>24</sup>. La *producción exógena* se presenta en la radiación electromagnética (radiación ionizante) induciendo la formación intracelular de radicales. La *producción fisiológicamente endógena* se encuentra en la mitocondria la cual reduce cierta cantidad de oxígeno en presencia de NADH (dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido) creando el superóxido. La *producción fisiopatológicamente endógena* se enfoca en el sistema xantina oxidasa. La isquemia produce una depleción de la adenosina trifosfato (ATP)<sup>31</sup> provocando dos situaciones: 1) Hay un aumento en la concentración de hipoxantina la cual es un producto del metabolismo del ATP<sup>32</sup>; 2) Hay una disfunción en las bombas de iones situadas en la membrana dependientes de ATP con su consecuente incremento de los niveles de calcio en la mitocondria y citosol<sup>33</sup>. La hipoxantina normalmente es oxidada en ácido úrico por la enzima xantina deshidrogenada, aunque también puede ser oxidada por la xantina oxidasa, la cual es una isoforma de la xantina deshidrogenasa que transfiere un electrón al oxígeno produciendo el superóxido<sup>34</sup>. La conversión de deshidrogenasa a oxidasa está bajo la influencia de una proteasa dependiente de calcio, ésta es activada por varios factores, dentro de ellos se encuentra la isquemia, factor de necrosis tumoral, interleucina 1 y 3, así como el quinto componente del sistema complemento, entre otros<sup>35 36</sup>. La duración de isquemia requerida para que se de esta conversión varía de órgano a órgano, en el riñón se estima alrededor de 30 minutos<sup>37</sup>.

Se ha comprobado que los radicales libres de oxígeno a altas concentraciones conllevan a daño oxidativo sobre lípidos, proteínas y los ácidos nucleicos<sup>27</sup>. La lipoperoxidación de las membranas celulares aumenta la liberación de sustancias del citosol, incrementando la respuesta inflamatoria local. Los radicales libres de oxígeno actúan sobre la vía intrínseca de apoptosis así como barren el óxido nítrico, elevándose en la fase de isquemia, por lo que se les atribuye funciones dañinas durante la fase de reperfusión<sup>38</sup>.

## **DIMETILSULFÓXIDO (DMSO)**

El papel de las sustancias antioxidantes ha sido y continuará siendo estudiado por muchos años más, debido a que sus propiedades pueden reducir la lesión ocasionada por los radicales libres derivados de oxígeno.

Los antioxidantes se clasifican en endógenos y exógenos, además por su sitio de acción en intracelular, membrana y extracelular. Presentan diferentes mecanismo de acción que los divide en: inhibidores de la producción de radicales libres, barredores de los radicales libres, inhibidores de los neutrófilos, inhibidores de la peroxidación y condicionantes de la situación oxidativa y energética pre isquémica.<sup>30</sup>

El Dimetilsulfóxido (DMSO) se obtiene del procesamiento de la pulpa de Madera en la fabricación de papel, fue descubierto en 1866 por Saytzeff para uso como solvente orgánico y criopreservante. Pero fue hasta el año 1961 que el Dr. Jacob utilizó esta sustancia en el campo médico. Descubrió que el DMSO atraviesa rápidamente la epidermis y las membranas celulares sin ocasionarles daño, es por esto que se ha utilizado como acarreador de medicamentos en dicha barrera.

Este fármaco es usado en diversos campos de la medicina por sus propiedades antiinflamatorias, analgésicas, bacteriostático, protector de lesión isquémica<sup>30</sup>, sin embargo solamente tiene la aprobación de Food and Drug Administration (FDA) para uso de preservación de órganos en trasplante y en cistitis intersticial. Durante los primeros años experimentales con este fármaco, surgió una muerte por causa desconocida, sin embargo no se han reportado otras muertes hasta la fecha. Su principal efecto adverso es halitosis con olor a ajo que se produce a pocos minutos de su uso, no importando su vía de administración. Además se han reportado otros efectos adversos sistémicos dependientes del uso del DMSO, tales como: náuseas, vómito, diarrea, hemólisis severa; reacciones anafilácticas manifestadas como rash, eritema y ocasionalmente broncoespasmo; falla renal, hipertensión diastólica y sistólica, bradicardia, bloqueo cardiaco, y raramente edema pulmonar o arresto cardiaco<sup>39</sup>.

Se han documentado diversas acciones farmacológicas del Dimetilsulfóxido: se ha usado para tratar úlceras diabéticas, amiloidosis, gastritis erosiva, prevención de isquemia en colgajos quirúrgicos, sin embargo hay deficiencia en un diseño adecuado de los ensayos clínicos.<sup>40</sup>

### **Farmacocinética**

El DMSO posee una vida media de 12 a 15 horas, este componente se produce de la oxidación a dimetilsulfona, y al reducirse a dimetilsulfuro. La dimetilsulfona y el dimetilsulfuro son eliminados por la orina y por las heces. El dimetilsulfuro es excretado por la piel y las vías aéreas produciendo el olor característico a ajo. Se ha visto que al administrar el DMSO por vía oral, se produce una excreción completa en 120 horas.

A continuación se detallaran unos efectos del Dimetilsulfóxido.

### **El DMSO como Antiinflamatorio**

El Dimetilsulfóxido reduce la inflamación por diversos mecanismos. Con su poder antioxidante reduce los radicales libres producidos durante una lesión. Ese efecto ha sido investigado en numerosos estudios y se ha concluido que este fármaco puede ser utilizado con este fin en todos los casos de inflamación excepto las causas de infección o tumoral.<sup>41</sup>

### **DMSO en casos de trauma del sistema nervioso central**

El Dr. de la Torre 1971, ha experimentado en animales el uso del DMSO en casos de lesiones en el sistema nervioso central, comprobando que este fármaco disminuye significativamente la presión intracraneal, estabiliza la presión arterial, mejora la respiración y aumenta el flujo urinario y el flujo sanguíneo hacia la medula espinal. Por lo que se empezó a utilizar en humanos que presentaban trauma craneoencefálico evidenciando que realmente disminuye la presión intracraneana.<sup>41</sup>

### **DMSO protector en lesión isquémica**

El Dr. De la Torre ha realizado diversas investigaciones sobre el efecto del DMSO en las lesiones isquémica concluyendo que este fármaco logra antagonizar sustancias

vaso activas liberadas por las plaquetas. El DMSO bloquea los receptores de prostaglandinas responsables de la agregación plaquetaria y vasoconstricción.<sup>42</sup>

Además se ha descrito que los neutrófilos participan grandemente en la lesión provocada por isquemia reperusión, aumentando la síntesis de radicales libres de oxígeno y de enzimas proteolíticas exacerbando la lesión anóxica al ocluir el vaso sanguíneo. El DMSO protege la integridad de la membrana celular reduciendo la adhesión plaquetaria por el colágeno, protegiendo el endotelio vascular y facilitando la liberación de prostaglandinas. Además el uso de antioxidantes, como el DMSO, previene la acumulación de neutrófilos en el tejido reperfundido protegiendo así del daño durante el síndrome isquemia reperusión.<sup>42</sup>

## **N-ACETILCISTEÍNA (NAC)**

El N-acetilcisteína (NAC) es un componente de bajo peso molecular que se utiliza para sustituir el glutatión. Es el precursor de los aminoácidos L-cisteína y glutatión<sup>43</sup>.

Los primeros usos de NAC fueron como agente mucolítico en las enfermedades respiratorias crónicas y como antídoto de sobredosis con acetaminofén. Recientemente se está realizando estudios en animales demostrando el poderoso efecto antioxidante del N-acetilcisteína en casos de enfermedades cardiacas, infección por VIH, cáncer, etc<sup>44</sup>.

Se han realizado estudios investigando la utilidad del N-acetilcisteína en el fenómeno de isquemia y reperfusión renal. Se comprobó que esta sustancia, mejoraba la función renal posterior a esta lesión, mejorando los niveles de creatinina sérica en 24 horas. Nitescu y col. en el 2006, investigaron un modelo de isquemia/reperfusión renal en ratas, administrando 200 mg/kg intraperitoneal de NAC. Se demostró que NAC mejora la función renal, reduce la inflamación intersticial y atenúa el estrés oxidativo provocado por este fenómeno<sup>11</sup>.

### **Química y farmacocinética**

El NAC contiene un componente sulfidrilo que posterior a la ingesta oral, es rápidamente absorbido en diferentes tejidos. Este elemento es metabolizado en el hígado e intestino alcanzando niveles plasmáticos picos en una hora y desapareciendo del contenido plasmático en menos de 12 horas posterior a su ingesta. Presenta una biodisponibilidad baja (4%), sin embargo aparenta ser clínicamente efectivo. La actividad biológica del NAC es atribuido al grupo sulfidrilo, pero el efecto antioxidante está a cargo del grupo amino.<sup>43</sup>

### **Mecanismo de acción**

El aminoácido N-acetilcisteína reduce la cistina extracelular hasta cisteína, además de actuar de forma intracelular como fuente de grupo sulfidrilo. Por medio de este último el NAC estimula la síntesis de glutatión ayudando la actividad de la glutatión S-

transferasa, la cual promueve la desintoxicación hepática inhibiendo la biotransformación xenobiótica. Además es un potente “scavenger” de radicales libres de oxígeno, lo que le confiere su acción de antioxidante. El efecto mucolítico resulta por el grupo sulfidrilo que interactúa con los puentes de sulfuros en las mucoproteínas produciendo una menor viscosidad del moco. De igual forma la NAC actúa como expectorante estimulando la acción ciliar y el reflejo vagal gastro pulmonar limpiando el moco de las vías aéreas. Además estudios han demostrado beneficios en el campo cardiaco revelando que NAC disminuye la homocisteína y los niveles de lipoproteínas mediante la disociación de los enlaces disulfúricos, protegiendo así contra los daños del síndrome de isquemia reperfusión causado por el sistema de la vía del glutatión.

### **Indicaciones clínicas<sup>43</sup>**

#### **Enfermedades respiratorias**

Diversos estudios han investigado la efectividad del NAC como medio terapéutico para diversas enfermedades respiratorias. Se ha demostrado su uso como ayudante en la expectoración y disminuye la severidad de la tos.

#### **Infección por el virus de inmunodeficiencia humana**

Las personas con el virus de inmunodeficiencia humana presentan un nivel bajo de glutatión y cisteína, lo que ha promovido investigaciones con NAC en estos pacientes. Además estudios han demostrado que NAC aumenta la inmunidad celular estimulando la formación de colonias de células T. Es necesario promover la investigación en este campo por su aparente prevención en la progresión del síndrome de inmunodeficiencia humana.

#### **Cáncer y quimioprolaxis**

Estudios han demostrado que NAC puede ser un agente quimioproláctico en el tratamiento de ciertos cánceres (cáncer de pulmón, de mama, hepático y de cuello). Se ha observado en estudio “in vitro” que NAC posee característica antimutagénica y anticarcinogénica.

## **Sobredosis de acetaminofén**

El uso conocido del NAC es como antídoto en la intoxicación por acetaminofén, debido a que previene la toxicidad hepática si es administrado en las primeras 24 horas del evento. El acetaminofén produce un metabolito que disminuye el glutatión en los hepatocitos provocando un daño hepatocelular hasta la muerte, por lo que la administración temprana de NAC reduce estas lesiones.

## **Efectos adversos y seguridad**

NAC es usualmente bien tolerado y seguro aún administrando altas dosis. Los efectos adversos más frecuentes son: alteraciones gastrointestinales, náuseas y vómitos, por lo que la vía oral es contraindicado en úlceras pépticas activas. Otros efectos son reacciones anafilácticas causadas por la liberación de histamina provocando rash, angioedema, prurito, taquicardia y alteraciones en la presión arterial. NAC utilizado por vía endovenosa causa raramente reacciones alérgicas. De igual forma se ha comprobado resultar negativo al test de Ames, es decir que no ha sido comprobado ser un fármaco carcinogénico.

## **Dosis**

Las dosis utilizadas de NAC como agente mucolítico y en la mayoría de indicaciones es entre 600 y 1500 mg diarios divididos en 3 dosis. En los casos de pacientes con problemas cardíacos o cáncer, las dosis son más altas, de a 4 gramos al día. En la sobredosis de acetaminofén es preferible administrar NAC en las primeras 8 a 10 horas del evento, se utiliza una dosis de carga de 140 mg/kg y 17 dosis subsecuentes de 70 mg/kg cada 4 horas.

## MUERTE CELULAR

La muerte celular puede ocurrir por dos vías: Apoptosis o necrosis. Algunas clasificaciones incluyen la autofagia, proceso por el cual la célula genera energía y metabolitos por medio de la digestión de sus propios organelos en caso de privación de nutrientes, al prolongarse este proceso la célula muere<sup>45</sup>. La apoptosis es un mecanismo de eliminación Celular, muchas de ellas son indeseables, o percibidas como tal, sin producir reacción inflamatoria. Resulta de la activación de un sistema intracelular de autodestrucción inducido por varios estímulos y mensajes externos o una escasez de factores que soporten la vida celular<sup>46</sup>.

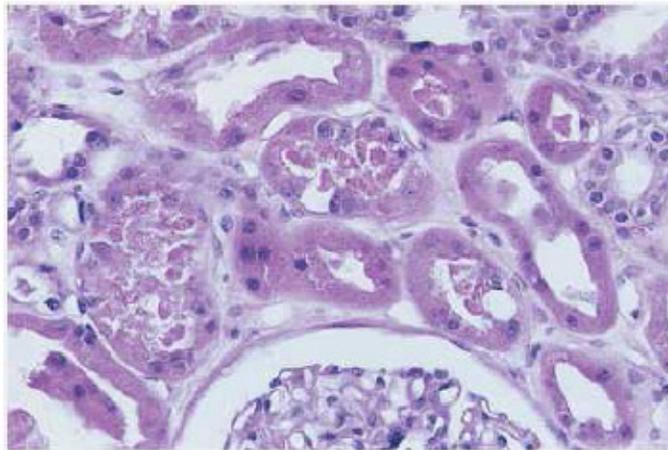
La apoptosis resulta de la activación de una vía extrínseca y/o una vía intrínseca. La vía extrínseca está mediada por receptores que se distribuyen en la membrana celular, los cuales son activados por factores de inflamación como citocinas y el factor de necrosis tumoral. Esto conlleva a la activación de pro caspasas 3, 6 y 7<sup>47</sup>. La vía intrínseca está mediada por receptores en la membrana mitocondrial, los cuales regulan la transcripción de proteínas Bcl que pueden ser anti o proapoptóticas, alterando la permeabilidad de la membrana mitocondrial. Factores relacionados con estrés celular como ADN dañado, hipoxia, radicales libres de oxígeno, entre otros, aumentan la expresión de proteínas proapoptóticas, resultando en un aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial, que conlleva a un escape de citocromo C, el cual inicia una serie de reacciones que culmina en la activación de las caspasas 3, 6, 7 y 9<sup>46 48</sup>.

