

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. JOSÉ MATIAS DELGADO”

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

DR. LUIS EDMUNDO VASQUEZ

ESCUELA DE MEDICINA

*TESIS DOCTORAL
PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
DOCTOR EN MEDICINA*

**EFFECTO NEFROPROTECTOR DEL ÁCIDO ASCÓRBICO EN UN MODELO DE DAÑO
RENAL INDUCIDO POR GENTAMICINA EN CONEJOS.**

AUTORES

ANALYDIA GUTIERREZ BONILLA

JAVIER ANTONIO PADILLA FUNES

ASESOR

DR. WILLIAM ANDRES HOYOS ARANGO

LA LIBERTAD, 6 DE FEBRERO DE 2012.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco principalmente a Dios, porque nada de esto hubiera sido posible sin su mano guiándome y sosteniéndome durante todo el camino.

A mi mamá, gracias por su amor incondicional, por enseñarme a que todo aquel que siembra con esfuerzo y dedicación, cosecha frutos de alegría y satisfacción al ver el resultado de su trabajo.

A mi hermano: Roberto, gracias por ser mi ejemplo a seguir, el mejor hermano mayor que pueda existir, gracias por tus consejos, tu apoyo infinito y tu amor, por ser un excelente ejemplo de tenacidad y que el secreto del éxito está en amar lo que se hace. A Grazzia, mi compañera de juegos, por enseñarme desde pequeña a investigar -aunque yo fuera su conejillo de indias- por enseñarme a soñar sin límites, por eso y más, gracias. A María Isabel, el mejor ejemplo de excelencia, mi confidente, gracias por recordarme que de la mano de Dios todo es posible. Ariela, gracias por ser un recordatorio del milagro de la vida, siempre serás mi hermana bebé, aunque ya seas toda una adolescente. A Luisa, mi otra hermana, gracias por motivarme constantemente y por recordarme que Dios puede y quiere cumplir mis sueños. Los amo hermanos, son mi columna vertebral.

A Matteo, la luz de mis ojos, te amo con todo mi corazón.

A Japi, gracias por tu comprensión, tu ayuda, por enseñarme a ver la vida sin complicaciones, porque “es un buen compañero, y nadie lo puede negar”. Al equipo DMSO: Axa, Paola y Oscar. Gracias por ser unos excelentes compañeros de trabajo y no solamente compañeros, sino excelentes amigos. A Raúl Madrid, por ayudarnos justo cuando más necesitábamos.

Al Dr. Hoyos, gracias por su dedicación, su apoyo incondicional y desinteresado, por enseñarnos a siempre ir a la vanguardia, a no quedarnos estancados en el pasado y a aspirar por cosas grandes. A la Lic. Carolina Cardoza de Hoyos, gracias por compartir sus conocimientos y tiempo con el equipo de investigación.

Dr. Alfredo Galán, muchas gracias por sus gestiones para apoyar este trabajo experimental. Al Dr. Oscar E. Argueta, gracias por sus enseñanzas, su tiempo y colaboración.

René, Gloria, Flora Amaya y Alfonso Sampera, gracias por su ayuda, este trabajo no hubiera sido posible sin ustedes.

A todos los que no mencioné, pero formaron parte de esto, infinitas gracias. Que Dios los bendiga,

Analydia Gutiérrez Bonilla.

A Dios por regalarme abundantes bendiciones, voluntad para seguir adelante, esperanza que cada día se puede hacer algo mejor, y por esa gota de alegría que caracterizó a todo el equipo.

A mis padres, que con su amor, comprensión y apoyo fueron fundamentales en todos los ámbitos al realizar esta investigación.

A Analydia, a quien aprecio como mi hermana, y deseo darle mil gracias por su incansable trabajo, empeño, entusiasmo y simpatía, que en conjunto fueron primordiales en la elaboración de cada idea del proyecto.

Al equipo de DMSO: Axa, Paola y Oscar por su increíble amistad, intrepidez e imaginación científica, cooperación y persistente labor, para desarrollar paso a paso este trabajo.

Al Dr. William Hoyos, por su gran interés científico y afán de desarrollar mejores médicos, así como a su esposa Lic. Carolina Cardoza de Hoyos, quien fue un soporte vital para lograr nuestro objetivo.

Al Dr. Alfredo Galán, por su apoyo y sus gestiones para poder llevar a cabo nuestras metas. Dr. Oscar E. Argueta, gracias por compartir sus amplios conocimientos de una manera sencilla y amena.

René, Gloria, Flora Amaya, Alfonso Sampera y Raúl Madrid, muchísimas gracias por su apoyo desinteresado.

Javier Padilla Funes.

INDICE

INDICE DE ILUSTRACIONES.	10
INDICE DE TABLAS.	12
INDICE DE ANEXOS.....	13
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	14
DELIMITACION DEL PROBLEMA.	15
JUSTIFICACION	16
OBJETIVOS.....	18
OBJETIVO GENERAL.....	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
MARCO TEÓRICO.....	19
Anatomía Renal Normal.....	19
Vasos Sanguíneos.....	20
Glomérulos.....	21
Túbulos.	22
Intersticio.	22
Fisiología renal.	23

La nefrona: la unidad funcional del riñón.....	23
Filtración glomerular.	24
Reabsorción y secreción.	25
Reabsorción y secreción a lo largo de las distintas porciones de la nefrona.	25
Reabsorción tubular proximal.	25
Secreción por el túbulo proximal.	26
Transporte de agua y solutos por el asa de Henle.	26
Túbulo distal.....	27
Ultima porción del túbulo distal y túbulo colector cortical.	27
Conducto colector medular.	28
Injuria renal aguda.	29
Epidemiología.....	33
Marcadores bioquímicos de daño renal.....	34
Creatinina sérica.	34
NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin).	35
Cistatina C.....	35
Acido úrico.....	36

Fosfatasa alcalina, gama-glutamyl transpeptidasa y alanina aminotransferasa.....	37
Isoenzimas de glutatión transferasa (GST).....	37
N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG).....	38
β 2 microglobulina.....	40
RBP (retinol binding protein).....	40
Cistatina C.....	40
Aminoglucósidos.....	41
Radicales libres de oxígeno.....	55
Antioxidantes.....	56
Acido ascórbico y enfermedades cardiovasculares.....	60
Acido ascórbico y cáncer.....	61
Acido ascórbico e injuria renal aguda.....	62
Histopatología de la injuria renal aguda.....	63
SISTEMA DE HIPOTESIS.....	69
HIPOTESIS DE INVESTIGACION/OPERACIONAL (Hi).....	69
HIPOTESIS ALTERNA (Ha).....	69
HIPOTESIS NULA (Ho).....	69

METODOLOGIA.....	70
Tipo y diseño general del estudio.....	70
Diseño experimental.....	70
Grupos experimentales.....	71
Distribución de la muestra.....	72
Criterios de inclusión.....	73
Criterios de exclusión.....	73
Aleatorización de la muestra.....	73
Fases de la experimentación.....	74
Aspectos éticos.....	75
Toma de muestras.....	76
Análisis de las muestras.....	77
Análisis estadístico.....	79
Variables operacionales.....	80
RESULTADOS.....	82
Creatinina Sérica.....	82
Resultados intragrupo.....	84

Resultados intergrupo	86
N-acetil β -D glucosaminidasa NAG.....	88
Análisis intragrupo.	88
Análisis intergrupo.	89
Histopatología Renal.....	90
Hallazgos macroscópicos.....	90
Hallazgos incidentales.	91
Hallazgos en Grupo Control.	92
Estadificación de daño tubular proximal.	95
Análisis estadístico.	96
DISCUSION.....	97
CONCLUSIONES.....	101
RECOMENDACIONES.....	102
PRESUPUESTO.....	103
CRONOGRAMA.....	105
ANEXOS.....	107
REFERENCIAS.....	127

INDICE DE ILUSTRACIONES.

Ilustración 1. Anatomía Renal.	20
Ilustración 2. La nefrona	28
Ilustración 3. Criterios de RIFLE.....	30
Ilustración 4. Alteraciones ultraestructurales inducidas en las células del túbulo próxima durante el tratamiento con AMG.....	48
Ilustración 5. Mecanismos de citotoxicidad de gentamicina.....	50
Ilustración 6. Efectos glomerulares de la gentamicina.....	53
Ilustración 7. Amplificación de la respuesta inflamatoria tubular, glomerular y vascular por gentamicina.....	54
Ilustración 8. Fármacos y químicos asociados a injuria renal aguda	64
Ilustración 9. Sitios de daño renal en la nefrona	65
Ilustración 10. Dilatación tubular y aplanamiento de células del epitelio tubular.....	67
Ilustración 11. A. Regeneración epitelial tubular con evidencia de actividad mitótica. B. Micrografía electrónica que muestra inclusiones laminares de fosfolípidos, típicamente encontrados en el citoplasma de la célula tubular luego de tratamiento con gentamicina.....	68
Ilustración 12. Distribución de conejos en sus cajas metabólicas, con sus depósitos de agua y de comida respectivos y los depósitos para la recolección de orina.....	75

Ilustración 13. Toma de muestras sanguíneas a través de acceso venoso.....	76
Ilustración 14. Kit enzimático NAG	78
Ilustración 15. Conejo Sham #6. Hallazgo incidental de microquiste renal visto al microscopio de luz, tinción hematoxilina-eosina (magnificación 4x)	92
Ilustración 16. Conejo Sham #1. Hallazgo incidental de dilatación y congestión vascular, visto al microscopio de luz, tinción hematoxilina-eosina (magnificación 40x)	92
Ilustración 17. Hallazgos histopatológicos de necrosis tubular aguda.....	93

INDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Niveles de afección y causas de daño renal	32
Tabla 2. Biomarcadores de daño renal. Proteínas de BPM	39
Tabla 3. Factores de riesgo de los AMG relacionados al paciente, tratamiento y fármacos concomitantes	43
Tabla 4. Alteraciones en la corteza renal inducidas por los AMG	44
Tabla 5. Clasificación de antioxidantes.....	57
Tabla 6. Distribución de la muestra	72
Tabla 7. Variables operacionales.	80
Tabla 8. Estadificación de daño renal según RIFLE/Distribución porcentual por grado de daño	86
Tabla 9. Hallazgos histopatológicos por grupo de experimentación.	94
Tabla 10. Presupuesto	103
Tabla 11. Cronograma de trabajo.....	105

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Volumen urinario y gasto urinario por día y por sujeto de experimentación	107
Anexo 2. Escala de daño tubular (Houghton y cols) Escala de daño tubular.....	123
Anexo 3. Valores absolutos Cr-S, NAG // Escala de daño histopatológico y RIFLE por grupo de experimentación y sujeto.....	124
Anexo 4. Caja metabólica.....	126

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Desde su introducción al arsenal terapéutico en 1944, los aminoglucósidos se han caracterizado por ser un grupo de antibióticos ampliamente utilizados alrededor del mundo para el manejo de infecciones por bacterias gram negativas(1). Su estructura catiónica, la cual depende del número de grupos amino en su estructura, juega un papel importante dentro de su toxicidad, afectando principalmente al riñón y al oído.