## HISTOPATOLOGÍA DE LA ISQUEMIA RENAL AGUDA

La histopatología renal se ve afectada de acuerdo a la severidad y evolución de la lesión del riñón. Los cambios pueden darse tempranamente y se presentan como alteraciones mínimas a edema celular severo, hasta alcanzar una necrosis celular con denudación de la membrana basal<sup>49</sup>. El daño isquémico es más notorio en los segmentos S3 de los túbulos proximales y de los segmentos medulares de la porción gruesa del asa de Henle. Estos segmentos tubulares son sensibles a la isquemia debido a altas tasas de transporte de solutos dependiente de ATP, y a su ubicación en la médula externa, encontrando presiones parciales de oxígeno bajas aun en condiciones basales. Al ocurrir la isquemia se produce una disminución del ATP, inhibición del transporte activo de sodio, disrupción del citoesqueleto, pérdida de la polaridad celular, adhesión entre células y entre esta y la matriz así como formación de radicales libres de oxígeno<sup>8</sup>. A medida que la lesión renal progresa se pueden observar cambios de regeneración en los túbulos. Los indicadores histológicos son: proliferación celular, tal como mitosis, núcleos hipercromáticos, y una relación alta núcleo-citoplasma.

Los túbulos lesionados se encuentran separados por un intersticio edematoso. Puede observarse un infiltrado inflamatorio leve compuesto por linfocitos, macrófagos y neutrófilos, en raras ocasiones pueden observarse eosinófilos. La muerte celular que se da durante el evento de isquemia-reperfusión ocurre a través de apoptosis o necrosis coagulativa, lo cual se ha documentado en modelos animales y en la práctica clínica de la enfermedad renal. Los cambios observados son condensación del núcleo y citoplasma. Los cuerpos apoptóticos, que se representan como fragmentos nucleares unidos por membrana, pueden observarse en células tubulares adyacentes, ya que han fagocitado los restos celulares. La necrosis coagulativa se caracteriza por citoplasma eosinófilo y picnosis, con eventual desaparición del núcleo<sup>49</sup> (Figura 4).

**Figura 4. Necrosis coagulativa focal de células epiteliales focales, con detritos en lumen tubular**

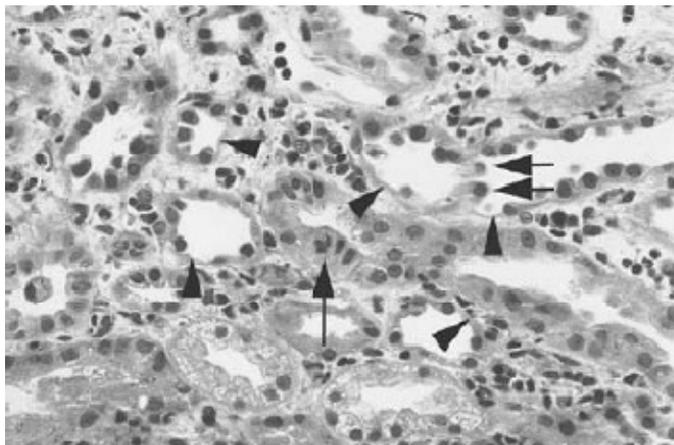


Fuente: Hepinstall's Pathology of the Kidney, 6th Edition, capítulo 24, pag. 1154.

Las pediculaciones apicales pueden ser el único hallazgo que se puede observar en las formas leves, en cambio en las formas más severas también se observa necrosis focal con ruptura de la membrana basal tubular<sup>50</sup>.

La inflamación intersticial se debe a una respuesta a la lesión tubular, habitualmente el infiltrado es mononuclear y focalizado, ocasionalmente asociado a edema intersticial, el cual puede ser severo<sup>49</sup> (Figura 5).

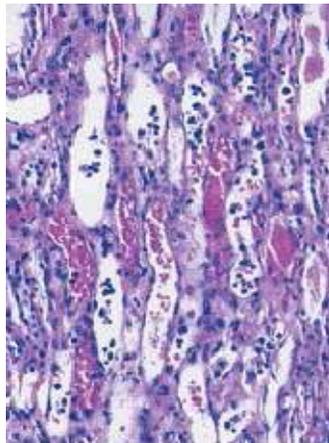
**Figura 5. Áreas de pérdida de células tubulares aisladas en un riñón con lesión isquémica.**



*Las células lesionadas se desprenden, dejando áreas tubulares con membrana basal cubiertas con una fina capa de citoplasma de células adyacentes (puntas de flechas). Algunas células desprendidas pueden observarse en el lumen tubular (flechas cortas). Una célula mitótica se puede observar en una célula tubular (flecha larga). Además se observa edema intersticial y células inflamatorias que se observan en los alrededores de los capilares.*

La acumulación de células nucleadas en la vasa recta de la médula externa es un hallazgo interesante en el caso de falla renal aguda. Se considera un hallazgo común y que en algunas ocasiones es la única clave histológica para diagnosticar isquemia renal transitoria<sup>49</sup>.

**Figura 6. Congestión de eritrocitos y células nucleadas en vasa recta dilatada de la médula externa en un riñón con lesión isquémica.**



Fuente: Hepinstall's Pathology of the Kidney, 6th Edition, capítulo 24, pag. 1156.

La naturaleza de las células cambia de acuerdo a la progresión de la Isquemia renal transitoria en sus tres diferentes fases. Los linfocitos predominan en las primeras 24 a 48 horas, posteriormente se observan células inmaduras de la serie mieloide y eventualmente células rojas nucleadas y precursores de células rojas. El aumento hemodinámico que ocurre en la isquemia renal transitoria provoca una acumulación de células nucleadas de mayor tamaño, de igual forma hay un aumento del flujo sanguíneo de los glomérulos superficiales y de la corteza medial hasta el aparato yuxtglomerular, lo que resulta en una mayor irrigación de nefronas, esto provoca que aumente el flujo en la vasa recta<sup>49</sup>.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

- Determinar la actividad protectora de la asociación DMSO - NAC Vs DMSO como sustancia única en el tejido renal sometido a isquemia reperfusión.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Medir la actividad protectora de la asociación DMSO – NAC Vs DMSO como sustancia única en el tejido renal sometido a isquemia reperfusión mediante la evaluación de parámetros bioquímicos indicadores de la función renal.
- Medir la actividad protectora de la asociación DMSO – NAC Vs DMSO como sustancia única en el tejido renal sometido a isquemia reperfusión mediante la evaluación histológica de parámetros de apoptosis y necrosis

## **METODOLOGÍA.**

### **Tipo y Diseño General del Estudio.**

Modelo animal de isquemia reperusión renal en el que se midió el efecto protector de DMSO como sustancia única Vs la asociación de DMSO-NAC.

### **Diseño Experimental.**

En este estudio se utilizaron 40 conejos machos de raza Nueva Zelanda, con peso entre  $2.5 \text{ kg} \pm 1 \text{ kg}$ . Siguiendo los lineamientos del Consejo Canadiense en el año 2007. Cada conejo permaneció en jaulas aisladas administrándosele concentrado de alimento para conejo y agua ad libitum.

Se dividió la población de conejos de forma aleatoria en los siguientes cuatro grupos:

- Grupo A: (Grupo sham o de intervención simulada) conformado por 10 unidades experimentales a las que se anestesió y realizó nefrectomía unilateral sin inducir isquemia ni reperusión y a los cuales se administró líquidos EV con el fin de eliminar confundidores y establecer diferencias entre el grupo isquemia reperusión/SSN y grupo sham.
- Grupo B: Grupo isquemia-reperusión/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 reperusión por 8 horas, y administración de SSN durante la fase de reperusión
- Grupo C: Grupo isquemia-reperusión/DMSO-NAC 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 reperusión por 8 horas, administrando como fármaco de reperusión la asociación DMSO-NAC
- Grupo D: Grupo isquemia-reperusión/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 reperfusión por 8 horas, administrando como fármaco de reperfusión DMSO.

Antes y al finalizar el procedimiento quirúrgico se extrajeron muestras de sangre para cuantificar la creatinina sérica y urea. Una vez finalizado el periodo de reperfusión cada unidad experimental fue sometida a eutanasia para la extracción de especímenes histopatológicos de riñón.

### **Preparación Pre quirúrgica.**

Se evaluó y se pesó cada animal para corroborar su estado general, posterior a esto se preparó para el procedimiento (rasurando el área quirúrgica).

### **Preparación del área quirúrgica.**

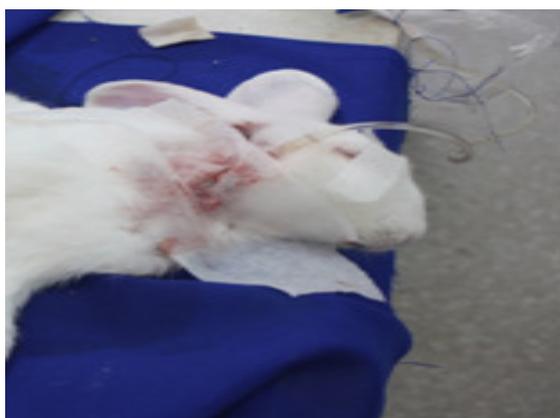
Previa asepsia y antisepsia con Diguconato de Clorhexidina al 20%, se colocó campos quirúrgicos estériles en el área de trabajo, luego se aplicó de forma subcutánea Lidocaína al 2% en las áreas donde se realizó la incisión quirúrgica.

### **Pre medicación y anestesia**

Se utilizó inyecciones de Maleato de Acepromacina (20mg/ml) 0.2 mg/kg y Ketamina (10mg/ml) 30mg/kg como dosis inicial. Luego se utilizó la mitad de la dosis inicial de forma endovenosa cada 15 a 30 minutos para el mantenimiento, según la necesidad. Esta fue basada en parámetros de evaluación del plano anestésico, específicos en el tono mandibular y el reflejo de retirada en la extremidad anterior y posterior al estímulo doloroso.

### **Acceso venoso**

El área submandibular derecha fue disecada en planos hasta ubicar la vena yugular común para canalizarla con Venocat flexible #18G y se administró la Solución Fisiológica 0.9% a un volumen de 8cc/kg/hora, los anestésicos, DMSO/NAC y finalmente el cloruro de potasio para la realización de la eutanasia de la entidad experimental.



**Fotografía 1, 2 y 3. Cateterización de vena yugular derecho y administración de líquidos endovenosos**

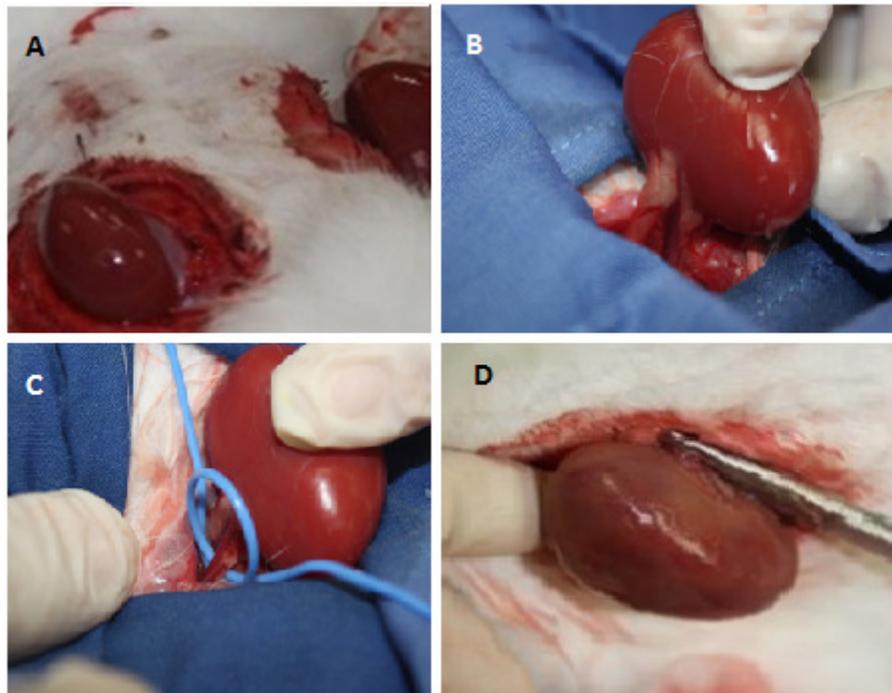
### **Monitorización de las constantes vitales**

Durante el proceso experimental se midieron las siguientes variables fisiológicas: frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria y temperatura corporal a nivel rectal.

### **Procedimiento Quirúrgico**

Se colocó la unidad experimental en posición en decúbito prono para realizarle una incisión paravertebral bilateral 2 cm bajo los rebordes costales. Se disecó por planos hasta ubicar ambos riñones, localizando sus hilios respectivos para realizar nefrectomía unilateral derecha. Posteriormente se disecó la arteria renal izquierda para interrumpir el flujo sanguíneo utilizando clampaje atraumático durante 30 minutos y se introdujo el riñón en su cavidad abdominal. Al finalizar el periodo de isquemia, al grupo B se le administro un bolus de SSN 0.9%, al grupo C se aplicó DMSO al 40% a una dosis de 3.8ml/kg acompañado de N-acetilcisteína a dosis de 20mg/kg y

al grupo D se aplicó DMSO 40% a una dosis de 3.8ml/kg. Posterior al efecto isquémico, se restituyó el flujo sanguíneo, previa verificación de la permeabilidad arterial mediante la evaluación de la coloración renal pre isquémica. En caso de no retornar a su coloración normal, se descartó la unidad experimental. Al terminar todo el proceso de isquemia-reperfusión, se cerró la cavidad abdominal y se reperfundió durante 8 horas. Al finalizar la reperfusión se abrió nuevamente la cavidad, luego se realizó nefrectomía y se procedió a la eutanasia de la unidad experimental.



**Fotografías 4. Secuencia de eventos para la instauración de isquemia-reperfusión A) Se visualizan ambos riñones sanos B) Se localizan y disecan la arteria y vena renal C) Se utiliza clamp atraumático en arteria renal D) Riñones 8 horas posterior a la reperfusión previo a nefrectomía.**

## **Toma de muestras**

### **Muestras sanguíneas**

Se extrajo 1 cc de sangre proveniente de la vena marginal de la oreja<sup>51</sup>, con el fin de no causar alteraciones hemodinámicas en las unidades experimentales. Se realizó una toma de muestra sanguínea en dos ocasiones:

1ª toma: Previo al inicio del procedimiento quirúrgico, estado basal.

2ª toma: Ocho horas posteriores a la reperfusión de las arterias renales, previo a la realización de la eutanasia.

Cada muestra se procesó en equipo Reflotron automatizado para el análisis de química sanguínea, se analizaron creatinina. Los resultados fueron categorizados según la clasificación de RIFLE mencionada anteriormente.

### **Muestras anatomopatológicas**

Posterior a la nefrectomía izquierda se realizó una incisión coronal en la línea media del riñón, se colocó papel filtro y se introdujo en frascos individuales con formalina buferizada para su preservación hasta su fijación en parafina. Posteriormente se realizó un análisis histopatológico con la tinción con hematoxilina-eosina, siguiendo los estándares internacionales.

El análisis histopatológico de los riñones fue realizado por un patólogo quien desconocía el grupo perteneciente de cada muestra. Se utilizó un microscopio óptico binocular para analizar cada lámina en 10 campos ecofuertes. Los hallazgos fueron reportados de forma homogénea, categorizando el grado de alteración de cada variable como ausente, leve, moderado o severo.

### **Eutanasia**

Al finalizar todo el procedimiento quirúrgico se realizó la eutanasia de cada entidad experimental por medio de la administración de Cloruro de Potasio a dosis de 2 mmol/kg por vía endovenosa, siguiendo las normas de la American Veterinary Medical Association.

### **Universo, Selección y Tamaño de la Muestra**

El tamaño de la muestra fue un total de 40 conejos repartidos en los siguientes 4 grupos:

- 10 conejos en el grupo Sham,
- 10 conejos en el grupo de isquemia-reperfusión-SSN
- 10 conejos en el grupo de isquemia-reperfusión-DMSO
- 10 conejos en el grupo de isquemia-reperfusión-DMSO/NAC

### **Aleatorización de la muestra**

Se seleccionaron las unidades experimentales asignándoles y marcando con un número a cada conejo. Los números fueron colocados en una caja donde se extraerán uno a uno, para luego ser colocado en cada grupo desde el grupo sham hasta el grupo de isquemia-reperfusión-DMSO/NAC.

### **Criterios de inclusión y de exclusión**

Criterios de inclusión:

- Conejo macho de la raza Nueva Zelanda
- Conejos con un peso de 2.5kg  $\pm$  1 kg
- Conejos en aparente buen estado de salud

Criterios de exclusión:

- Conejos con anomalías estructurales evidentes.
- Conejos con anomalías renales macroscópicas
- Conejos que fallezcan posterior a la inducción anestésica, previa finalización del procedimiento quirúrgico, o previa finalización de las 8 horas de reperfusión estipuladas.

**Tabla 2. Definiciones operacionales**

Nombre	Tipo variable	Definición	Unidades
Niveles séricos de creatinina	Cuantitativa	Prueba química sanguínea, utilizada como marcador de función renal (valor normal en conejo: 0.5-2.5mg/dl)	mg/dl
Histología renal	Cualitativa	Evaluación del grado de alteración de la estructura histopatológica del tejido renal. Dependiendo su: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Extensión del daño</li> <li>• Hiperemia medular</li> <li>• Presencia de leucocitos</li> <li>• Dilatación tubular</li> <li>• Presencia de cuerpos hialinos</li> <li>• Adelgazamiento del epitelio tubular</li> <li>• Presencia de células intratubulares</li> <li>• Tubulorrexis</li> <li>• Cariólisis</li> <li>• Alteraciones de la membrana basal.</li> <li>• Edema celular</li> <li>• Vacuolización</li> <li>• Destrucción celular.</li> </ul>	Ausente: 0%  Leve: 1-10%  Moderado: 11-24%  Severo: 25-49%  Muy severo: 50%
RIFLE	Cuantitativa	Clasificación RIFLE <ul style="list-style-type: none"> <li>• "Risk"</li> <li>• "Injury"</li> <li>• "Failure"</li> </ul>	Incremento de creatinina basal: "Risk": aumento de Cr 1.5 "Injury": aumento de Cr 2 "Failure" aumento de Cr 3

## Procedimiento para la recolección de la información

### Análisis estadístico

Los valores obtenidos durante las sesiones experimentales fueron tabulados en el programa Microsoft Excel 2007, luego se analizaron en el programa estadístico Graph Pad Prism v5.0 para Windows. Cada variable fue explorada para determinar su distribución mediante el test D'Agostino-Pearson para definir el tratamiento con estadística paramétrica o no paramétrica.

### **Variables Paramétricas**

Estas variables fueron analizadas con la prueba One-way Anova para determinar diferencias entre grupos, y post test de Dunnet para encontrar diferencias con respecto al grupo control.

### **Variables no Paramétricas**

Las variables no paramétricas fueron analizadas mediante la prueba de Kruskal Wallis y test de comparación múltiple de Dunn para determinar la significancia entre los 4 grupos.

### **Procedimientos para considerar los aspectos éticos**

Se consideraron los lineamientos del Consejo Canadiense para el cuidado animal del 2007 para verificar el bienestar animal de cada unidad experimental. Se mantuvo cada animal en jaula aislada administrándoles alimentación especial y agua. Al finalizar el procedimiento se realizó eutanasia por medio de administración de Cloruro de Potasio por vía endovenosa a dosis de 2 mmol/kg, siguiendo las normas de la American Veterinary Medical Association.

## 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 la prueba estadística paramétrica One- way Anova con post test de Dunnet encontrando una diferencia significativa de  $p = 0.0048$ . La creatinina post reperfusión mostró una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos Sham y DMSO+NAC  $p = 0.0004$ .

La tabla 3 muestra los valores mínimos, máximos y media de creatinina obtenida antes y después del tratamiento.

**Tabla 3. Comportamiento de la creatinina basal y final Valores medios (min-max) (mg/dl)**

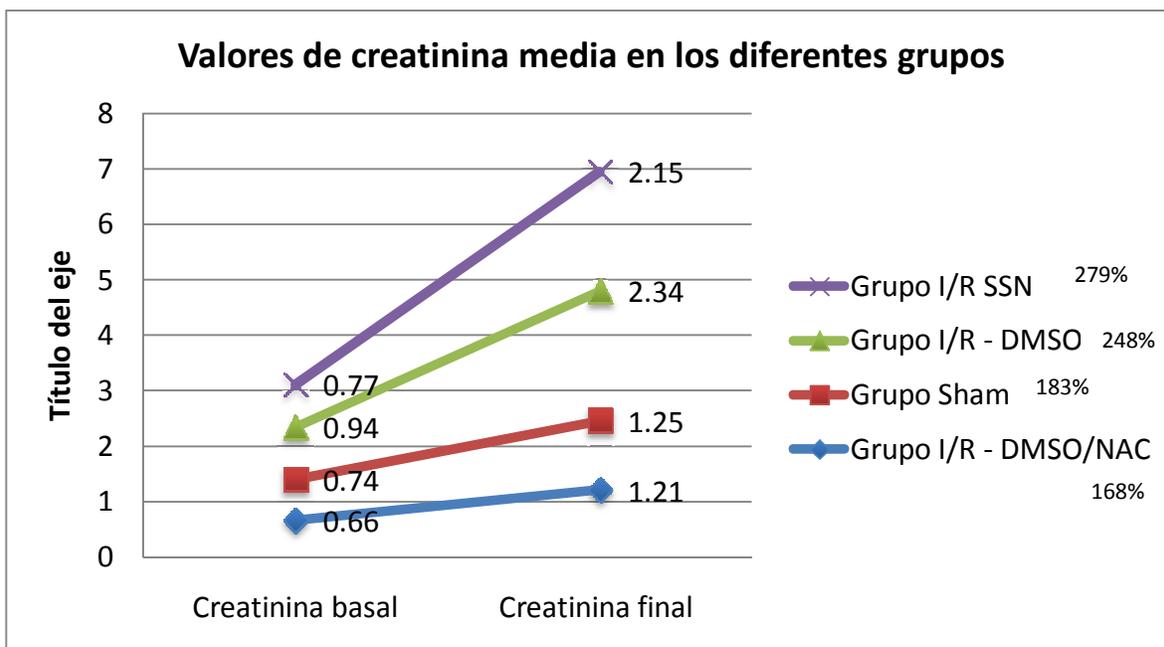
		Grupo I/RSSN	Grupo I/R - DMSO	Grupo Sham	Grupo I/R - DMSO/NAC	One way Anova P
<b>Basal</b>	Creatinina	0.77	0.94	0.74	0.66	0.0048
	(min - max)	(0.5-1.1)	(0.74-1.10)	(0.5-1.10)	(0.62-0.70)	
<b>Final</b>	Creatinina	2.15	2.34	1.25	1.21	0.0004
	(min - max)	(1.12-3.89)	(1.8-3.2)	(0.48-1.87)	(0.5-2.39)	

Grupo I/R+SSN: Isquemia Reperfusión + Solución Salina Normal

Grupo I/R+DMSO: Isquemia Reperfusión + Dimetilsulfóxido

Grupo I/R+DMSO: Isquemia Reperfusión + Dimetilsulfóxido + N-Acetil cisteína

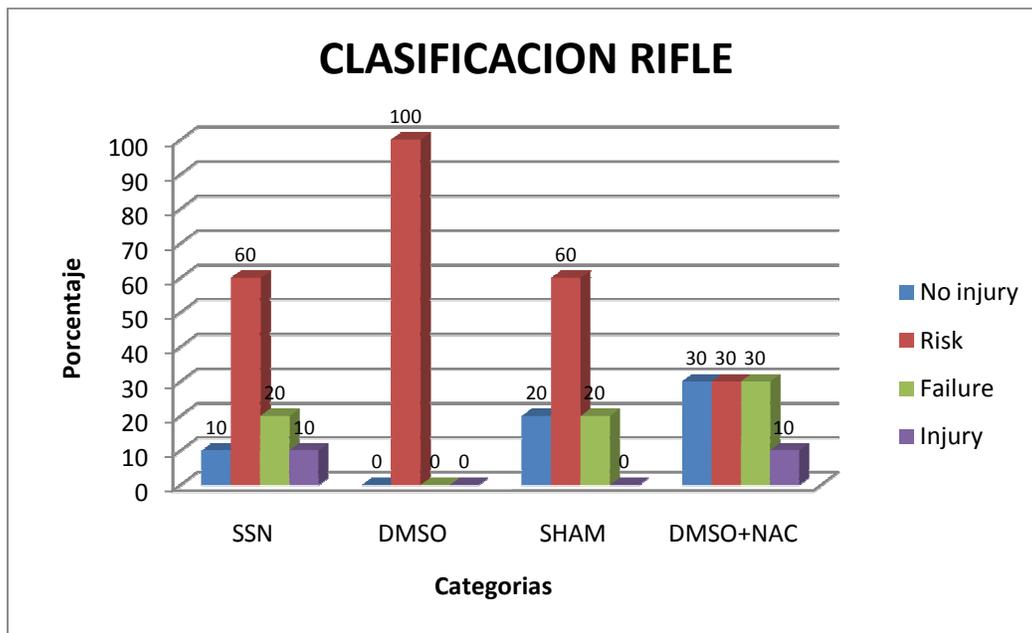
**Grafico 1. Creatininas Basales y finales**



Los valores de creatinina post intervención mostraron un incremento en todos los grupos al compararlos con los valores de creatinina basal, siendo más notorio en el grupo de I/R SSN (279%), seguida por el grupo I/R+DMSO (248%), el grupo I/R+DMSO+NAC (183%) por último el grupo I/R SHAM (168%). Mostrando significancia estadística con valores menores ( $p=0.0004$ ) para todos los grupos. (Grafico 1)

El grado de daño renal se catalogó según la clasificación de RIFLE: “Risk”, “Injury”, “Failure”, “End Loss” y “End stage Kidney disease”, determinando el daño renal de acuerdo al incremento de los niveles de creatinina del nivel basal, en 150%, 200% y 300% respectivamente.<sup>17,16</sup>

**Grafico 2. Categoría de daño según RIFLE**

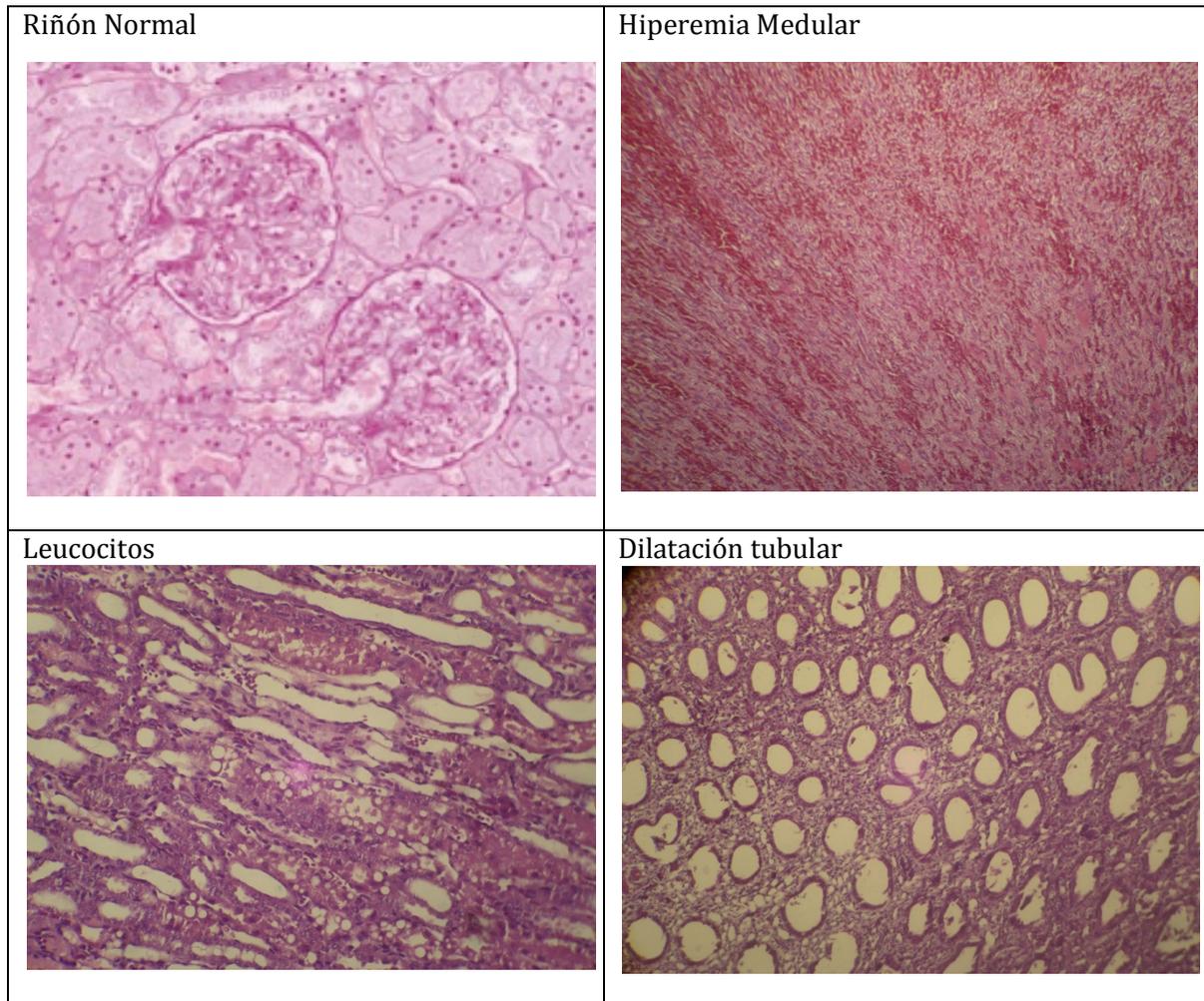


El grafico 2 representa la clasificación RIFLE de cada grupo estudiado, evidenciando que la mayoría se encontró en el grupo “Risk”, seguido por el grupo “Failure”, “No Injury” y por último en la categoría “Injury”. En los grupos I/R SSN, I/R DMSO y SHAM predomina la categoría “Risk”, sin embargo hay un 20% estos grupos que se encuentran en la categoría de “Failure”. En cuanto al grupo de I/R DMSO-NAC se clasificaron un 30% en cada categoría de “No Injury”, “Risk” y “Failure”, y solo un 10% en “Injury”.