De todos los pacientes que se someten a tratamiento con aminoglucósidos un aproximado de 10 a 25% pueden llegar a presentar daño renal (1). A pesar de esto, siguen constituyendo uno de los grupos de antibióticos más usados, debido a su espectro, rápido efecto bactericida, estabilidad química, y bajo costo, característica que resulta importante en sistemas de salud de países en vías de desarrollo como El Salvador.

La multiplicidad de conceptos referentes al daño renal agudo, dio paso al consenso promovido por la Iniciativa de Calidad de Diálisis Aguda (ADQI), en donde se propuso la estaficación del daño mediante el uso del acrónimo RIFLE (Risk, Injury, Failure, Loss, End Stage Kidney Disease).

Dentro de los mecanismos fisiopatológicos del daño renal por AMG, se ha comprobado que estos aumentan la producción de radicales libres de oxígeno, los cuales inducen daño en las estructuras celulares, llevando como consecuencia final, la muerte de la célula; además de inducir contracción vascular y mesangial y contribuir al proceso inflamatorio.(2)

Es importante establecer entonces: La aplicación de un antioxidante como el ácido ascórbico, ¿Reducirá el daño renal generado por gentamicina?

DELIMITACION DEL PROBLEMA.

El estudio plantea la posibilidad del uso terapéutico del ácido ascórbico como antioxidante en un modelo de daño renal inducido por gentamicina en conejos, debido a los radicales libres de oxígeno que juegan un papel importante dentro de la fisiopatología del daño renal por aminoglicosidos.

Las unidades experimentales serán conejos machos de raza Nueva Zelanda con peso entre 1.5 ± 0.5 kg, a los cuales se les inducirá daño renal con gentamicina a dosis de 80 mg/kg/día, vía I.M., concomitantemente se les administrará ácido ascórbico a dosis de 200 mg/kg/día vía intraperitoneal. Se medirá el gasto urinario de cada conejo diariamente. Posteriormente, serán cuantificadas los siguientes biomarcadores: creatinina sérica y NAG (N-acetil- β -D glucosaminidasa) en orina, al 1º día, 3º día y 5º día de la fase experimental. Finalmente se realizarán nefrectomías para el análisis histopatológico de cada riñón.

La fase experimental será realizada en los laboratorios pertenecientes a la Escuela de Medicina de la Facultad de Ciencias de la Salud Dr. Luis Edmundo Vásquez, ubicados en el Campus I.

JUSTIFICACION

La Falla Renal Aguda constituye un síndrome en el que se evidencia la caída rápida de la función renal. Dicho síndrome se hace presente en un porcentaje que oscila entre el 1% y el 25% del total de los pacientes hospitalizados. La mortalidad asociada a pacientes en unidades de cuidados intensivos es variada según los estudios y comprende cifras porcentuales entre el 28% y el 90%.

Una de las principales causas de daño renal agudo es la administración de medicamentos, principalmente en el ámbito intrahospitalario. Dentro de los fármacos más utilizados se encuentran los antibióticos y entre ellos los AMG, quienes forman parte fundamental en el tratamiento de infecciones por bacterias Gram negativas.

Dentro de los mecanismos de nefrotoxicidad por AMG se encuentran:

- Muerte de las células tubulares.
- Alteraciones subletales en la reabsorción tubular.
- Daño glomerular.
- Stress oxidativo (Rol de los radicales libres de oxígeno).(3)

El papel de los radicales libres de oxígeno en el daño renal generado por aminoglicósidos está bien determinado y estudiado, ante esta situación se plantea la utilización del ácido ascórbico que mediante

sus propiedades antioxidantes, podría utilizarse como agente aminorador de la lesión en un modelo animal de nefrotoxicidad inducida por gentamicina en conejos. (4)

Este modelo estará constituido por tres grupos de 8 conejos cada uno, dividiéndose en grupo control de falla renal por gentamicina, grupo SHAM (de cambios ficticios) y grupo experimental de ácido ascórbico. Las variables a medir y a evaluar entre cada grupo serán Creatinina sérica, gasto urinario, N-acetilglucosaminidasa en orina y daño histopatológico. Las determinaciones de Creatinina sérica serán valoradas mediante los criterios de RIFLE para fallo renal agudo.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto nefroprotector del ácido ascórbico en un modelo animal de daño renal inducido por gentamicina, mediante la evaluación enzimática de N-acetil glucosaminidasa (NAG), clasificación de RIFLE y hallazgos histopatológicos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar un modelo de daño renal en inducido por gentamicina.
- Evaluar el efecto protector del ácido ascórbico en el daño renal agudo causado por gentamicina mediante la evaluación de parámetros bioquímicos.
- Evaluar el efecto protector del ácido ascórbico en el daño renal agudo causado por gentamicina mediante la evaluación del gasto urinario.
- Evaluar el efecto protector del ácido ascórbico en el daño renal agudo causado por gentamicina mediante la evaluación de parámetros enzimáticos: NAG (N-Acetil-β-D glucosaminidasa).
- Identificar los cambios histopatológicos en la lesión renal por gentamicina.

MARCO TEÓRICO

Anatomía Renal Normal

Los dos riñones están situados en la pared posterior del abdomen, por fuera de la cavidad peritoneal. En un ser humano adulto, cada riñón pesa unos 150 g. la cara interna de cada riñón tiene una región en forma de muesca, llamada hilio, a través del cual pasan la arteria y la vena renal, los linfáticos, los nervios y el uréter. Si se practica un corte de los riñones de arriba abajo, las dos regiones principales que pueden verse son la *corteza* externa y la región interna llamada *medula*. La medula está dividida en numerosas masas de tejido de forma cónica llamadas *pirámides renales*. La base de cada pirámide nace en el límite entre la corteza y la medula y termina en la *papila* que penetra en el espacio de la *pelvis renal*, una prolongación de la parte superior del uréter que tiene forma de embudo. El borde externo de la pelvis se divide en pequeñas bolsitas de extremos abiertos llamadas *cálices mayores*, las cuales se extienden por abajo y se dividen en los *cálices menores*, que recogen la orina de los túbulos de cada papila. Las paredes de los cálices, la pelvis y el uréter tienen elementos contráctiles que propulsan la orina hacia la vejiga, donde la orina se almacena hasta que se vacía con la micción.

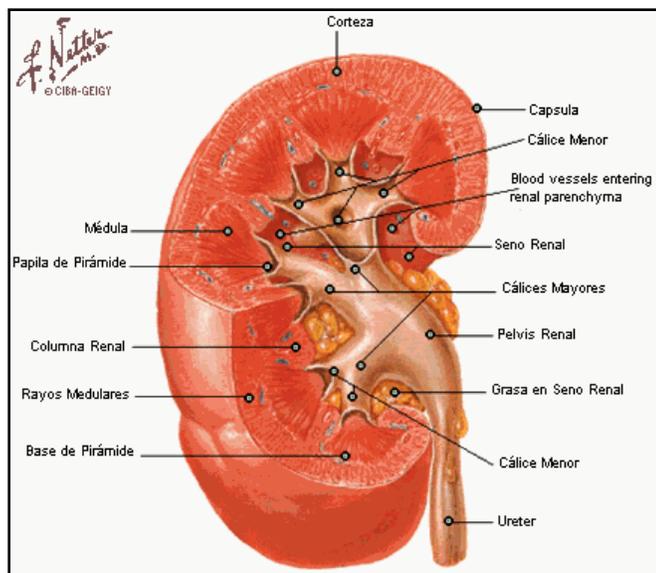


Ilustración 1. Anatomía Renal.

Tomado de: Atlas de Anatomía Humana. Netter.

Desde el punto de vista de las enfermedades renales, el riñón puede dividirse en cuatro componentes: vasos sanguíneos, glomérulos, túbulo e intersticio(5).

Vasos Sanguíneos.

Los riñones son ricamente vascularizados, y aunque solo representan el 0.5% del peso corporal total, reciben aproximadamente el 25% del gasto cardiaco, en donde, la corteza recibe aproximadamente el 90% de la irrigación renal(5).

La arteria renal entra en el riñón a través del hilio, y luego, se ramifica sucesivamente para formar las *arterias interlobulares*, las *arterias arciformes*, las *arterias interlobulillares* (llamadas también arterias radiales) y las *arteriolas aferentes*, que dan lugar a los *capilares glomerulares*, donde se filtra gran cantidad de líquido y de solutos (excepto las proteínas del plasma) para empezar a formar la orina. Los extremos distales de los capilares de cada glomérulo confluyen y forman la *arteriola eferente*, que da lugar a una segunda red capilar formada por los *capilares peritubulares*, que rodean a los túbulos renales. Las arteriolas eferentes de las nefronas superficiales forman una rica red vascular que rodea a los túbulos corticales, mientras que más profundamente los glomérulos yuxtamedulares dan lugar a los vasa recta, que descienden directamente para irrigar las zonas interna y externa de la medula. Después los vasa recta arteriales descendentes forman varias asas en la parte más interna de la medula y ascienden como vasa recta venosa.

Ajustando las resistencias de las arteriolas aferentes y eferentes, los riñones pueden regular las presiones hidrostáticas tanto en los capilares glomerulares como en los peritubulares, modificando de esa manera la filtración glomerular, la reabsorción tubular, o de una y otra, para responder a las demandas homeostáticas del organismo(6).

Glomérulos.

Los glomérulos están formados por una red anastomosada de capilares revestidos por un endotelio fenestrado dotado de dos envolturas epiteliales. El epitelio visceral se incorpora a la pared capilar y se convierte en parte intrínseca de la misma, quedando separado de las células endoteliales por una membrana basal. El epitelio parietal, situado en la capsula de Bowman, reviste el espacio urinario, cavidad donde se recoge inicialmente el filtrado del plasma.

La pared de los capilares glomerulares es la membrana que actúa como filtro y consta de las siguientes estructuras:

- Células endoteliales fenestradas.
- Membrana basal glomerular.
- Células epiteliales viscerales (podocitos)
- Células mesangiales.

Túbulos.

La estructura de las células epiteliales de los túbulos renales varía considerablemente según los distintos segmentos de la nefrona y, hasta cierto punto, guarda relación con su función.

El aparato yuxtaglomerular está íntimamente adosado al glomérulo en el punto por donde penetra la arterial aferente. El aparato yuxtaglomerular consta de: células yuxtaglomerulares, macula densa y las células lacis o no granuladas. Este aparato es un órgano endocrino en miniatura, siendo las células yuxtaglomerulares la principal fuente de producción de renina por el riñón.

Intersticio.

En la corteza normal, el espacio intersticial es compacto, y está ocupado por los capilares peritubulares fenestrados y un pequeño número de células parecidas a los fibroblastos. Cualquier aumento evidente del intersticio cortical suele ser anormal; este aumento puede deberse a edema o infiltración por células de la inflamación aguda, como en las enfermedades intersticiales agudas, o puede ser causado

por el acumulo de células de la inflamación crónica y tejido fibroso, como en las enfermedades intersticiales crónicas.

Fisiología renal.

La nefrona: la unidad funcional del riñón.

En el ser humano, cada riñón está formado por un millón de nefronas, aproximadamente; todas ellas son capaces de formar orina. El riñón no puede regenerar nefronas nuevas; por lo tanto, las lesiones o las enfermedades renales, o el envejecimiento normal, producen una pérdida progresiva del número de nefronas.

Cada nefrona contiene:

1. Un penacho de capilares glomerulares, denominado *glomérulo*, a través del cual se filtran grandes cantidades de líquido de la sangre.
2. Un largo *túbulo* en el que el líquido filtrado se convierte en orina en su recorrido hacia la pelvis renal.

Los capilares glomerulares están recubiertos por células epiteliales, y la totalidad del glomérulo está revestido por la *capsula de Bowman*. El líquido que se filtra en los capilares glomerulares discurre por el interior de la capsula de Bowman y, luego, por el túbulo proximal, que se encuentra en la corteza del riñón. Desde el túbulo proximal el líquido fluye al interior del *asa de Henle* que se hunde en la medula renal. Cada asa está formada por una *rama descendente* y una *rama ascendente*. Las paredes de la rama descendente y el extremo inferior de la rama ascendente son muy delgadas, por eso se les llama *segmento delgado del asa de Henle*. Después de que la rama ascendente del asa haya retrocedido

parcialmente hacia la corteza, sus paredes se vuelven tan gruesas como las del resto del sistema tubular y por eso se llama *segmento grueso de la rama ascendente*.

Al final de la rama ascendente gruesa hay un segmento corto que, en realidad, es una placa situada en la pared, que se conoce como *macula densa*. Pasada la macula densa, el líquido atraviesa el *túbulo distal* que, al igual que el *túbulo proximal*, se encuentra en la corteza renal. El túbulo distal va seguido del *túbulo de conexión* y del *túbulo colector cortical*, que termina en el *conducto colector cortical*. Las partes iniciales de 8 ó 10 conductos colectores corticales se juntan para formar un solo conducto colector más grande que discurre hacia abajo, penetra en la medula y se convierte en el *conducto colector medular*. Los conductos colectores confluyen para formar conductos cada vez mayores que, finalmente, vacían su contenido en la pelvis renal en la punta de las *papilas renales*. En cada riñón hay unos 250 conductos colectores muy grandes, cada uno de los cuales recoge la orina de unas 4000 nefronas(6).

Filtración glomerular.

La formación de la orina comienza con la filtración de grandes cantidades de líquido a través de los capilares glomerulares a la capsula de Bowman. El filtrado glomerular carece prácticamente de proteínas y de elementos celulares, incluidos los hematíes. La concentración de otros constituyentes del filtrado glomerular, como la mayoría de las sales y las moléculas orgánicas, es semejante a las concentraciones del plasma. En el adulto normal, la tasa de filtración glomerular (TFG) es, en promedio, de 125 mL/min, o sea, unos 180 L/día, esto significa que el plasma puede ser filtrado y procesado unas 60 veces cada día(6).

Reabsorción y secreción.

Cuando el filtrado glomerular pasa por los túbulos renales, atraviesa sucesivamente las distintas partes del mismo: el túbulo proximal, el asa de Henle, el túbulo distal, el túbulo colector y, finalmente, el conducto colector, antes de ser excretado como orina. A lo largo de este recorrido, algunas sustancias se reabsorben selectivamente en los túbulos, volviendo a la sangre, mientras que otras son secretadas desde la sangre a la luz tubular. Finalmente, la orina ya formada y todas las sustancias que contiene, representan la suma de los tres procesos básicos que se producen en el riñón: la filtración glomerular, la reabsorción tubular y la secreción tubular, del modo siguiente:

Excreción urinaria = Filtración glomerular – Reabsorción tubular + Secreción tubular.

Reabsorción y secreción a lo largo de las distintas porciones de la nefrona.

Reabsorción tubular proximal.

Las células epiteliales del túbulo proximal gozan de intensa actividad metabólica y tienen gran número de mitocondrias que sostienen sus extensos procesos de transporte activo. Además, las células tubulares tienen un extenso borde en cepillo en el lado de la luz de la membrana, así como un amplio laberinto de conductos intracelulares y basales, elementos todos que proporcionan una extensa área superficial a la membrana de los lados luminal y basolateral del epitelio que permite el transporte rápido de los iones sodio y de otras sustancias. En la *primera mitad de túbulo proximal*, el sodio se reabsorbe por cotransporte junto con la glucosa, los aminoácidos y otros solutos. Pero en la segunda mitad del túbulo proximal queda poca glucosa y aminoácidos para reabsorberse, y por eso aquí el sodio se reabsorbe sobre todo junto con los iones cloruro. En la *segunda mitad del túbulo proximal*, la mayor concentración de cloruro favorece la difusión de este ion desde la luz del túbulo a través de uniones intercelulares, y al líquido intersticial renal(6).

Secreción por el túbulo proximal.

El túbulo proximal es también un sitio importante para la secreción de ácidos y bases orgánicas, tales como las sales biliares, oxalato, urato y catecolaminas. La secreción de estas sustancias en el túbulo proximal mas la filtración al túbulo proximal por los capilares glomerulares y la ausencia casi total de reabsorción por los túbulos, contribuyen, todos ellos conjuntamente, a su rápida excreción por la orina(6).

Transporte de agua y solutos por el asa de Henle.

El asa de Henle está formada por tres porciones funcionalmente distintas: la *porción descendente delgada*, la *porción ascendente delgada* y la *porción ascendente gruesa*. La porción descendente delgada y ascendente delgada, tienen membranas epiteliales finas sin borde en cepillo, con pocas mitocondrias y grados mínimos de actividad metabólica. La parte descendente de la porción delgada es muy permeable al agua y moderadamente permeable a la mayoría de solutos, incluidos la urea y el sodio.

La porción gruesa del asa de Henle, tiene gruesas células epiteliales dotadas de gran actividad metabólica y capaces de reabsorber activamente sodio, cloruro y potasio. Alrededor del 25% de las cargas filtradas de sodio, cloruro y potasio se reabsorben en el asa de Henle, haciéndolo en su mayor parte en la porción ascendente gruesa del asa. También se reabsorben cantidades considerables de otros iones, como calcio, bicarbonato y magnesio(6).

Túbulo distal.

Esta porción, reabsorbe con avidez la mayoría de iones, como el sodio, potasio y cloruro, pero es prácticamente impermeable al agua y la urea. Por esta razón, se la denomina *porción diluyente* porque también diluye el líquido tubular(6).

Ultima porción del túbulo distal y túbulo colector cortical.

1. Las membranas tubulares de ambas porciones son impermeables casi por completo a la urea.
2. Reabsorben iones sodio y la tasa de reabsorción está controlada por hormonas, especialmente por aldosterona. Al mismo tiempo, secretan iones potasio procedentes de la sangre de los capilares peritubulares y los vierten en la luz tubular, proceso que también está controlado por la aldosterona y por otros factores, como la concentración de iones potasio en los líquidos corporales.
3. Las células intercaladas de estas porciones de la nefrona secretan intensamente iones hidrogeno gracias al mecanismo activo de la ATPasa de hidrogeno. Esto juega un papel esencial en la regulación ácido básica de los líquidos corporales.
4. La permeabilidad al agua de estas porciones de la nefrona está controlada por la concentración de la hormona antidiurética ADH. Cuando existen niveles elevados de ADH, estas porciones del túbulo son permeables al agua, pero si no hay ADH, son prácticamente impermeables al agua. Este rasgo especial constituye un importante mecanismo de control del grado de dilución o de concentración de la orina(6).

Injuria renal aguda.

La injuria renal aguda (AKI) es un síndrome clínico caracterizado por disminución rápida de la función renal, que provoca incapacidad para la excreción de compuestos nitrogenados, así como el mantenimiento del balance hidroelectrolítico, y el equilibrio ácido-base. Generalmente ésta suele ser reversible. La Acute Dialysis Quality Initiative (Iniciativa de calidad de diálisis aguda - ADQI por sus siglas en inglés), conformada por intensivistas y nefrólogos, publicaron una definición de AKI, en lugar del concepto de fallo renal agudo (FRA), para el cual no había un consenso de definición por la vasta cantidad de información que comprende. La ADQI propuso el acrónimo conocido como RIFLE (*Risk, Injury, Failure, Loss, End Stage Kidney Disease*)(7) para dar a conocer de manera más detallada las etapas de la injuria renal.