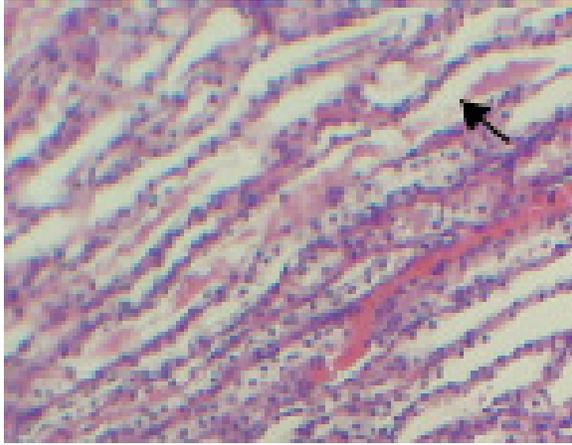
## Histopatológicos

El análisis histopatológico renal de las unidades experimentales se realizó con el fin de determinar el grado de severidad de las lesiones al igual que los cambios necróticos en cada grupo según los parámetros establecidos en la metodología.

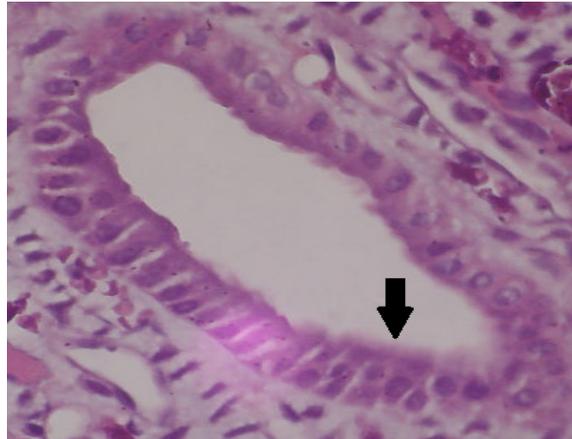
**Figura 7. Características histopatológicas en riñones sometidos a isquemia.**



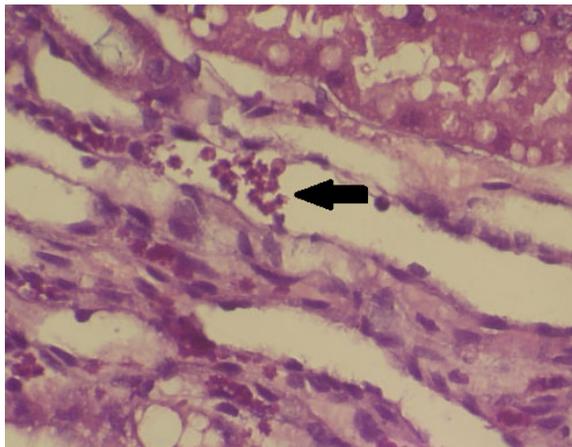
Adelgazamiento de Epitelio tubular



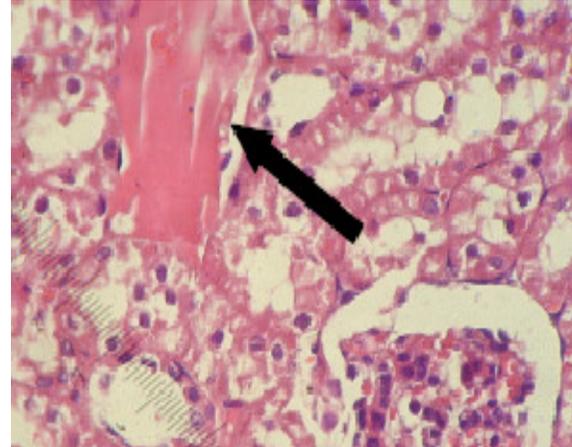
Ruptura de membrana celular



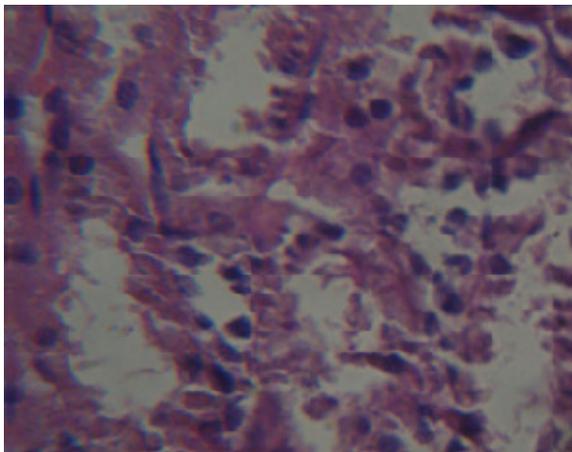
Células intratubulares



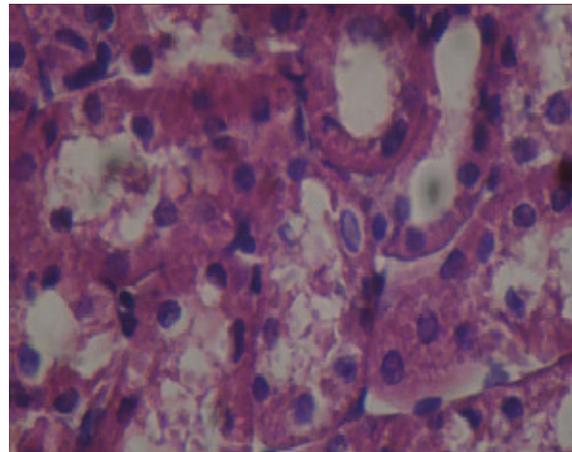
Cilindros Hialinos



Tubulorrexis



Vacuolización citoplasmática



Según lo establecido anteriormente se evaluaron las 14 variables histopatológicas categorizando cada una como ausente, leve, moderado o severo.

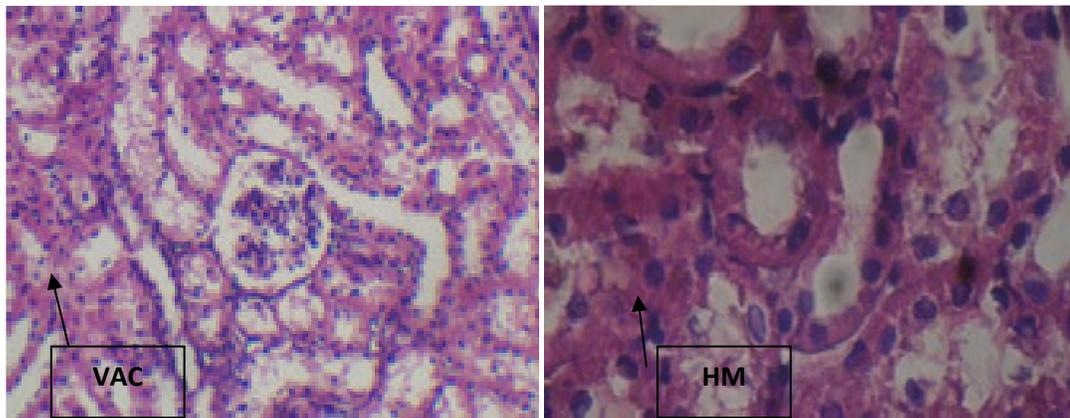
## **PATOLOGIA DESCRIPTIVA**

A continuación se detallan los resultados por grupo experimental de las variables histopatológicas más predominantes.

### **Grupo I/R SSN**

En el grupo de I/R SSN se observó una considerable vacuolización, separación de membrana basal, degeneración hidrópica y edema intracelular. Al igual, hay presencia de cariorrexis, cariólisis, tubulorrexis e hiperemia medular moderada. Además se encontró la presencia de leucocitos, situación que no se observó en ningún otro grupo. Este grupo presentó un daño moderado en cuanto a las características apoptóticas.

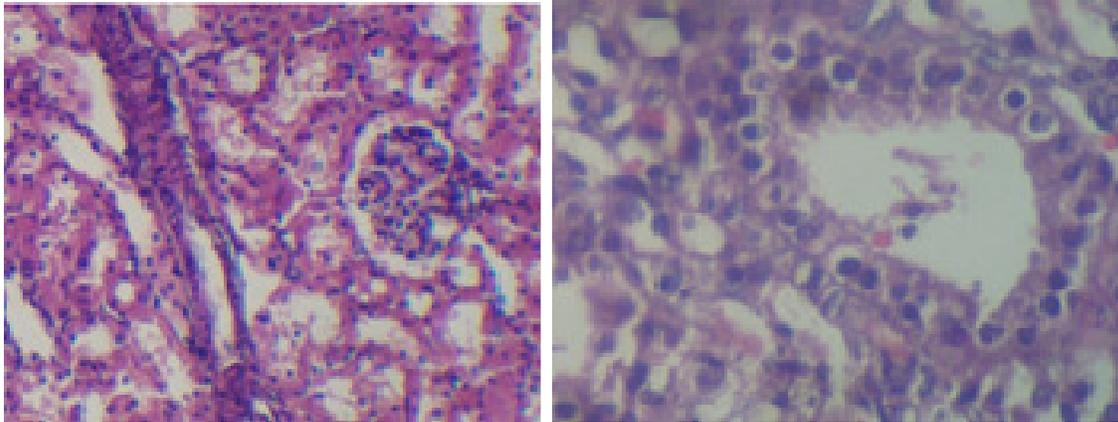
**Figura N° 8: Hallazgos más significativos en el grupo**



### **Grupo I/R DMSO**

En el grupo de I/R DMSO se observó un notable edema intracelular, dilatación tubular con cilindros intratubulares. Además se evidencia presencia de tubulorrexis, hiperemia medular marcada y núcleos hiper cromáticos, evidenciando ausencia de daño apoptótico.

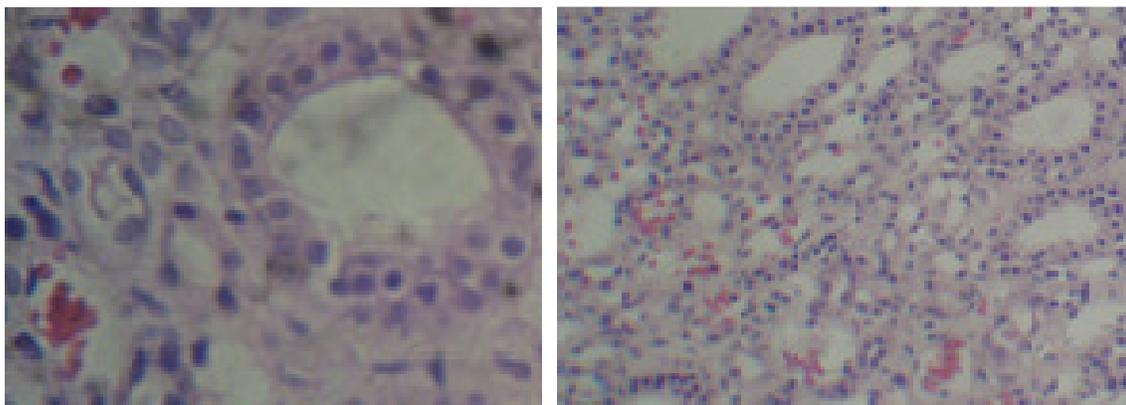
**Figura N° 9: Núcleos hipercromáticos con cilindros intratubulares.**



### **Grupo I/R SHAM**

En el grupo de I/R SHAM se observó una moderada degeneración hidrópica, dilatación tubular y un leve adelgazamiento del epitelio. Al igual se observaron leucocitos en su mayoría sin alteraciones, presentando un daño principalmente inflamatorio.

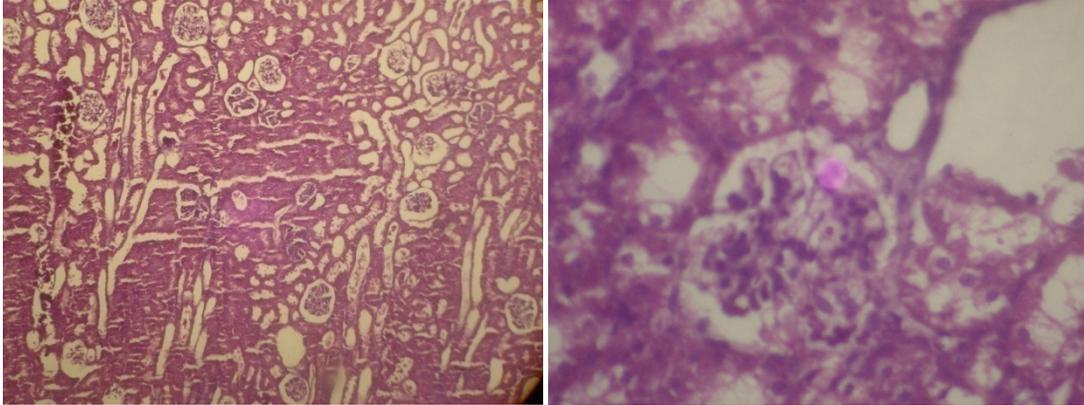
**Figura N° 10: Presencia de leucocitos y degeneración hidrópica**



### **Grupo I/R DMSO-NAC**

En el grupo de I/R DMSO-NAC se observaron leves alteraciones patológicas. Hay poca vacuolización, edema celular, degeneración hidrópica. Así mismo, se evidenció moderada dilatación tubular, tubulorrexis y cariólisis, demostrando un leve daño apoptótico .