La injuria renal aguda se ha documentado en hasta 7% de pacientes hospitalizados, siendo esta una importante causa de estancia intrahospitalaria y de mortalidad(8). En efecto, Chertow et. al encontraron que un aumento en los niveles de creatinina sérica mayor o igual a 2.0 mg/dL se asocia con un incremento aproximado de \$34.000 en gastos hospitalarios por paciente.(9)

El término de AKI es un concepto reciente y revolucionario por ser dinámico al valorar el daño renal, extendiéndose desde la fase de inicio, el mantenimiento, hasta la recuperación o etapa terminal del mismo(7)(10). Cada fase del daño renal tiene su propia severidad y duración, existiendo así diferentes estadios del funcionamiento del filtrado renal por lo tanto, la AKI puede presentarse oligúrico o no oligúrico, con o sin necrosis tubular, teniendo súbitos o lentos incrementos en los niveles séricos de los cuerpos nitrogenados(11).

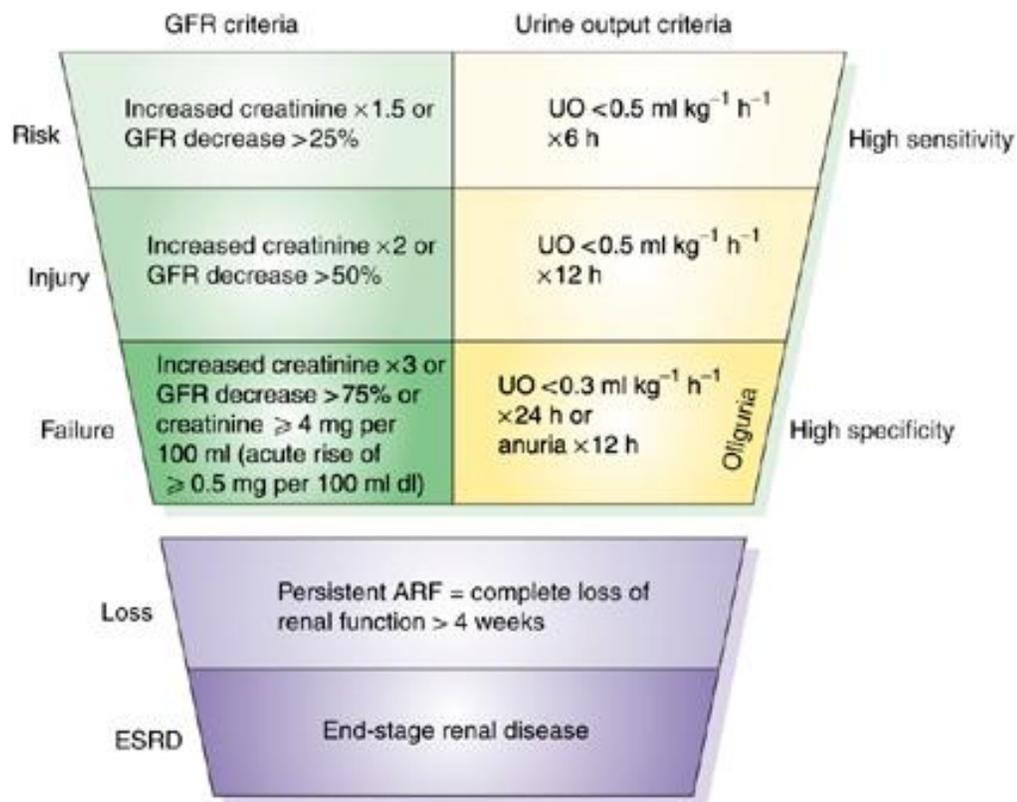


Ilustración 3. Criterios de RIFLE

Tomado de: The RIFLE criteria and mortality in acute kidney injury: A systematic review. *Kidney Int.* 73, 538-546 (March (1) 2008)

El gráfico anterior muestra una pirámide invertida, en la cual se identifican diversas etapas de AKI, dividiéndose en riesgo, daño, fallo, pérdida de la función y etapa terminal. Al mismo tiempo la porción superior (etapas tempranas) se clasifica de acuerdo a criterios de filtración renal glomerular y a criterios de gasto urinario. Los primeros tres criterios (riesgo, injuria y falla) hacen referencia al aumento de severidad del cuadro renal. Los últimos dos (pérdida de la función, fase terminal) tratan acerca de las consecuencias/pronóstico del síndrome. Es por esta razón que el término AKI pretende

hacer énfasis en la reversibilidad de la injuria, previo a las fases de pérdida de función. (7)(11)(12). Hoste et. al observó que de acuerdo a las definiciones de las primeras tres etapas según la clasificación de RIFLE, la tasa de mortalidad aumentó en 8.8%, 11.4% y 26.3% respectivamente(13).

Los mecanismos principalmente implicados son(14):

- Injuria endotelial por alteraciones vasculares
- Efecto directo de nefrotoxinas
- Disminución/abolição de la autoregulación renal
- Formación de mediadores pro-inflamatorios

La necrosis y apoptosis celular lleva a obstrucción de los túbulos renales, que contribuye a la reducción de la tasa de filtración glomerular (GFR). Además, los niveles de calcio intracelular, en respuesta al daño tubular, sufren un notable incremento, produciendo una cascada de señalización intracelular que culmina con el feedback túbulo-glomerular (TGF), disminuyendo en mayor cantidad la GFR(11)(15). Mediadores vasculares e inflamatorios, provocan finalmente un menor flujo sanguíneo renal, con mayor disminución de la GFR y aumento en las especies reactivas de oxígeno (ROS). Como consecuencia la injuria renal incrementa si no se maneja adecuadamente la causa de instauración.

La Injuria Renal Aguda (AKI) se clasifica según su causa, siendo así prerrenal, por hipoperfusión renal, y que se acompaña a su vez por retención de cuerpos nitrogenados (azoemia); renal, por causas

que afectan directamente al parénquima renal y consecuentemente la función de filtrado e intercambio iónico y molecular; y postrenal, por patologías obstructivas del tracto urinario.(15)(16).

El síndrome prerrenal suele ser la causa más común de AKI que suele presentarse en diversas situaciones, tales como hipovolemia, disminución de la función cardíaca, vasodilatación generalizada o vasodilatación intrarrenal, hemorragias, quemaduras. Sin embargo existen otras causas de importancia para provocar AKI como la afección por toxinas, endógenas y exógenas, y entre ellas los antibióticos.

Tabla 1. Niveles de afección y causas de daño renal

Nivel de afección	Causa del daño renal
Afección de vasos renales glomerulares y de microvasculatura	Arteriales. Trombosis, arterioembolismos, vasculitis. Venosos. Trombosis, compresión. Inflamatorios. Glomerulonefritis, vasculitis, radiación.
Afección de los túbulos renales	Vasoespásticos. Hipertensión maligna, toxemia del embarazo, escleroderma, hipercalcemia, drogas, agentes de contraste. Hematológicos. Síndrome hemolítico urémico, purpura trombocitopénica, coagulación vascular diseminada, síndrome de hiperviscosidad.
Afección del intersticio tubular	Isquemia por hipoperfusión. Toxinas exógenas. Antibióticos, antioncóticos, venenos. Toxinas endógenas. Mioglobulina, mielomas, ácido úrico. Nefritis intersticial alérgica. Infecciones. Infiltrados. Linfomas, leucemias.

Tomado de: Clarkson M. Friedewald. Acute Kidney Injury. En Brenner and Rector's: The Kidney, 8a Ed., Elsevier, 2008

Epidemiología.

La lesión renal aguda (IRA) es un problema clínico frecuente y devastadora con una mortalidad hospitalaria entre 28% -90% en cuidados intensivos. La nefrotoxicidad inducida por drogas desempeña un papel importante en la alta incidencia y prevalencia de la falla renal aguda en pacientes tanto hospitalizados como no hospitalizados.(18)

La tasa de incidencia de la insuficiencia renal aguda (IRA) en todo el mundo no es bien conocida. Estudios recientes en los Estados Unidos y España han demostrado la incidencia que varía entre un promedio de 23.8 casos por cada 1000 egresos con un incremento del 11% anual entre 1992 y 2001. Más recientemente, Ali et al. Reportaron una incidencia de 1811 casos de IRA por millón de habitantes durante el año 2003. La diversidad de datos que se manejan en diferentes países crea confusión acerca de la verdadera magnitud del problema(19).

Marcadores bioquímicos de daño renal.

La injuria renal aguda se presenta en una gran cantidad de pacientes en servicios hospitalarios y cuidados intensivos. Debido a su aparición repentina y daño potencialmente grave, se han propuesto e investigado una serie de parámetros para llevar un control adecuado del estado funcional del riñón. A estos parámetros se les ha denominado marcadores de daño renal. Existen una gran cantidad de marcadores que pueden ser medidos a través de su presencia en fluidos corporales, principalmente en sangre y orina, sin embargo no todos cuentan con características que les permitan ser de uso óptimo en el campo. Entre estas propiedades figura: la facilidad de obtener la muestra (no invasiva), detectable en sangre y orina, ser altamente sensible y específico para injuria renal aguda, detectable en estadio temprano, medible rápidamente, ser parámetro de confianza para AKI, ser marcador de injuria así como de función, ser predictivo de injuria y reversibilidad, no ser afectado por otras variables biológicas y sobre todo un precio accesible. Todos estos atributos en conjunto representarían un marcador bioquímico ideal(20).

Marcadores séricos.

Creatinina sérica.

Constituye uno de los marcadores séricos más utilizados de rutina. Sin embargo, se ha comprobado que la medición de creatinina sérica (Cr-S) no es un marcador decisivo para diagnosticar AKI por las siguientes razones:

1. Elevaciones de Cr-S no son específicas para AKI y requiere diferenciación de otras causas prerrenales o extra renales de azoemia.
2. No es específica de lesión tubular, sino que refleja la pérdida de la filtración glomerular, la cual acompaña el desarrollo de AKI.
3. Incrementos en Cr-S son detectados posterior a los cambios en la tasa de filtración glomerular.
4. Cr-S es un marcador pobre de la disfunción renal, los cambios en sus concentraciones no son sensibles, ni específicos en respuesta a ligeras alteraciones en la tasa de filtración glomerular, y se detectan cuando el riñón ha perdido 50% de su capacidad funcional.
5. Cambios en la concentración de Cr-S pueden ser influenciados por otros factores, los cuales no están directamente relacionados con daño renal, como la edad, sexo, masa corporal, estado nutricional y de hidratación(20).

NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin).

Proteína de 25-kDa ligada a la gelatinasa de los neutrófilos. Ha surgido como un marcador sensible, específico y altamente predictivo de AKI. Se acumula tanto a nivel sistémico como a nivel renal. Una disminución en la TFG, se acompaña de una disminución de la depuración renal de NGAL, lo cual resulta en una acumulación de este en sangre. Concentraciones séricas de NGAL por encima de 25 g/l predijeron AKI en niños(20).

Cistatina C.

Es un marcador endógeno de la función renal. Es detectado en suero antes que la Cr-S. Es utilizado tanto para diagnosticar disfunción renal como para monitorear su progreso a AKI. La Cistatina C es un inhibidor de proteasa de cisteína sintetizado por todas las células nucleadas. Esta es filtrada

libremente por el glomérulo, reabsorbida completamente por las células epiteliales del túbulo contorneado proximal. A diferencia de la creatinina sérica, los niveles de cistatina C no son afectados por variables tales como género, edad, raza o masa muscular. Las concentraciones séricas de este biomarcador pueden detectar disfunción renal en pacientes críticamente enfermos con AKI 24-48 horas antes que las mediciones de Cr-S. Sin embargo, cistatina C no es un marcador específico para AKI, ya que es un marcador inicial de una filtración glomerular alterada, en lugar de ser marcador de una lesión tubular(20).

Acido úrico.

Puede ser un marcador simple de AKI inminente, debido a que su concentración se ve aumentada tanto por un incremento en su producción, como también por una disminución en la filtración glomerular. El incremento de la filtración glomerular del acido úrico resulta en una super saturación de éste en el fluido intratubular, con su consecuente cristalización, que conlleva a una oclusión intra tubular y una respuesta inflamatoria local, con infiltración de células inflamatorias. Además de ser un biomarcador, el acido úrico es un indicador biológicamente activo de daño a la microvasculatura renal, regula los niveles endoteliales de oxido nítrico (ON), inhibe la proliferación y migración de células epiteliales, causando apoptosis de las células endoteliales y estimulación de los agentes pro inflamatorios: proteína C reactiva y monocyte chemoattractant protein 1(20).

Marcadores urinarios.

Los biomarcadores para AKI medidos en orina deben de tener las siguientes características(20):

1. Especificidad diagnostica para detectar lesiones de los túbulos renales.

2. Detectar de manera temprana lesiones renales (antes de que ocurran elevaciones de Cr-S o BUN).
3. Su concentración en orina debe estar relacionada a la agudeza de la enfermedad renal.
4. Predecir el desarrollo de la enfermedad y progreso.
5. Facilitar decisiones tempranas para seleccionar el tratamiento adecuado.

A su vez, los biomarcadores se clasifican en 3 grupos(20):

1. Enzimas liberadas de las células tubulares necróticas/apoptóticas, dañadas o disfuncionales, liberadas a la orina.
2. Proteínas urinarias de bajo peso molecular (<40 kDa), cuya presencia en orina indica una reabsorción alterada por las células del túbulo proximal
3. Proteínas producidas en el riñón en el curso de AKI.

Enzimas de origen renal.

Fosfatasa alcalina, gama-glutamyl transpeptidasa y alanina aminotransferasa.

Son producidas en el borde en cepillo. El incremento en su excreción en la orina indica daño en la membrana de borde en cepillo, con pérdida de las micro vellosidades(20).

Isoenzimas de glutatión transferasa (GST).

Son enzimas citoplasmáticas. GST α se forma en las células epiteliales del túbulo proximal, mientras que GST γ proviene del túbulo distal. Un incremento en la excreción renal de estas, puede indicar la localización de la lesión(20).

N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG).

Enzima lisosomal que posee las siguientes características:

1. Es la glucosidasa mas activa en los lisosomas de las células epiteliales de los túbulos proximales, por lo cual constituye un marcador urinario específico de daño tubular.
2. Su peso molecular es relativamente alto (>130 kDa), lo cual evita que sea filtrada por el glomérulo.
3. En el curso de la enfermedad renal, sus niveles permanecen elevados(20).
4. Estable a cambios de temperatura y de pH.

Consiste en diferentes isoenzimas. Las 2 isoenzimas principales están presentes en el riñón y el hígado, la forma A ácida y la B básica, respectivamente. La orina de sujetos saludables contiene una pequeña cantidad de NAG, con una relación de isoenzima A: isoenzima B de 4:1 a 10:1. Mientras que en pacientes con daño tubular e intersticial, se detecta una alteración en esta relación, siendo más elevada la isoenzima B(21)

Métodos para medir la actividad de NAG.

- Método fluorimétrico.
- Método espectrofotométrico.
- Método colorimétrico.

Los valores de NAG deben de ser expresados en relación a la concentración sérica de creatinina(21).

La excreción de enzimas en la orina constituye un marcador muy sensible de daño tubular renal, y está directamente relacionado a un incremento en la concentración sérica de creatinina y a una disminución en la TFG. La enzimuria ocurre antes y es más sensible que la proteinuria tubular; sin embargo, el valor predictivo de estas para AKI es relativamente bajo.

El uso de estas enzimas está justificado en la fase temprana de la enfermedad, cuando el paciente ingresa al hospital o 4 días antes que se eleven los biomarcadores sanguíneos de la función renal. Esto contribuiría a identificar pacientes en riesgo de AKI, permitiendo de esta manera, un tratamiento temprano(20).

Proteínas de bajo peso molecular.

Tabla 2. Biomarcadores de daño renal. Proteínas de BPM

Proteína	Descripción
α1 microglobulina.	Proteína de 31 kDa, sintetizada en el hígado, se liga a la inmunoglobulina A en el suero. Su forma libre es filtrada por el glomérulo y reabsorbida en el túbulo proximal.

β 2 microglobulina.

Proteína de 12 kDa, es un homólogo de los antígenos de histocompatibilidad. Se filtra libremente por el glomérulo en la orina primaria y se ha comprobado un incremento en su concentración con agentes nefrotóxicos e hipoxia secundaria a procedimientos quirúrgicos (cirugías cardíacas o trasplante renal). Una de las dificultades técnicas con esta proteína es su inestabilidad a pH <6, por lo cual se requiere que se alcalinice la orina colectada.

RBP (retinol binding protein).

Proteína de 21 kDa, cuya función es transportar a la Vitamina A. Es filtrada fácilmente por el glomérulo, y reabsorbida casi completamente por los túbulos proximales. Una pequeña disminución de la función renal se traduce en la excreción de esta proteína en la orina. Una de sus ventajas sobre la β 2 microglobulina es que es estable en pH ácido.

Cistatina C.

Proteína con peso molecular de 13 kDa. Normalmente no es secretada por los túbulos renales. Puede ser determinada en muestras simples de orina, ya que no es afectada por las variaciones circadianas. Se ha visto un incremento de hasta 200 veces, cuando hay alteración de la función tubular renal. Entre sus ventajas, se puede mencionar que puede predecir una evolución no favorable en pacientes con AKI y la necesidad de terapia de reemplazo renal. (20)

Gasto urinario.

Se define como el volumen de orina (mL) excretado por unidad de tiempo (horas). Es uno de los parámetros más utilizados para monitorizar función renal, sin embargo, los cambios en este, no se correlacionan directamente con la severidad del daño renal.

De acuerdo al gasto urinario la falla renal aguda puede clasificarse como *no oligúrica* (más de 400 mL por día de diuresis ó > 0.5 mL/Kg/h), *oligúrica* (100 a 400 mL por día ó < 0.5 mL/Kg/h) y *anúrica* (menos de 100 mL por día ó < 0.15 mL/Kg/h).

El gasto urinario puede permanecer dentro de los rangos normales (> 400 mL/día), a pesar que exista un grado de disfunción renal, tal como, en la falla no oligúrica.

Aminoglucósidos.

Los antibióticos pertenecientes a la familia de los aminoglucósidos han sido utilizados desde la década de 1940, para tratar infecciones principalmente causadas por microorganismos Gram negativos. El primero de esta familia en ser descubierto fue la Estreptomina, proveniente del *Streptomyces griseus*, en un momento de ardua investigación posterior al descubrimiento de la penicilina a finales de la década de 1920. Su amplio espectro y eficacia han permitido que sean buenos candidatos para el manejo de infecciones severas, sobre todo en unidades de cuidados intensivos(22).

Su estructura química consiste de dos o más amino-azúcares (aminoglucósidos), conectados a un anillo aminociclitol. Se trata de moléculas de amino-azúcares unidas a un alcohol cíclico hexagonal por enlaces glucosídicos. Estos grupos amino se presentan como moléculas básicas policationicas. Esta característica química les confiere un importante efecto biológico, ya que los sitios que son cargados positivamente constituyen la razón por la cual estos agentes tienen alta afinidad por el ARN bacteriano(23).

Los aminoglucósidos son de carácter bactericida, como resultado de la inhibición de la síntesis de proteínas y la alteración de la estructura de la pared celular. Al entrar al citoplasma de bacterias sensibles, los aminoglucósidos se unen con alta afinidad a las subunidades 30S ribosomales, las cuales se encargan de la transcripción de aminoácidos, causando alteraciones significativas en la formación de nuevas cadenas, además del mantenimiento de la pared celular. Esta se vuelve fenestrada y permite la salida de organelas y citoplasma, determinando así la muerte celular y previniendo el crecimiento bacteriano(24)(22).

A pesar de su gran eficacia el uso de aminoglucósidos es limitado por sus efectos adversos: Ototoxicidad y Nefrotoxicidad. Se ha estudiado el uso del espaciamiento entre cada dosificación con el fin de disminuir los efectos tóxicos, manteniendo la respuesta antibiótica estable y controlando así el proceso infeccioso. Barclay, et. al. determinó en una revisión de 29 estudios en humanos, comparando el uso de dosificación diaria vs. dosificación múltiple cada día, utilizando aminoglucósidos. Ninguno de ellos favoreció el uso de dosificación múltiple, al contrario, en algunos se pudo observar el mismo efecto terapéutico y menos toxicidad ótica y renal, al utilizar monodosis por día(24).

Se ha demostrado que la nefrotoxicidad por AMG depende de cada individuo y las condiciones que lo afectan, por lo cual se han tomado en cuenta distintos factores de riesgo para desarrollar daño renal, entre los cuales se tomaron en cuenta: características del paciente, características del tratamiento administrado y el uso concomitante de otros fármacos(25).

Tabla 3. Factores de riesgo de los AMG relacionados al paciente, tratamiento y fármacos concomitantes

PACIENTE	TRATAMIENTO	OTROS FARMACOS
Edad avanzada	Tratamiento prolongado	AINEs
Función renal disminuida	Dosis altas	Diuréticos
Embarazo	Dosis divididas	Anfotericina
Deshidratación		Cisplatin
Reducción de la masa renal		Ciclosporin
Hipotiroidismo		Medios de contraste yodados
Disfunción hepática		Vancomicina
Acidosis metabólica		Cefalosporinas
Depleción de sodio		

Tomado de: López-Novoa JM, Quiros Y, Vicente L, Morales AI, Lopez-Hernandez FJ. New insights into the mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity: an integrative point of view. Kidney Int. 2011 Ene;79(1):33–45

Nefrotoxicidad por AMG.

La Nefrotoxicidad causada por AMG se manifiesta clínicamente como una falla renal no oligúrica, con una leve elevación en la creatinina sérica y en gasto urinario hipoosmolar, posterior a varios días de tratamiento. Aproximadamente un 5% de la dosis administrada es retenida en las células epiteliales del TRP, específicamente en las porciones S1 y S2 del túbulo(23)(26).

Los cambios principalmente observados en la célula tubular son: degeneración lisosomal con liberación de enzimas, acumulación de lípidos polares (cuerpos mieloides), pérdida del borde en cepillo de la célula, disminución de la reabsorción de las proteínas filtradas, fosfolipiduria y depuración aumentada de K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , entre otras. Posterior a estos cambios suele observarse falla renal no oligúrica, o en algunos casos poliúrica, siendo generalmente de carácter reversible al suspender la administración de AMG. Todos los cambios se presentan directamente proporcionales a la dosis utilizada y se instauran con mayor rapidez al utilizarse múltiples dosis diarias(25).

En el siguiente cuadro se enumeran las alteraciones causadas por AMG en la corteza renal:

Tabla 4. Alteraciones en la corteza renal inducidas por los AMG

A DOSIS BAJAS	A DOSIS ALTAS
---------------	---------------

ALTERACIONES TEMPRANAS	ALTERACIONES TARDIAS	<p><u>Borde en cepillo y membranas apicales.</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Pérdida de K⁺, Mg²⁺ y Ca²⁺ • Disminución de la reabsorción de agua, bicarbonato y glucosa. • Disminución del cotransporte Na⁺ y Pi y del intercambio Na⁺/H⁺ • Inhibición de fosfatidilinositol fosfolipasa C.
Acumulación de fosfolípidos en lisosomas y alargamiento de organelos.	<p><u>Alteraciones degenerativas:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Granulación de células epiteliales. • Necrosis focal, apoptosis. • Aumento de la excreción de fosfolípidos y trazas en orina. 	<p><u>Membrana basolateral.</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Alteración del transporte de ácidos y bases orgánicas. • Inhibición de Na⁺/K⁺ ATPasa. • Reducción del transporte electrogénico de Na⁺
Inhibición de las fosfolipasas y esfingomielinasas lisosomales.	<p><u>Alteraciones regenerativas:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Proteinuria, poliuria hipo osmótica. • Disminución de la TFG y aumento en la concentración sérica de Cr y BUN. 	<p>Mitocondrias.</p> <p>Alteración de la respiración y transporte de cationes. Edema.</p> <p>Alteración de actividades enzimáticas (gluconeogenesis, amoniogenesis, oxidación de ácidos tricarbóxicos).</p>
Disminución de la reabsorción y/o secuestro intracelular de lisosomas y digestión de proteínas de	<p><u>Alteraciones regenerativas:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Proliferación de células tubulares y des 	<p>Síntesis proteica.</p> <p>Inhibición de la síntesis proteica y dilatación del retículo</p>

bajo peso molecular.	diferenciación.	endoplásmico.
Liberación de enzimas lisosomales (N-acetil-glucosaminidasa) y del borde en cepillo (alanilaminopeptidasa).	<ul style="list-style-type: none"> • Dilatación tubular. • Proliferación intersticial (fibroblastos) e infiltración focal por células inflamatorias. 	Supresión de la expresión de genes para el transportador Na ⁺ /glucosa y la subunidad alfa de Na ⁺ /K ⁺ ATPasa.

Tomado de: Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM. Aminoglycosides: nephrotoxicity. Antimicrob. Agents Chemother. 1999 May;43(5):1003–12.

Mecanismos de Nefrotoxicidad. Necrosis Tubular Renal

El riñón es uno de los sitios privilegiados de acción de los AMG. En ellos se encuentran las nefronas, unidades funcionales primarias que se encargan del manejo hidroelectrolítico y mantenimiento del equilibrio ácido-base. Las estructuras de mayor fijación para los AMG son los túbulos renales, parte principal de las nefronas, y específicamente la porción proximal, donde se ha determinado una mayor concentración de acción del antibiótico. La acumulación de AMG en esta región depende de la presencia de complejo proteínico megalina-cubulina situado en el túbulo proximal y a la vez encargado de realizar endocitosis de las moléculas de ATB a la célula, además de la fijación catiónica de los AMG con dicha porción tubular(27).

Al ingresar a la célula, el ATB se transporta a través del complejo endosomal, acumulándose principalmente en los lisosomas, aparato de Golgi y retículo endoplásmico. Al saturar la capacidad de los lisosomas, su membrana constituyente colapsa, vertiendo el contenido de enzimas proteolíticas al citosol e iniciando así una cascada de reacciones que conllevan la muerte celular(28). Al interactuar directamente con la mitocondria, se activa la vía intrínseca apoptótica, impidiendo la formación de ATP, inhibiendo la respiración celular, y produciendo estrés oxidativo por medio de la producción de especies reactivas de oxígeno, tales como el anión superóxido y radicales hidroxilo. Indirectamente, la liberación de enzimas hidrolíticas, inhibe la degradación de proteína *Bax*, importante mediador pro-apoptótico(29)(30). Al impedir la degradación, se favorece la vía indirecta de muerte celular programada. Además el contenido hidrolítico lisosomal, que a su vez posee un pH ácido (aproximadamente 4.8) activa un complejo proteolítico intracelular llamado Catepsinas. Dichas proteínas reaccionan ante el pH ácido, catalizando la hidrólisis de proteínas a polipéptidos, mediado también por la familia de las caspasas, favoreciendo la vía intrínseca apoptótica. Otra vía de muerte celular se presenta por la disfuncionalidad del retículo endoplásmico, impidiendo la síntesis protéica(31). Todos estos mecanismos conllevan a la muerte celular por apoptosis, sin embargo al darse una reacción excesiva por AMG en células tubulares renales, y al tener una respuesta masiva por catepsinas, se observan cambios necróticos en los cortes histopatológicos(25)(30).

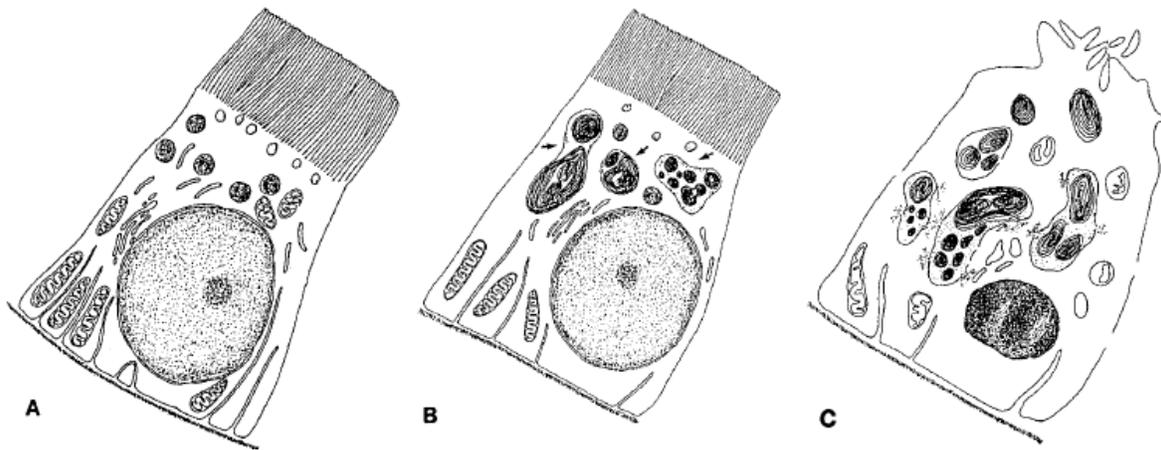


Ilustración 4. Alteraciones ultraestructurales inducidas en las células del túbulo próximo durante el tratamiento con AMG

(A) Control. Cambios tempranos a bajas dosis. (B) Alargamiento lisosomal, que ocurren por la fusión de estructuras preexistentes y que es producto de deposición progresiva de lípidos polares, que adoptan una disposición concéntrica lamelar (cuerpos mieloides); las otras estructuras subcelulares permanecen preservadas. (C) Ruptura de lisosomas (con la liberación de los cuerpos mieloides en el citosol), edema y daño mitocondrial, dilatación del retículo endoplásmico, denudación del borde en cepillo.

Tomado de: Mingeot-Leclercq M-P, Tulkens PM. Aminoglycosides: Nephrotoxicity. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999 May;43(5):1003-12.

Existen una gran cantidad de entidades que deterioran el túbulo renal proximal (TRP), sin embargo al generalizar, dos de las causas más importantes corresponden a isquemia y a toxicidad por fármacos. Al hallazgo histopatológico, suelen ser muy semejantes, encontrando desprendimiento de las células epiteliales tubulares, obstrucción/oclusión de los túbulos por detritos celulares, formación de cilindros, hallazgos de necrosis tubular. Sin embargo, se ha llegado a observar que en la toxicidad por medicamentos, se llega a comprometer una extensa zona de túbulo proximal de forma homogénea. Al contrario en el daño isquémico, las zonas del TRP afectadas son focalizadas, debido a la microvasculatura comprometida(5).