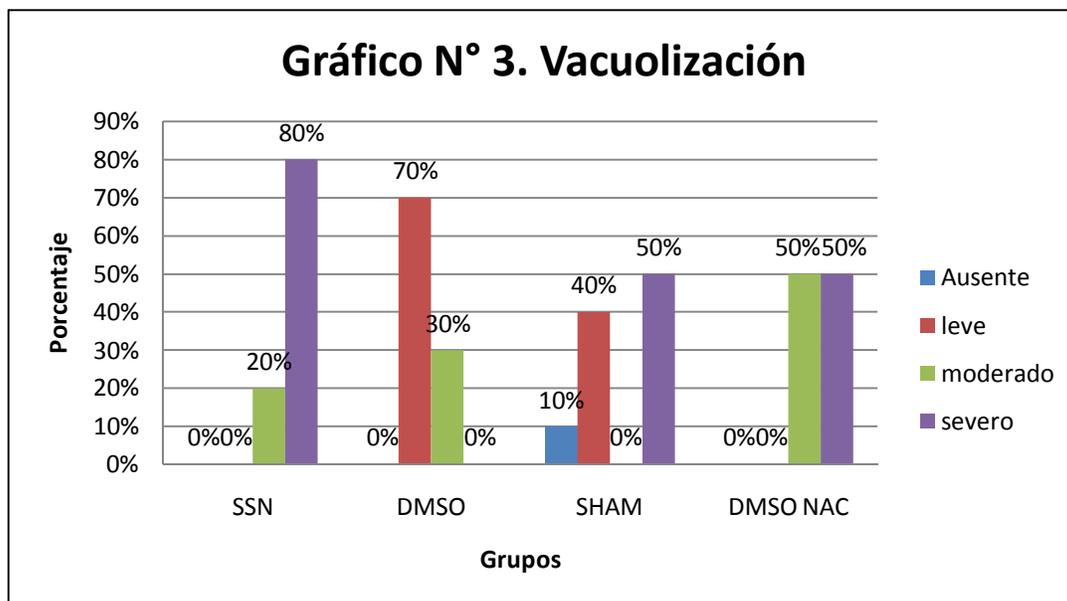
**Figura N° 11: Glomérulos conservados y leve dilatación tubular.**



Las variables histopatológicas se analizaron mediante estadística no paramétrica por medio del test de Kruskal-Wallis. Al obtener la diferencia entre cada grupo, ( $p < 0.05$ ) se analizó estadísticamente en pares mediante la prueba estadística de Dunnet.

## Resultados estadísticos de las 14 variables histopatológicas

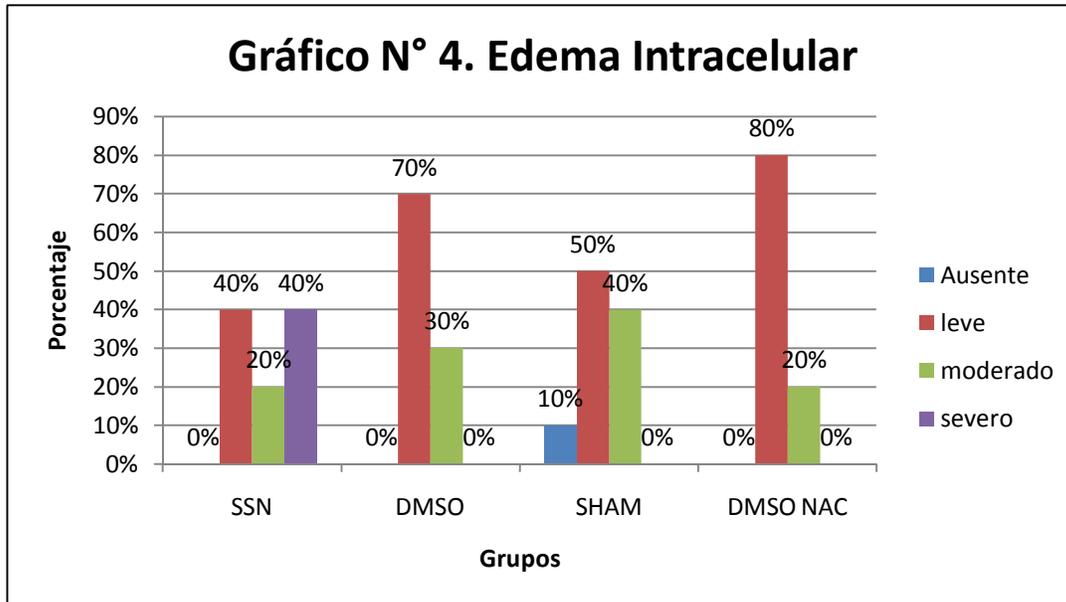
### Vacuolización



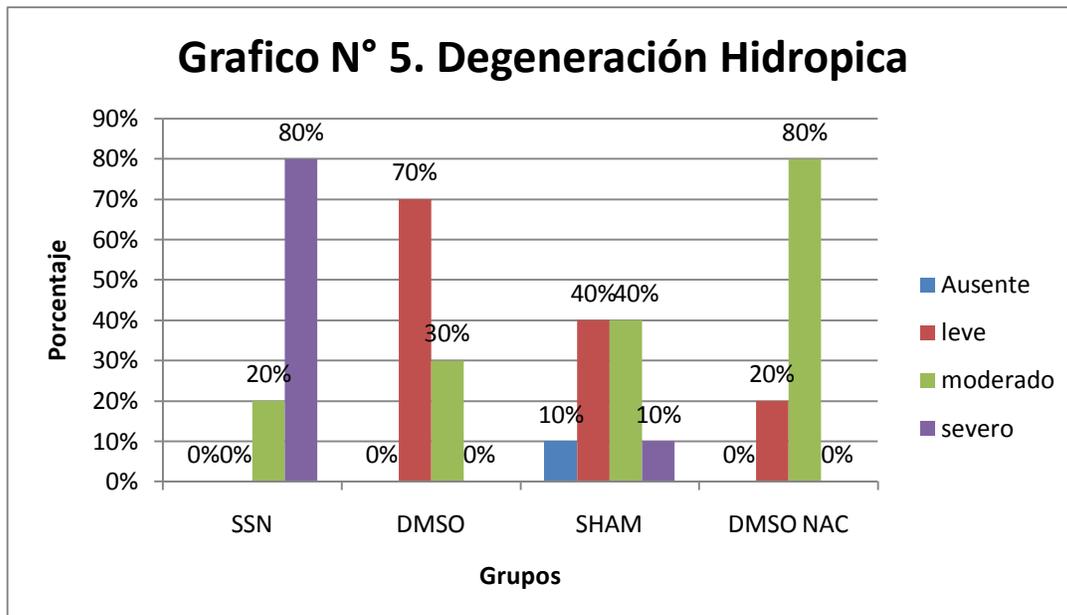
La vacuolización presentó diferencia significativa global de  $P = 0.0010$  la diferencia estadística por comparaciones múltiples se observó en el grupo I/R SSN daño severo de 80%, mientras que en el grupo I/R DMSO estuvo ausente dicha categoría. Entre los grupos I/R DMSO e I/R DMSO-NAC se observa una diferencia en la distribución del daño, 50% y 50% en las categorías moderado y severo en el grupo I/R DMSO-NAC y 70% y 30% de daño leve y moderado respectivamente.

## Edema Intracelular

En esta variable se encontró un valor P de 0.1287 no evidenciando variación significativa.

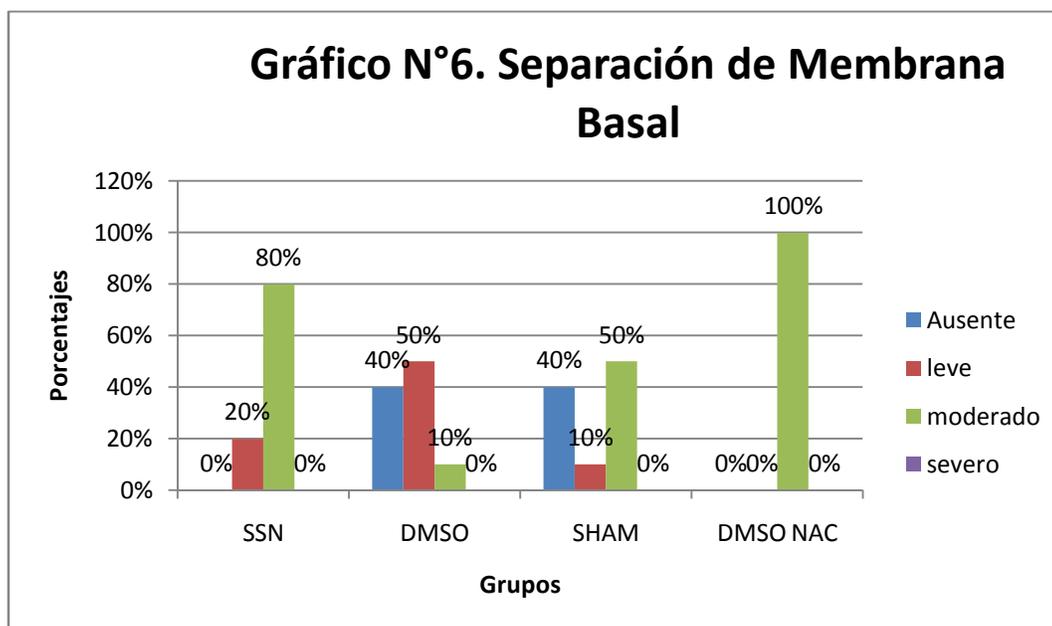


## Degeneración hidrópica



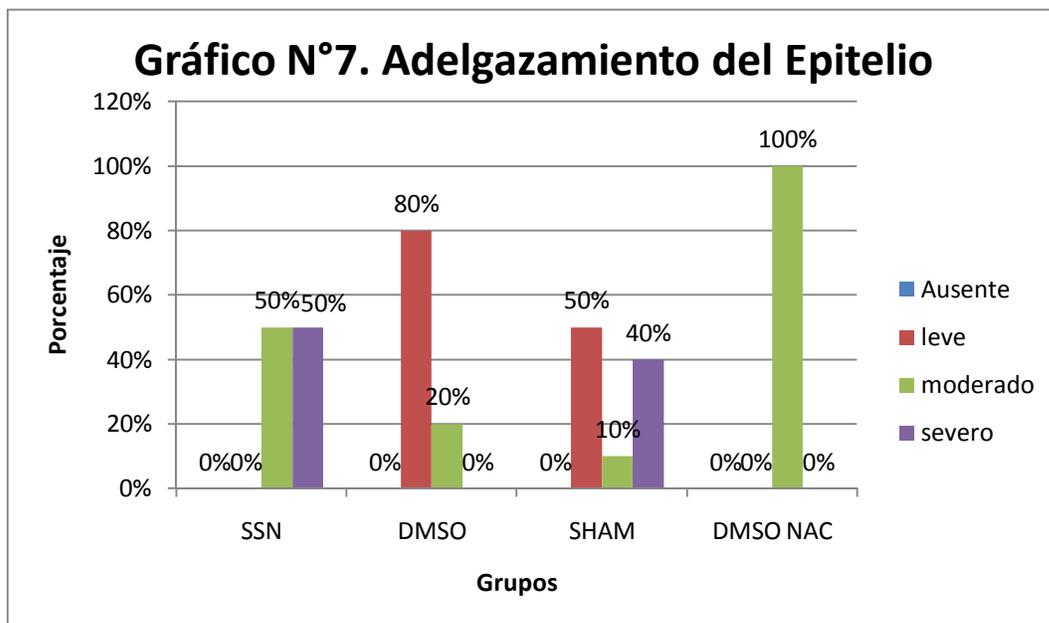
La degeneración hidrópica obtuvo una P 0.0001, encontrando una diferencia en cada grupo. El grupo I/R SSN presentó un daño severo en un 80% mientras que la categorización de daño entre los otros grupos fue: 40% daño moderado, 40% leve y 10% daño severo para el grupo I/R SHAM. En el grupo I/R DMSO-NAC se observa 80% de daño moderado y 20% de daño leve. Por último el grupo I/R DMSO presentó 70% de daño leve y 30% daño moderado.

### Separación membrana basal



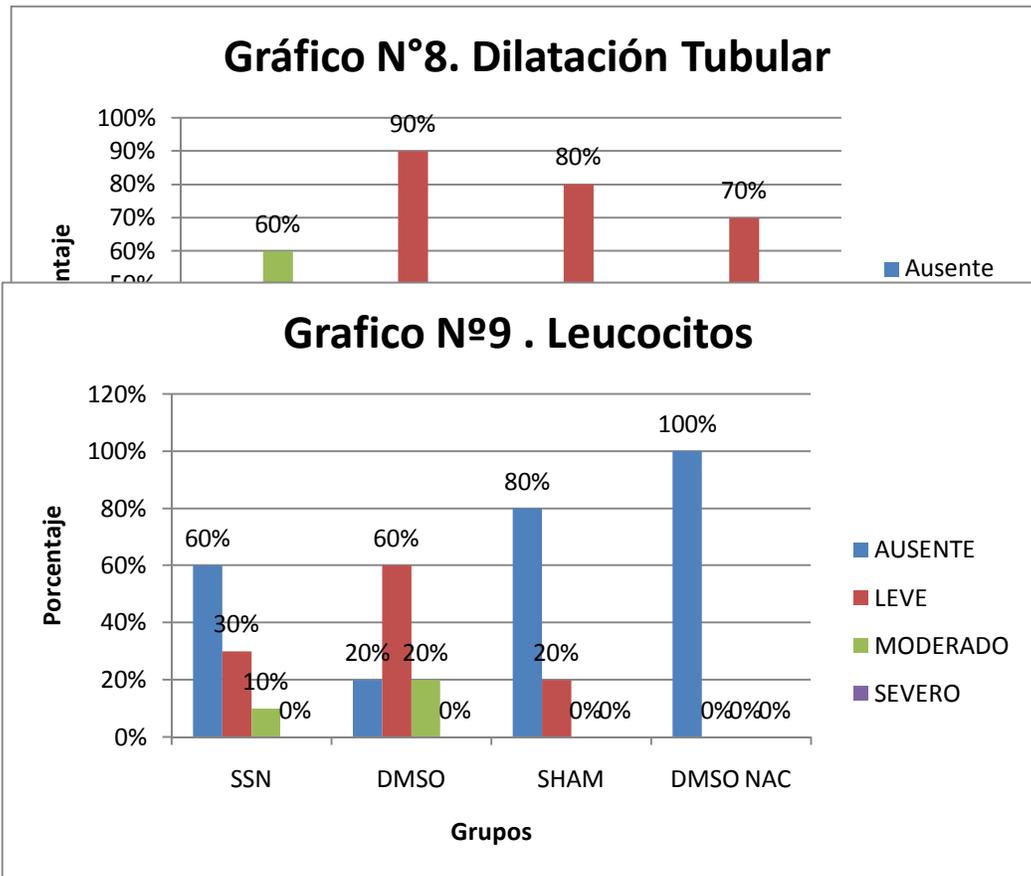
En la separación de la membrana basal se encontró una p 0.0004, obteniendo una variación significativa entre los grupos I/R SSN, I/R DMSO y I/R DMSO-NAC. Para este último el 100% de alteraciones de la membrana basal se observó en la categoría de daño moderado seguido por I/R SSN 80% de daño moderado y I/R DMSO entre la categoría de leve y ausente en un 90%.

## Adelgazamiento del epitelio



En cuanto al adelgazamiento del epitelio se obtuvo una  $p = 0.0011$ , encontrando una diferencia significativa entre los grupos I/R SSN y I/R DMSO, así mismo entre los grupos I/R DMSO y I/R DMSO-NAC. El grupo I/R DMSO presentó un 80% de daño leve, mientras el I/R DMSO-NAC obtiene 100% en daño moderado.

## Dilatación tubular

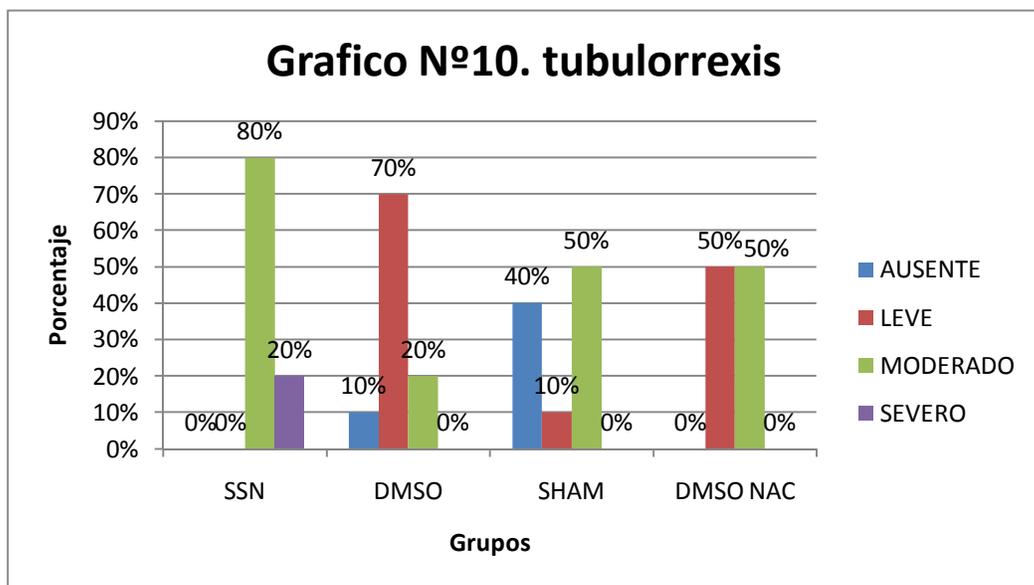


En esta variable

se obtuvo una  $p = 0.0274$  encontrando una variación entre los grupos I/R SSN y I/R DMSO presentando en el primer grupo un 60% en daño moderado y en el segundo un 90% en daño leve.

## Leucocitos

La presencia de leucocitos tuvo una diferencia significativa de  $p = 0.0017$ , entre los grupos I/R SSN, I/R DMSO, e I/R DMSO-NAC; en este último existió ausencia de leucocitos en un 100% de los especímenes, seguido por el grupo I/R SSN con un 60%

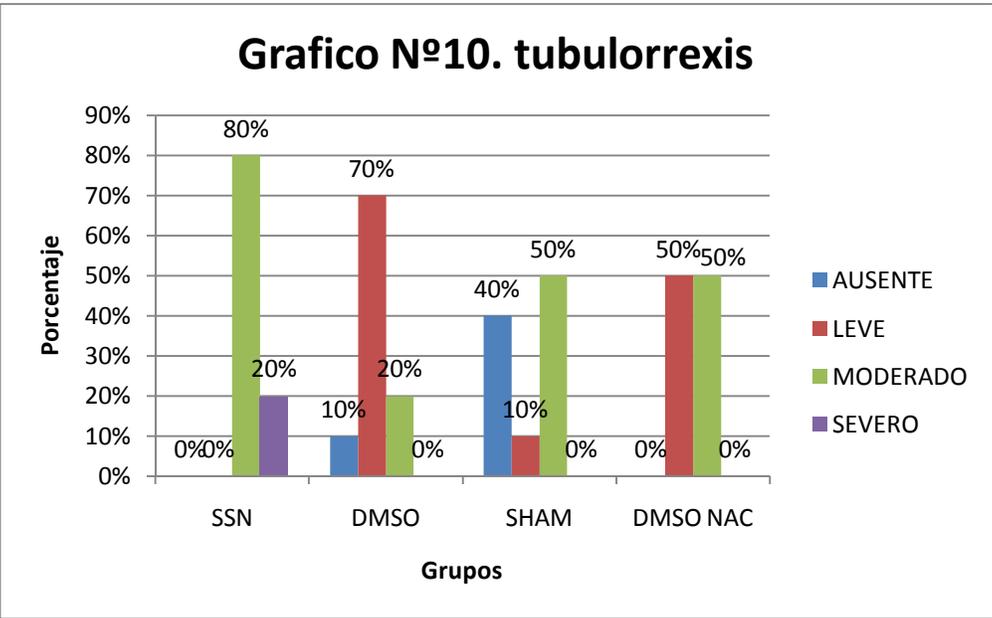


y el grupo I/R DMSO con un 20% en

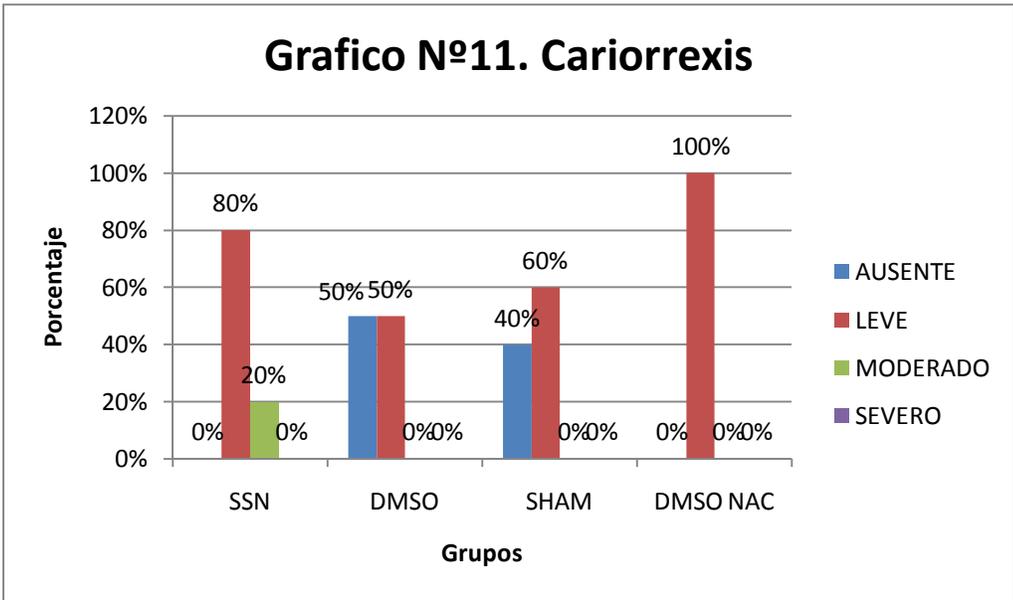
esta categoría.

### Tubulorrexis

En la variable Tubulorrexis se encontró una  $p = 0.0035$ , encontrándose principalmente en el grupo I/R SSN con 80% de daño moderado y 20% de daño severo, el grupo I/R DMSO-NAC muestra una distribución en el daño leve y moderado en un 50% y 50%. Entre las categorías de daño leve y ausente, se encontró un 80% del grupo I/R DMSO y un 50% del grupo I/R SHAM.

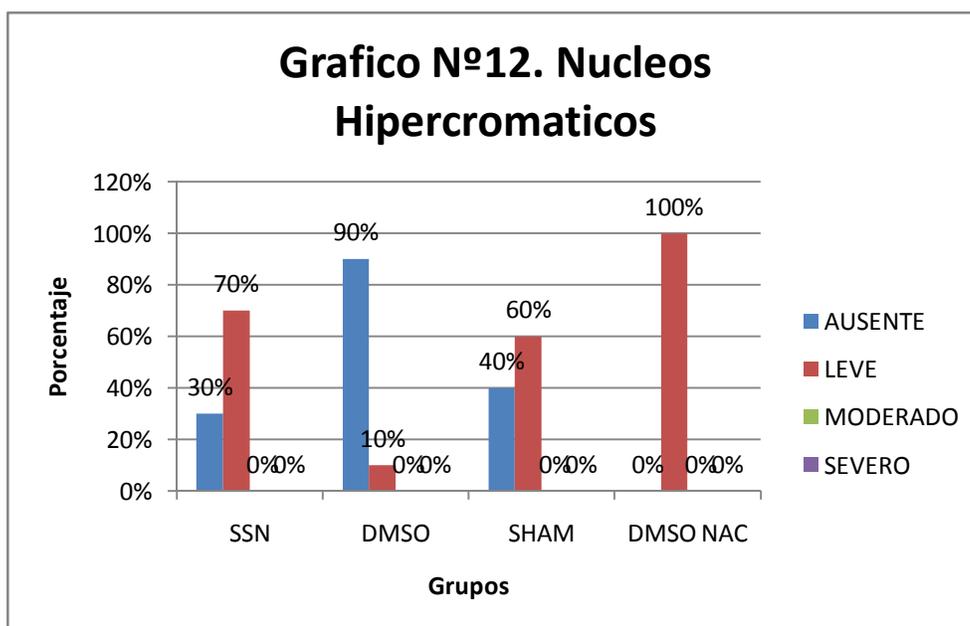


**Cariorrexis**



La presencia de cariorrexis tuvo hallazgos significativos (p 0.0045) entre los grupos I/R SSN y I/R DMSO, el primero mostró la presencia de cariorrexis leve, mientras que el I/R DMSO se clasifico en un 50% y 50% en los daños leve y ausente. El grupo I/R DMSO-NAC demostró un 100% de sus sujetos bajo la clasificación leve.

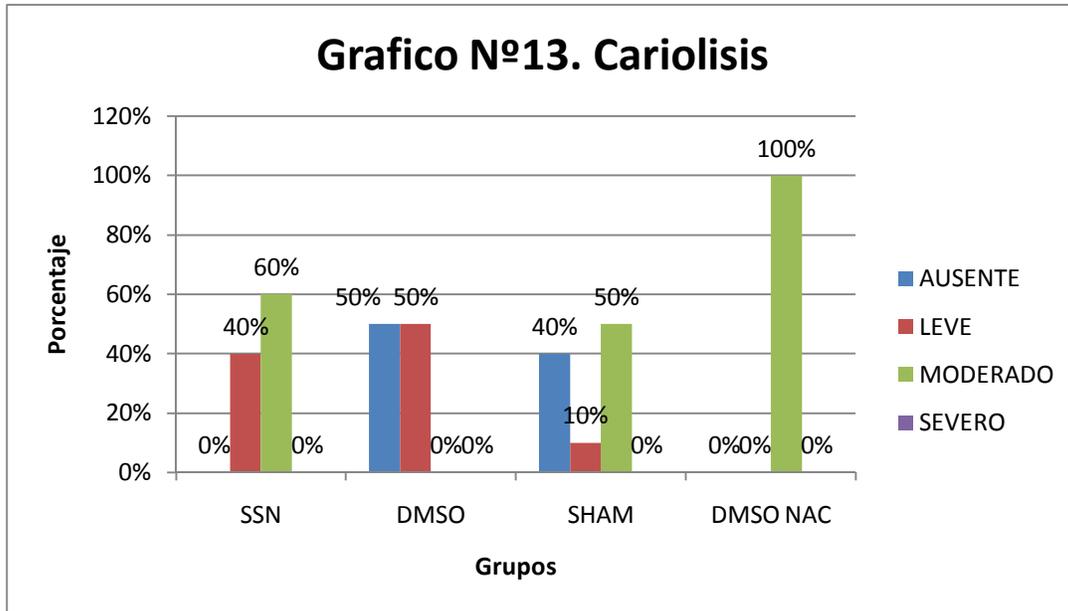
## Núcleos hipercromáticos



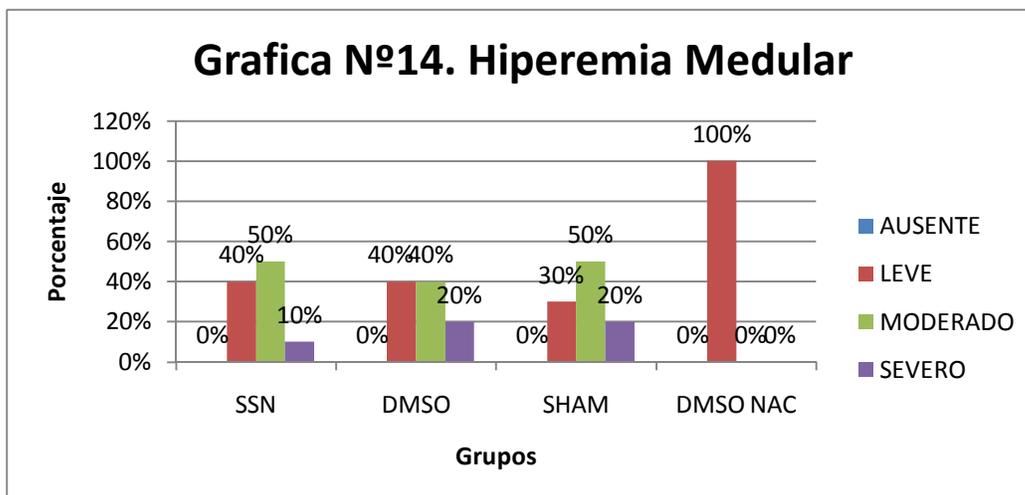
En la variable Núcleos Hipercromáticos se obtuvo una  $p = 0.007$  encontrando hallazgos significativos entre los grupos I/R SSN, I/R DMSO, e I/R DMSO-NAC. Este último presentó el 100% de sujetos bajo la clasificación leve, mientras que el grupo I/R SSN se distribuye la presencia de núcleos hipercromáticos entre leve y ausente. En el grupo I/R DMSO se clasificó en un 10% en la categoría leve y el resto ausente.

## Cariólisis

En la variable Cariólisis se encontró una diferencia significativa ( $p = 0.0002$ ) entre los grupos I/R SSN, I/R DMSO y I/R DMSO-NAC. Este último presenta el 100% de las unidades en la categoría moderada, mientras que el grupo I/R SSN se clasificó en un 60% en daño moderado, y el grupo I/R DMSO en un 50% y 50% entre las categorías leve y ausente.