Gentamicina.

Los mecanismos nefrotóxicos mencionados anteriormente, se presentan de igual manera con el uso específico de Gentamicina. La molécula de ATB interactúa con la membrana celular por acción iónica. Dicha unión altera la función fosfolipídica, deteriorando su metabolismo y causando fosfolipidosis. Esta condición se da específicamente por la reducción de carga negativa de la membrana, necesaria para la adecuada función de fosfolipasa; además de la inhibición de fosfolipasas A1, A2, C1. Se ha estudiado la intervención en dicha vía, previniendo la interacción de gentamicina con la membrana fosfolipídica, a través de la administración de ácido poliaspártico. Se observó reducción de fosfolipidosis, sin embargo persisten diversas vías alternas que finalmente dirigen hacia la necrosis tubular renal(32)(33).

La presencia de notables alteraciones intracelulares conlleva a serias consecuencias orgánicas. La Gentamicina, independientemente de la lesión celular, inhibe una variedad de transportadores de membrana celular tanto del borde en cepillo como de la membrana basolateral. Cotransportes tales como Na-P y Na-H, transporte mediado por dipéptidos, transporte activo de Na y transporte de Na-K dependiente de ATP, afectan el intercambio iónico comprometiendo la viabilidad celular(33). Los transportes Na-Glucosa y Na-K dependiente de trifosfato de adenosina son componentes claves de la homeostasis del volumen celular, por lo cual el edema celular y la desregulación pueden conducir a la necrosis o apoptosis. Desde los 30 minutos posteriores a la perfusión renal en ratas con gentamicina hasta 3 horas después, se puede llegar a observar deficiencia de la recaptación de calcio y magnesio, dando lugar a hipercalciuria, hipermagnesiuria e hipomagnesemia, previo a las consecuencias renales por alteraciones de Na y K, y antes que los signos detectables de daño renal y toxicidad sean evidentes. La gentamicina compite con las proteínas, cationes orgánicas y otras moléculas del

complejo megalina-cubilin endocítica en el túbulo proximal, y por lo tanto impide su reabsorción al encontrarse ellas en el lumen tubular(34).

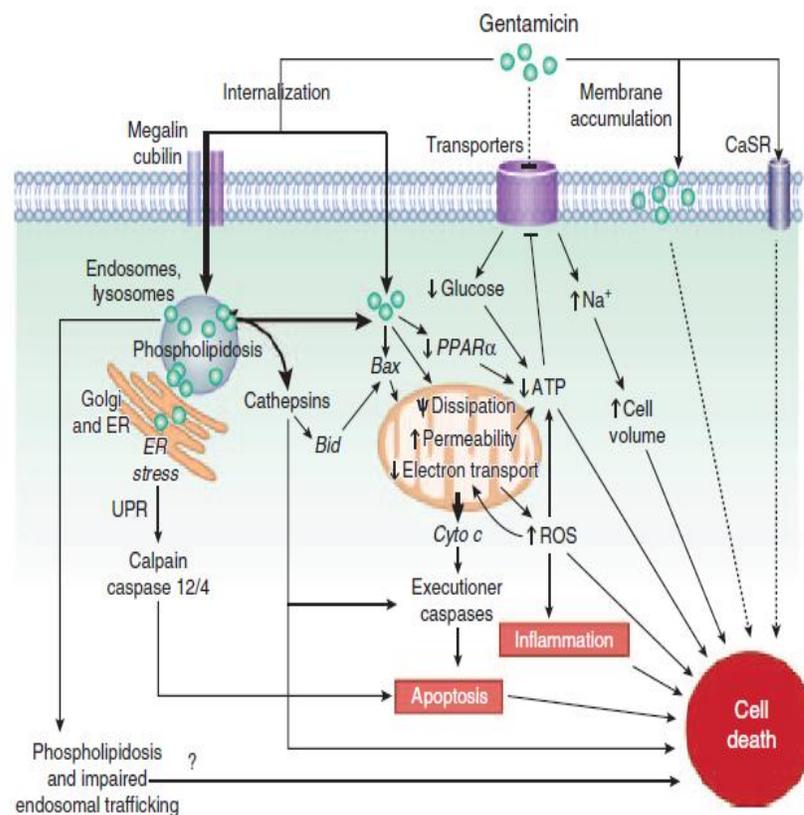


Ilustración 5. Mecanismos de citotoxicidad de gentamicina

Tomado de: José M. López-Novoa, Yaremi Quiros, Laura Vicente, Ana I. Morales, Francisco López Hernández. New insights into the mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity: an integrative point of view. International Society of Nephrology, 2011.

Debido a que las células epiteliales tubulares son las principalmente afectadas, los detritos celulares son depositados al interior de la luz del mismo. La cadena de necrosis masiva de las porciones S1 y S2 produce obstrucción tubular parcial y total, con aumento de la presión hidrostática en el lumen. Esto

provoca fuga de líquido previamente filtrado hacia el intersticio, por lo que se puede observar edema intersticial en muestras histopatológicas. Además, el impedimento hacia la excreción tubular aunado al incremento de presión hidrostática, producen aumento de presión dentro de la cápsula de Bowman, disminuyendo posteriormente la tasa de filtración glomerular (GFR). La falla en el intercambio iónico determinada por el epitelio necrótico, impide la reabsorción adecuada de electrolitos y agua, por lo que grandes cantidades de líquidos se pierden en la orina. El mecanismo de feedback túbulo-glomerular (TGF) es activado para no permitir que se pierdan líquidos y electrolitos en exceso y este responde ante el aumento de la excreción de los mismos, actuando a través de la angiotensina II y adenosina, disminuyendo en mayor cantidad la GFR. En condiciones normales, el TGF es capaz de regular la GFR en un período de 1 a 24 horas, sin embargo mientras se mantenga un tratamiento con aminoglucósidos (Gentamicina), persistirá una baja tasa de filtración(27).

Al llevarse a cabo el TGF, se secretan dos moléculas capaces de modificar el flujo vascular renal, adenosina y angiotensina II, provocando vasoconstricción y disminuyendo el flujo sanguíneo. Al haber disminución de éste, la cantidad de oxígeno entregada es cada vez menor, a lo cual son muy susceptibles las células en cepillo del borde epitelial tubular. Esta se convierte en otra vía que promueve la necrosis tubular renal(35).

Al haber presencia de gentamicina en el torrente sanguíneo, ésta entra en contacto primeramente con el glomérulo, principal encargado de la filtración. Como efecto directo, la gentamicina produce contracción de las células mesangiales, disminuyendo la GFR. Además, la gentamicina promueve proliferación mesangial, por apoptosis marcada de las mismas, produciendo cambios en la forma y función del glomérulo (baja GFR). Provoca a la vez, pérdida de la selectividad de la barrera de

filtración, dado por la neutralización de las cargas negativas, contribuyendo a la proteinuria y tomando en cuenta que la reabsorción está comprometida por el daño epitelial tubular(36).

La inclusión del sistema renina-angiotensina-aldosterona, la acción de endotelina-1, las especies reactivas de oxígeno y el aumento de la actividad de transportadores de membrana de calcio, facilitan la entrada del ion calcio (Ca^{2+}) al interior de la célula afectada. Esto a su vez, produce activación de fosfolipasa A2, que cataliza la formación de ácido araquidónico(AA). El AA a través de la ciclooxigenasa, controla la formación de prostaglandina E-2 (PGE2), tromboxano A-2 (TXA2), así como de secreción de factor activador de plaquetas (PAF), desencadenando finalmente en contracción mesangial. La inhibición de PAF ha sido investigada con el fin de determinar si hay disminución del daño provocado por gentamicina, aminorando la reducción marcada de la tasa de filtración glomerular(36).

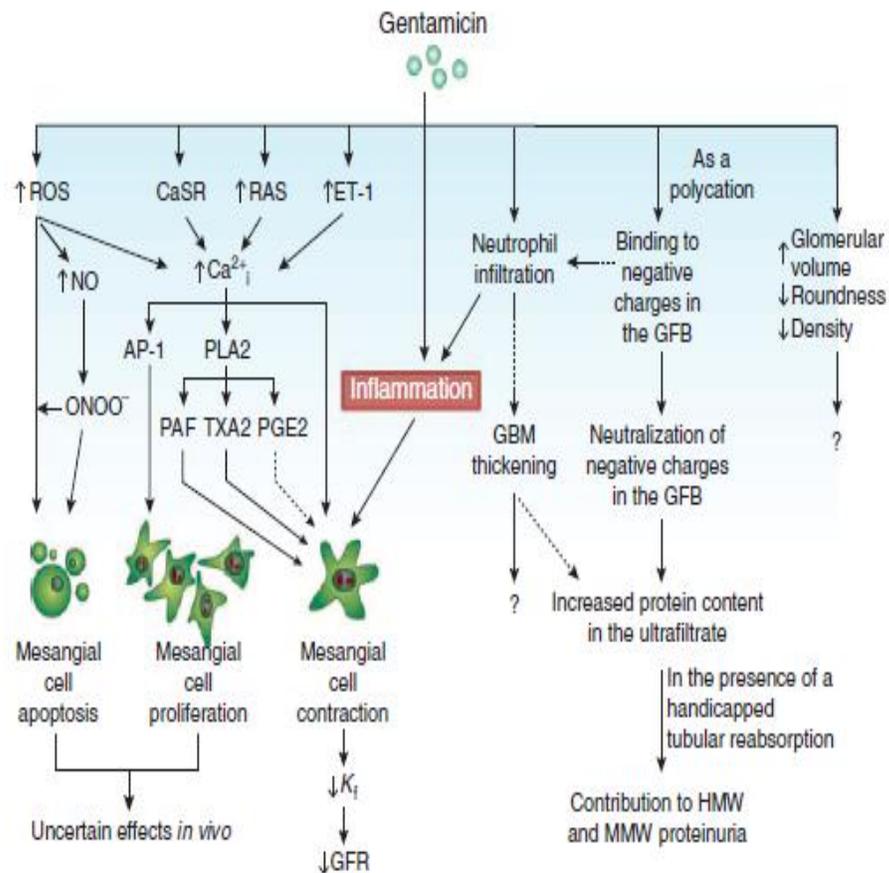


Ilustración 6. Efectos glomerulares de la gentamicina

Tomado de: José M. López-Novoa, Yaremi Quiros, Laura Vicente, Ana I. Morales, Francisco López Hernández.