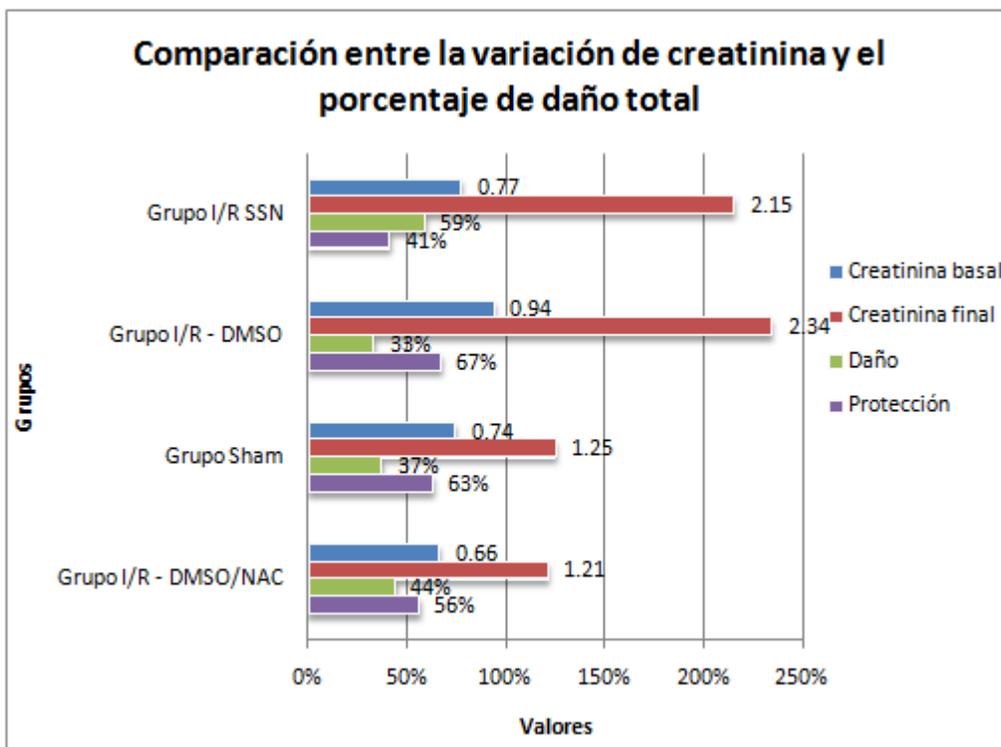
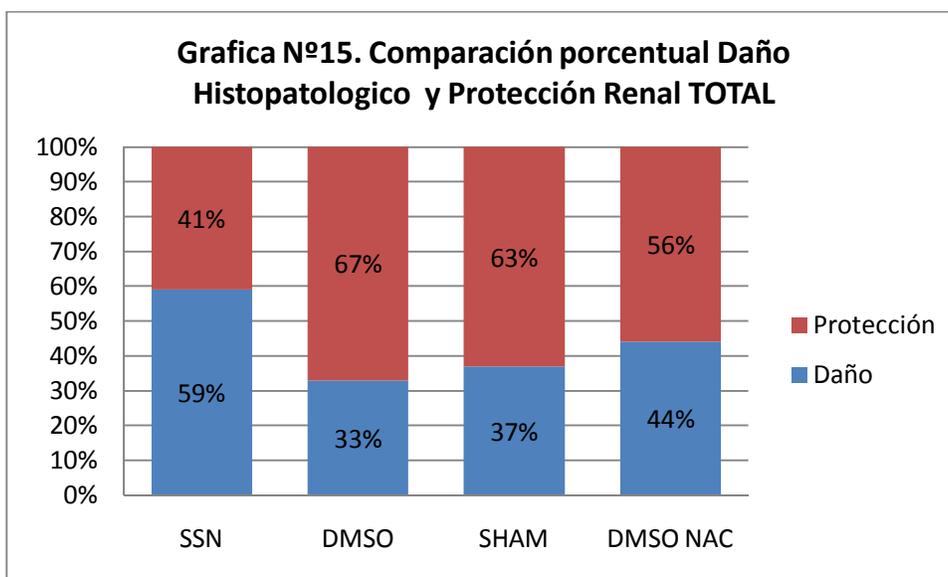


## Hiperemia medular



En la variable Hiperemia medular se obtuvo una  $p = 0.0107$  encontrando una significancia entre los grupos I/R SHAM y I/R DMSO-NAC. Se observa como el grupo I/R DMSO-NAC obtuvo una clasificación de leve en un 100%.

### Daño Renal Total



El puntaje de daño histológico se obtuvo de la sumatoria de los puntajes asignados a cada variable, los cuales se representan en la siguiente grafica con porcentajes comparativos entre el daño renal y la nefroprotección.

## DISCUSIÓN

El mantenimiento de la hemodinamia sistémica y la homeostasis hidroelectrolítica es vital, jugando un papel importante en ellos el riñón. En el síndrome de isquemia reperusión, la función excretora del riñón fracasa produciendo una insuficiencia renal aguda (IRA).

Es impactante como en el último medio siglo a pesar de los avances tecnológicos en la ciencia, aun persiste una mortalidad del 30% y 50% por causa del daño renal agudo<sup>52,53</sup>. El arresto cardiaco, trasplante renal, tratamiento quirúrgico de aneurismas suprarrenales, choque o procedimientos vasculares mayores son algunos eventos en donde la necrosis tubular forma parte importante, por lo que no se debe de dejar de lado lo esencial de la prevención del daño celular<sup>3,4,52,53</sup>.

Actualmente se están utilizando sustancias con diferentes mecanismos de acción frente al daño producido por la I-R, entre ellas: la N-Acetil Cisteína (NAC) como aminoácido antioxidante y el Dimetilsulfóxido (DMSO) como “scavenger” de radicales libres, estas han resultado útiles en patologías donde se observa el estrés oxidativo y en el cual los radicales libres de oxígeno (RLO) parecen ser protagonistas causantes del daño <sup>45,50,54</sup>.

Se ha comprobado que el DMSO posee además de su capacidad como scavenger de RLO, una actividad antiinflamatoria e inhibitoria de la agregación plaquetaria, convirtiéndolo en una sustancia útil en el tratamiento del síndrome I/R<sup>30</sup>. Este medicamento ha sido estudiado en diferentes órganos: músculo, corazón, mucosa intestinal, retina, hígado, cerebro, piel, médula espinal, entre otros con efectos benéficos<sup>55,56,57,58</sup>.

La NAC se considera de igual forma un neutralizador de RLO y posee un papel importante en la inhibición y acumulación de neutrófilos. Su actividad vasodilatadora y optimizadora de la microcirculación ha sido comprobada en investigaciones del síndrome de isquemia reperusión que involucran órganos como estomago, corazón, musculo y riñón con resultados positivos<sup>59,60,61</sup>. Dentro de la utilidad en el campo de

la nefrología Nitescu y cols.<sup>11</sup> han encontrado que el NAC disminuyó los niveles séricos de creatinina así como la inflamación del intersticio renal.

Como se puede observar se han realizado múltiples estudios de ambas sustancias en forma individual habiéndose obtenido resultados prometedores en el síndrome I/R. Dobashi K, y col <sup>61</sup> abren la puerta a una opción de tratamiento en su estudio realizado en 2002, donde utilizaron la combinación de NAC con un inhibidor de la enzima convertidora de endotelina y un donador de óxido nítrico, evaluando su protección en la injuria de isquemia-reperfusión renal, evaluaron la supervivencia de ratones que sufrieron isquemia-reperfusión renal por 90 min encontrando que al combinar las tres sustancias se observaron mejores resultados en comparación al uso de cada una de ellas individualmente, sugiriendo un efecto protector renal de las sustancias en estudio. Esto motivó a realizar esta investigación utilizando la capacidad transportadora del DMSO y la actividad intracelular del NAC entre otras propiedades, con el fin de demostrar si existe una ventaja de esta combinación frente a la administración de líquidos endovenosos en el síndrome I/R.

En los gráficos 1, 2 y 15 se comprobó la superioridad del uso de antioxidantes para prevenir el daño causado por el síndrome de I/R comparado al tratamiento convencional, demostrando un menor aumento de creatinina y un menor daño histológico total.

Estudios anteriores realizados en la UJMD por Hoyos y col, validaron el modelo de I/R renal en conejos utilizando DMSO, como sustancia antioxidante, demostrando su efecto nefroprotector. Se comparó el daño renal a nivel químico e histopatológico entre unidades experimentales con DMSO y aquellas con SSN, evidenciando un mayor daño en aquellos que no utilizaron la sustancia antioxidante<sup>5,6</sup>; en el presente estudio dicho resultado fue constatado puesto que las unidades experimentales tratadas con el DMSO presentaron menor daño histológico al compararlas con el grupo control. La combinación del DMSO/NAC en dosis bajas obtuvo resultados positivos, sin embargo no presentó una superioridad evidente al uso individual del DMSO.

## Histopatología

Los hallazgos histopatológicos determinan también el estadio del daño renal debido a su valoración de la injuria por isquemia y reperfusión. Este parámetro sigue siendo el “Gold Estándar” para la identificación de los daños apoptóticos y necróticos<sup>64</sup>.

Los hallazgos histopatológicos demostraron una diferencia significativa entre los distintos grupos, siendo notoria (p ) la variación en cuanto al daño renal total entre los grupos I/R SSN (44%) e I/R DMSO-NAC (33%).

Se ha descrito que la causa más frecuente del IRA es la Necrosis tubular aguda, caracterizada por : el adelgazamiento del epitelio, vacuolización, cilindros hialinos, formaciones de células intratubulares y dilatación tubular, cambios que se observan mayoritariamente en los túbulos proximales<sup>65,20</sup> cambios que afectan morfológicamente y funcionalmente las células tubulares de la región proximal. Estos cambios se manifestaron de forma leve en los grupos experimentales donde se emplearon antioxidantes, mientras que en el grupo control los daños se produjeron de moderados a severos, en 9 /14 variables el DMSO demostró su superioridad como antioxidante DMSO seguido por la combinación DMSO-NAC (3/14) como protectores del riñón comparados con el grupo control. (Graficas 3, 7 y 8)

En la necrosis existe una pérdida temprana de la membrana celular, lo que permite la entrada de iones y líquido extracelular hacia el interior de la célula y conlleva a edema de estas y de sus organelos. En la apoptosis, la integridad de la membrana celular persiste hasta las etapas tardías del proceso, por lo que los cambios se ven más que todo a nivel del núcleo observando cariólisis, cariorrexis y tubulorrexis<sup>52</sup>. Estas características estuvieron presentes en todos los grupos, sin embargo, estos daños fueron observados de forma leve en los grupos de I/R DMSO e I/R DMSO-NAC, evidenciando nuevamente la actividad de los antioxidantes.

El edema celular es uno de los cambios secundarios a isquemia, provocando alteraciones del metabolismo aeróbico de las células endoteliales<sup>20</sup>. Como se observa en el Grafico 4, el edema intracelular fue más marcado en el grupo control que el grupo I/R DMSO-NAC. *Carrel y col* demostraron en sus estudios sobre riñones

homotrasplantados que existe una mayor tasa de rechazo por parte del huésped cuando se presenta edema, infiltración por células plasmáticas y células de la serie linfóide, dilatación de los túbulos con adelgazamiento epitelial así como excesiva fibrosis intra y peri renal<sup>66</sup>. Esto se observó en los gráficos 4, 7 y 8 donde el grupo I/R DMSO y I/R DMSO-NAC obtuvieron mejores resultados, sin embargo la variable edema parece tener una menor presencia en el grupo tratado con la combinación de antioxidantes que en el grupo tratado con DMSO. Romanque y col hacen énfasis en el fenómeno de I/R y se recalca que la isquemia induce un estado proinflamatorio que aumenta la vulnerabilidad del tejido durante la reperfusión<sup>28</sup>.

Durante un trasplante de órgano, se evidencian los daños provocados por la isquemia, los cuales se aumentan durante la reperfusión al haber una liberación de los mediadores de la inflamación<sup>67</sup>. El daño que se produce durante este fenómeno se atenuaría al disminuir dichos mediadores, brindando una mayor importancia a aquellas sustancias que se encarguen de dicho proceso. El gráfico 9 demuestra una ausencia de leucocitos en el grupo I/R DMSO-NAC afirmando que esta sustancia antioxidante disminuye el proceso inflamatorio.

### **La Creatinina sérica**

La falla renal aguda se caracteriza por un deterioro súbito de la función renal, con un aumento del 50% de la creatinina sérica y una elevación de sustancias nitrogenadas.<sup>8</sup> A partir del año 2004, el consenso Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) validó la clasificación R.I.F.L.E. de sus siglas en inglés "Risk" (Riesgo), "Injury" (lesión), "Failure" (falla), "Loss" (perdida función) y "End Stage Kidney Disease" (Enfermedad renal terminal) catalogando el daño renal de acuerdo al incremento de los niveles de creatinina del nivel basal, en 150%, 200% y 300% respectivamente.<sup>17,16</sup>

A pesar de las diferencias funcionales encontradas en la depuración de creatinina el grupo I/R DMSO-NAC se clasificó solamente con el 60 % de las unidades experimentales con categorías de al mejores o iguales a RISK en comparación al grupo I/R DMSO donde el 100% se clasificó en "Risk", demostrando la superioridad del DMSO. Este hallazgo puede haberse presentado debido al uso de dosis bajas de

NAC (20mg/kg), debido a no haber encontrado una presentación farmacéutica de mayor concentración en el mercado. Estudios donde se usó esta sustancia antioxidante utilizaron dosis altas de 150 a 400mg/kg demostrando un mayor nivel de protección renal<sup>11,62,63</sup>.

Como pudimos observar en el síndrome de isquemia reperfusión la inflamación forma un pilar fundamental en su fisiopatogenia, al disminuir este proceso se garantiza un menor daño renal<sup>68</sup>. Dentro de la isquemia producida en un trasplante, el edema celular juega un papel importante, causado principalmente por la parálisis de la bomba de sodio-potasio<sup>69</sup>. En esta investigación se demostró que el edema puede verse disminuido por el efecto de un antioxidante.

En resumen el uso combinado de antioxidantes mostró superioridad en cuanto al incremento de la creatinina con respecto al nivel basal (Grafico 1). En las variables histopatológicas, se puede observar la ventaja del uso de estos agentes en cuanto a la prevención de daño a nivel renal. Esto es de vital importancia debido a que podría abrir la puerta para el uso a nivel preventivo de sustancias antioxidantes en los trasplantes renales o pacientes críticos en los que se visualiza la disminución de la perfusión renal ya que disminuyen considerablemente los daños ocasionados por los RLO.

## CONCLUSIONES

- El modelo experimental realizado logra simular el escenario fisiopatológico de un evento de isquemia-reperfusión renal.
- Se observaron cambios histopatológicos compatibles con daño renal agudo y aumento de la creatinina sérica posterior al evento de isquemia-reperfusión.
- El uso de los antioxidantes DMSO-NAC en el síndrome de I/R parece disminuir el deterioro de la función renal.
- La combinación del DMSO con NAC logro un menor aumento de la creatinina sérica en comparación a los otros grupos expuestos a la I/R.
- El daño renal encontrado presentó una distribución multifocal en todos los grupos estudiados.
- El grupo que utilizó el antioxidante DMSO presentó menor daño histopatológico, posterior al evento de isquemia y reperfusión renal.
- El uso combinado de DMSO-NAC durante el fenómeno de I/R parece disminuir el daño tubular renal desde el punto de vista histopatológico.
- Los resultados obtenidos en general permiten identificar la superioridad del uso de los antioxidantes sobre el manejo de líquidos.

## RECOMENDACIONES

- Mejorar el modelo experimental para futuros estudios, teniendo en cuenta un adecuado monitoreo de los signos vitales, del gasto urinario y un mejor manejo de los líquidos endovenosos.
- Realizar estudios que evalúen los efectos solo del antioxidante NAC durante un evento de isquemia-reperfusión.
- Realizar investigaciones que valoren la sobrevida de las unidades experimentales utilizando este modelo experimental.
- Realizar estudios que evalúen otros parámetros como la actividad enzimática e inmunohistoquímica para cada grupo.
- Realizar una investigación para la búsqueda de la ventana terapéutica de la combinación DMSO/NAC previo y posterior a un evento de isquemia-reperfusión renal.

## CRONOGRAMA

CRONOGRAMA														
ACTIVIDADES/MES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2
ELABORACION PROTOCOLO	■	■	■											
ENTREGA PROTOCOLO				■										
RESOL. COMITÉ					■									
MODIF. PROTOC					■									
PRUEBA PILOTO					■									
ACT. GESTION INSUMO				■	■	■								
ACTI. ADQ. INSUMOS				■	■	■								
EXPERIMENTOS						■	■	■	■					
OBTENCION RESULTADOS						■	■	■	■					
TABULACION RESULTADOS									■	■	■			
ANALISIS RESULTADOS									■	■	■	■		
REDACCION TESIS												■		
ENTREGA TESIS													■	
DEFENSA TESIS														■

## PRESUPUESTO

<b>Material</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Precio unitario</b>	<b>Total</b>
<b>Conejos machos Nueva Zelanda</b>	31	\$14	\$434
<b>Ketamina</b>	15	\$22.62	\$339.30
<b>Acepromacina</b>	1	\$16.50	\$16.50
<b>Dimetilsulfóxido</b>	10	\$6.09	\$60.90
<b>NAC</b>	30	\$3.68	\$110.40
<b>Solución Salina Normal 0.9%</b>	40	\$0.67	\$27.12
<b>Insumos médicos</b>	Variable	\$300	\$300
<b>Pruebas de laboratorio</b>	120 tiras	\$1.5 /tira	\$180
<b>Patólogo</b>	60 cortes	\$5	\$300
<b>Gastos de alimentación y transporte</b>	31 conejos	\$5	\$155
<b>Papelería</b>	Variable	\$50	\$50
<b>Imprevistos</b>	Variable	20%	\$400
<b>Total</b>			<b>\$2,373</b>

## BIBLIOGRAFIA

1. Liaño F, Pascual J. Epidemiology of acute renal failure: a prospective, multicenter, community-based study. Madrid Acute Renal Failure Study Group. *Kidney Int.* 1996;50(3):811-818.
2. Acute kidney injury : Critical Care Medicine. Available at: [http://journals.lww.com/ccmjournals/Abstract/2008/04001/Acute\\_kidney\\_injury.1.aspx](http://journals.lww.com/ccmjournals/Abstract/2008/04001/Acute_kidney_injury.1.aspx) [Accedido Junio 30, 2010].
3. Renal hypoxia and dysoxia after reperfusion of the... [Mol Med. 2008 Jul-Aug] - PubMed result. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/pubmed> [Accedido Julio 6, 2010].
4. Mejia-Vilet JM, Ramirez V, Cruz C, et al. Renal ischemia-reperfusion injury is prevented by the mineralocorticoid receptor blocker spironolactone. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;293(1):F78-86.
5. Hoyos W, Lopez R, Medina I, Ramos J, Garcia Z. Dimethyl Sulphoxide administration decreases renal ischemic-reperfusion injury. 2009.
6. Hoyos W, Castaneda J, Rivas A UR. Efecto del Dimetilsulfóxido sobre la apoptosis y daño renal en un modelo animal de Isquemia-Reperusión. 2010. Available at: [Accedido Julio 6, 2010].
7. Muertes\_Todas\_las\_Edades\_2008.pdf. Available at: [http://www.mspas.gob.sv/pdf/causas\\_frecuentes2008/Muertes\\_Todas\\_las\\_Edades\\_2008.pdf](http://www.mspas.gob.sv/pdf/causas_frecuentes2008/Muertes_Todas_las_Edades_2008.pdf) [Accedido Marzo 3, 2010].
8. Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, et al. *Harrison's Principles of Internal Medicine, 17th Edition.* 17º ed. McGraw-Hill Professional; 2008.
9. Isquemia aguda. Available at: <http://www.medynet.com/usuarios/jraguilar/Manual%20de%20urgencias%20y%20Emergencias/isqaguda.pdf> [Accedido Febrero 27, 2010].
10. Santos NC, Figueira-Coelho J, Martins-Silva J, Saldanha C. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochemical Pharmacology.* 2003;65(7):1035-1041.
11. Nitescu N, Ricksten S, Marcussen N, et al. N-acetylcysteine attenuates kidney injury in rats subjected to renal ischaemia-reperfusion. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2006;21(5):1240-1247.
12. Moore KL. *Fundamentos de Anatomia Con Orientacion Clinica.* 3º ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2009.

13. Guyton AC, Hall JE. *Textbook of Medical Physiology: With STUDENT CONSULT Online Access*. 11° ed. Saunders; 2005.
14. FRCPath VKMM, MBBS AKA, MD NF, MD JA. *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease: With STUDENT CONSULT Online Access (Pathologic Basis of Disease*. 8° ed. Saunders; 2009.
15. Bioline International Official Site (site up-dated regularly). Available at: <http://www.bioline.org.br/request?rc01014> [Accedido Abril 19, 2010].
16. Acute Renal Failure: eMedicine Nephrology. Available at: <http://emedicine.medscape.com/article/243492-overview> [Accedido Octubre 29, 2010].
17. The RIFLE criteria and mortality in acute kidney i... [Kidney Int. 2008] - PubMed result. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18160961?dopt=AbstractPlus> [Accedido Octubre 29, 2010].
18. 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.
19. Agraharkar M. Acute Renal Failure: eMedicine Nephrology. 2010. Available at: <http://emedicine.medscape.com/article/243492-overview> [Accedido Octubre 29, 2010].
20. León MDD, Diaz MDL. *Insuficiencia renal aguda*. Editorial Limusa; 2002.
21. Devarajan P. Acute Tubular Necrosis: Treatment & Medication - eMedicine Pediatrics: General Medicine. 2008. Available at: <http://emedicine.medscape.com/article/980830-treatment> [Accedido Noviembre 2, 2010].
22. Bagshaw SM, Gibney RTN. Conventional markers of kidney function. *Critical Care Medicine*. 2008;36(Suppl):S152-S158.
23. (Liege) NERBPMDHC, DACVIM KASD. *Current Therapy in Equine Medicine*. 6° ed. Saunders; 2008.
24. Weight SC, Bell PRF, Nicholson ML. Renal ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg*. 1996;83(2):162-170.
25. Hourmant M. [Renal ischemia reperfusion syndrome]. *Nephrologie*. 1999;20(7):371-375.
26. Coca SG, Yalavarthy R, Concato J, Parikh CR. Biomarkers for the diagnosis and risk stratification of acute kidney injury: A systematic review. *Kidney Int*. 2007;73(9):1008-1016.

27. Kosieradzki M, Rowinski W. Ischemia/Reperfusion Injury in Kidney Transplantation: Mechanisms and Prevention. *Transplantation Proceedings*. 2008;40(10):3279-3288.
28. Romanque U P, Uribe M M, Videla LA. Mecanismos moleculares en el daño por isquemia-reperusión hepática y en el preacondicionamiento isquémico. *Rev. méd. Chile*. 2005;133(4). Available at: [http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0034-98872005000400012&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0034-98872005000400012&script=sci_arttext) [Accedido Marzo 5, 2010].
29. Welbourn CRB, Goldman G, Paterson IS, et al. Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: Central role of the neutrophil. *British Journal of Surgery*. 1991;78(6):651-655.
30. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *British Journal of Surgery*. 1994;81(5):637-647.
31. Mandel LJ, Takano T, Soltoff SP, Murdaugh S. Mechanisms whereby exogenous adenine nucleotides improve rabbit renal proximal function during and after anoxia. *J. Clin. Invest.* 1988;81(4):1255-1264.
32. Green CJ, Gower JD, Healing G, et al. The importance of iron, calcium and free radicals in reperfusion injury: an overview of studies in ischaemic rabbit kidneys. *Free Radic. Res. Commun.* 1989;7(3-6):255-264.
33. Wilson DR, Arnold PE, Burke TJ, Schrier RW. Mitochondrial calcium accumulation and respiration in ischemic acute renal failure in the rat. *Kidney Int.* 1984;25(3):519-526.
34. McCord JM, Fridovich I. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* 1968;243(21):5753-5760.
35. Li J, Shah AM. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2004;287(5):R1014-1030.
36. Ray R, Shah AM. NADPH oxidase and endothelial cell function. *Clin. Sci.* 2005;109(3):217-226.
37. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N. Engl. J. Med.* 1985;312(3):159-163.
38. Araujo M, Welch WJ. Oxidative stress and nitric oxide in kidney function. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2006;15(1):72-77.
39. Santos NC, Figueira-Coelho J, Martins-Silva J, Saldanha C. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochemical Pharmacology*. 2003;65(7):1035-1041.
40. Natural Standard, The Authority on Integrative Medicine. Available at:

<http://www.naturalstandard.com/index-abstract.asp?create-abstract=/monographs/foreignlanguage/herbssupplements/patient-dimethylsulfoxide-sp.asp> [Accedido Marzo 6, 2010].

41. DMSO: Many Uses, Much Controversy. Available at: <http://www.dmsso.org/articles/information/muir.htm> [Accedido Marzo 6, 2010].

42. Pharmacology of DMSO. Available at: <http://www.dmsso.org/articles/information/herschler.htm> [Accedido Marzo 6, 2010].

43. N-acetilcisteina Available at: <http://www.benbrew.com/lb/NAC.pdf> [Accedido Abril 19, 2010].

44. DiMari J, Megyesi J, Udvarhelyi N, et al. N-acetyl cysteine ameliorates ischemic renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol*. 1997;272(3):F292-298.

45. Lopez-Neblina F, Toledo AH, Toledo-Pereyra LH. Molecular biology of apoptosis in ischemia and reperfusion. *J Invest Surg*. 2005;18(6):335-350.

46. Apoptosis en enfermedades renales. Available at: <http://www.revistanefrologia.com/revistas/P1-E145/P1-E145-S130-A2389.pdf> [Accedido Marzo 23, 2010].

47. Lopez-Neblina F, Toledo AH, Toledo-Pereyra LH. Molecular biology of apoptosis in ischemia and reperfusion. *J Invest Surg*. 2005;18(6):335-350.

48. P Ramirez, JM Marin, A Piñero. Investigación experimental aplicada a la clínica: isquemia-reperfusion hepática. Available at: [http://www.doyma.es/revistas/ctI\\_servlet?\\_f=7064&ip=190.87.212.51&articuloid=10017&revistai](http://www.doyma.es/revistas/ctI_servlet?_f=7064&ip=190.87.212.51&articuloid=10017&revistai) [Accedido Marzo 23, 2010].

49. Jennette JC, Olson JL, Schwartz MM, Silva FG. *Heptinstall's Pathology of the Kidney*. Sixth Edition. Lippincott Williams & Wilkins; 2006.

50. Rubin E, Reisner HM. *Essentials of Rubin's Pathology*. Fifth Edition. Lippincott Williams & Wilkins; 2008.

51. Blood collection and administration of fluids and drugs (rabbit) - Animal Research - The University of Iowa. Available at: [http://research.uiowa.edu/animal/?get=rbt\\_tech#Marginal%20ear%20vein](http://research.uiowa.edu/animal/?get=rbt_tech#Marginal%20ear%20vein) [Accedido Julio 7, 2010].

52. Gobe G, Willgoss D, Hogg N, Schoch E, Endre Z. Cell survival or death in renal tubular epithelium after ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int*. 1999;56(4):1299-1304.

53. Rana, A, Sathyanarayana, P, Lieberthal W. Role of apoptosis of renal tubular cells in acute renal failure: Therapeutic implications. Available at:

<http://www.springerlink.com/content/x083206pq5511145/> [Accedido Octubre 27, 2010].

54. FRCPath ASM. *Anatomia Patologica*. 2º ed. Elsevier Espana; 2001.

55. Kojima M, Iwakiri R, Wu B, et al. Effects of antioxidative agents on apoptosis induced by ischaemia-reperfusion in rat intestinal mucosa. *Aliment Pharmacol Ther*. 2003;18(s1):139-145.

56. Garcia-Aguirre, JG, Quiroz, MH, Rodriguez, RA, Larriva, SJ. Análisis histopatológico del efecto del dimetil-sulfóxido (DMSO) en un modelo experimental de isquemia retiniana. Available at: <http://new.medigraphic.com/cgi-bin/resumenMain.cgi?IDARTICULO=17480&IDPUBLICACION=1786&IDREVISTA=87> [Accedido Octubre 28, 2010].

57. Sahin M, Avsar F, Ozel H, et al. The effects of dimethyl sulfoxide on liver damage caused by ischemia-reperfusion. *Transplantation Proceedings*. 2004;36(9):2590-2592.

58. Kim MS, Akera T. O<sub>2</sub> free radicals: cause of ischemia-reperfusion injury to cardiac Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1987;252(2):H252-257.

59. Koksall C, Bozkurt AK, Cangel U, et al. Attenuation of ischemia/reperfusion injury by N-acetylcysteine in a rat hind limb model. *J. Surg. Res*. 2003;111(2):236-239.

60. Di Giorno C, Pinheiro HS, Heinke T, et al. Beneficial effect of N-acetyl-cysteine on renal injury triggered by ischemia and reperfusion. *Transplant. Proc*. 2006;38(9):2774-2776.

61. Dobashi K, Singh I, Orak JK, Asayama K, Singh AK. Combination therapy of N-acetylcysteine, sodium nitroprusside and phosphoramidon attenuates ischemia-reperfusion injury in rat kidney. *Mol. Cell. Biochem*. 2002;240(1-2):9-17.

62. Zhou X, DU D, Ma X, Zhang J. [The protective mechanism of N-acetylcysteine against ischemia/reperfusion induced gastric injury in rats.]. *Sheng Li Xue Bao*. 2010;62(1):69-72.

63. Gurbuz N, Ozkul A, Burgaz S. Effects of vitamin C and n-acetylcysteine against cyclophosphamide-induced genotoxicity in exfoliated bladder cells of mice in vivo. *J BUON*. 2009;14(4):647-652.

64. 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.

65. Acute Renal Failure: eMedicine Nephrology. Available at: <http://emedicine.medscape.com/article/243492-overview> [Accedido Octubre 29, 2010].

66. Expresion del Transforming growth Factor B1 en el síndrome isquemia-reperfusion en un modelo de transplante experimental a corazón parado en cerdo. Available at:

[http://www.tdr.cesca.es/TESIS\\_UB/AVAILABLE/TDX-1001102-115123/TOL112.pdf](http://www.tdr.cesca.es/TESIS_UB/AVAILABLE/TDX-1001102-115123/TOL112.pdf)  
[Accedido Noviembre 1, 2010].

67. Rosario V, Montero R. *Tratado de trasplantes de órganos*. Arán Ediciones; 2006.

68. Pozo SDCD, Arellano JLP. *Manual de patología general*. Elsevier España; 2006.

69. Pera C, Blanco-Morales CP. *Cirugía: fundamentos, indicaciones y opciones técnicas*. Elsevier España; 1996.