New insights into the mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity: an integrative point of view. *International Society of Nephrology*, 2011.

La gentamicina tiene la capacidad de activar la sintasa de óxido nítrico, por medio de la acción pro-inflamatoria del factor nuclear KB, aumentado la expresión de óxido nítrico (NO). Esto agregado al aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS), contribuye a la interacción de anión superóxido

con NO, formando peroxinitrito, produciendo estrés oxidativo y consecuentemente efecto citotóxico(37).

Las especies reactivas de oxígeno provienen de diversas reacciones y tienen severas consecuencias en torno a la injuria renal causada por gentamicina (mitocondria y apoptosis, endotelio vascular con cambios en flujo renal y GFR, daño a células mesangiales y filtrado glomerular). Es por esta razón que diversos estudios se han enfocado en la reducción del daño renal provocado por ROS, ya que estas son actores principales en la respuesta inflamatoria que produce la necrosis tubular(25) (Ver imagen 8).

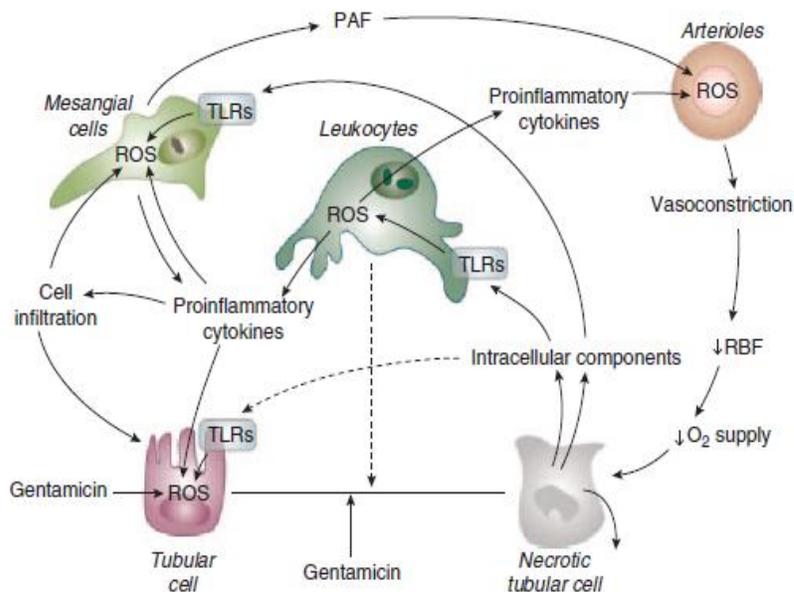


Ilustración 7. Amplificación de la respuesta inflamatoria tubular, glomerular y vascular por gentamicina

Tomado de: José M. López-Novoa, Yaremi Quiros, Laura Vicente, Ana I. Morales, Francisco López Hernández. *New insights into the mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity: an integrative point of view. International Society of Nephrology, 2011.*

Radicales libres de oxígeno.

Son moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo. Esta configuración espacial les hace muy inestables, excepcionalmente reactivos, con una enorme capacidad para combinarse con la mayoría de las biomoléculas celulares provocando un gran daño en ellas y en las membranas celulares.

La mayor parte del oxígeno utilizado por el organismo durante la respiración celular es reducido a agua por acción del complejo citocromo-oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial (38)(39).

Entre los radicales libres de oxígeno tenemos:

O_2^- = radical superóxido

H_2O_2 = peróxido de hidrógeno

OH^- = radical hidróxilo

Por su alta inestabilidad atómica, los radicales libres (RL) colisionan con una biomolécula y le sustraen un electrón, oxidándola, perdiendo de esta manera su función específica en la célula.

En el caso de los lípidos, los RL dañan las estructuras ricas en ellos como las membranas celulares y las lipoproteínas, conduciendo al edema, muerte celular y oxidación de las lipoproteínas de baja densidad. Posteriormente, el ácido graso se convierte en una molécula capaz de oxidar a otras, proceso

conocido como peroxidación lipídica, esto genera numerosos subproductos, entre ellos el malondialdehído (MDA), cuya determinación en tejidos, plasma u orina es uno de los métodos de evaluar el estrés oxidativo. Con respecto a las proteínas, se oxidan preferentemente los aminoácidos y como consecuencia se forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas, fragmentación de la proteína y formación de grupos carbonilos e impiden el normal desarrollo de sus funciones. Otra molécula que es dañada por los RL es el ADN; el daño a los ácidos nucleicos produce bases modificadas, lo que tiene serias consecuencias en el desarrollo de mutaciones y carcinogénesis por una parte o la pérdida de expresión por daño al gen específico(38).

Radicales libres de oxígeno y Gentamicina.

La gentamicina estimula la expresión de la oxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la producción de oxido nítrico (ON) en el glomérulo y células mesangiales. Esta sobreproducción de ON, sobre todo en condiciones de estrés oxidativo, interactúa con el anión superóxido para formar peroxinitrito, el cual es citotóxico. Finalmente, ocurre apoptosis de las células mesangiales, seguido de una proliferación celular reparadora (debido al incremento de Ca^{2+}), que en el caso de ausencia de daño tisular, resulta también en apoptosis(1).

Antioxidantes.

Halliwel y Gutteridge en 1998 definieron como antioxidante a toda sustancia que hallándose presente a bajas concentraciones, con respecto a las de un sustrato oxidable retarda o previene la oxidación de dicho sustrato. El antioxidante al reaccionar con el RL le cede un electrón oxidándose a su vez y

transformándose en un RL débil, con escasos o nulos efectos tóxicos y que en algunos casos, pueden regenerarse a su forma primitiva por la acción de otros antioxidantes(40).

Mecanismos de acción:

- *Sistema de prevención:* impiden la formación de los RL y/o especies reactivas.
- *Sistema barredor:* inhiben la acción de los RL.
- *Sistema de reparación:* favorecen la reparación y reconstitución de las estructuras biológicas dañadas.

Cada antioxidante posee una afinidad hacia un determinado RL o hacia varios, puede actuar en los diferentes procesos de la secuencia oxidativa y tener más de un mecanismo de acción.

Los antioxidantes se clasifican en:

Tabla 5. Clasificación de antioxidantes

ENDOGENOS	<ul style="list-style-type: none">• Glutación.• Coenzima Q.• Acido tióctico.• Enzimas: -Superóxido dismutasa SOD
-----------	--

-Catalasa.

-Glutación peroxidasa.

EXOGENOS

- Vitamina E.
- Vitamina C.
- Flavonoides.
- Licopenos.

Acido ascórbico.

La vitamina C o ácido ascórbico constituye un micronutriente esencial, requerido para el funcionamiento metabólico normal del organismo. Los humanos y otros primates han perdido la habilidad de sintetizarla, debido a una mutación en el gen que codifica para L-gulonolactona oxidasa, enzima requerida para la biosíntesis de esta. Por lo tanto, esta vitamina debe de ser ingerida en la dieta. La dosis diaria recomendada es de 60 mg/día, para adultos saludables no fumadores(41)(42).

La vitamina C es un antioxidante hidrosoluble, cofactor de diversas enzimas involucradas en la biosíntesis del colágeno, carnitina y neurotransmisores. Actúa como *barredor* de RL y especies nitrogenadas, protegiendo a otros sustratos del daño oxidativo. Asimismo, actúa como coantioxidante, al *regenerar* a la vitamina E (α -tocoferol) de su radical α -tocoferoxil. Esta última función resulta particularmente importante, ya que se ha demostrado en experimentos in vitro que α -tocoferol puede actuar como un pro-oxidante en la ausencia de coantioxidantes como la vitamina C. También se ha encontrado que la vitamina C regenera al urato, glutatión y beta caroteno de sus respectivos productos de oxidación(43).

La mayoría de las reacciones del ácido ascórbico se deben a su fuerte potencial reductor. Su actividad antioxidante deriva del desplazamiento de ácido L-ascórbico a su forma oxidada L-dehidroascórbico. Esta reacción también habilita la molécula para combatir radicales oxidativos. La vitamina C tiene dos pKa's, y el grado de ionización va a influir en la formación de su forma pro-oxidante o antioxidante, entre más ionizado se encuentre, mayor probabilidad tendrá de ser un prooxidante y viceversa(4).

Existen diversas formas moleculares del ácido ascórbico, entre ellas se encuentra el ácido L-ascórbico, quien actúa de forma sinérgica con alfa-tocoferol, para proteger las membranas celulares contra la peroxidación de lípidos. Las especies oxidantes son directamente interceptadas por el ácido L-ascórbico y las desactiva(4).

Algunos estudios muestran una clara participación de la vitamina C como antioxidante sobre el endotelio vascular evitando la oxidación del óxido nítrico, potenciando su actividad y aumentando su síntesis. Otros estudios sugieren una disminución de la peroxidación lipídica en presencia de vitamina C. Por ambas razones parece demostrado su papel beneficioso en la aparición y progresión de la aterosclerosis(41)(44).

Existen dos propiedades mayores que hacen que la vitamina C sea el antioxidante ideal:

1. Bajos potenciales de reducción del ascorbato y de su producto de oxidación radical ascorbil: Esto le permite reaccionar y reducir básicamente todos los radicales fisiológicamente relevantes y los oxidantes.

2. Estabilidad y baja reactividad del radical ascorbil, formado cuando el ascorbato barre un RL o especie nitrogenada:

El radical ascorbil se dismuta rápidamente para formar ascorbato y ácido dehidroascórbico, o es reducido de nuevo a ascorbato mediante la semidehidroascórbato reductasa dependiente de NADH. El ácido dehidroascórbico puede ser reducido a ascorbato por la enzima glutatión(41).

La vitamina C ha sido reconocida y aceptada por la FDA como uno de los cuatro antioxidantes de la dieta, siendo los otros tres, la vitamina A, vitamina E y selenio, y ha sido establecida como un barredor de radicales libres(41). Generalmente no es tóxico, sin embargo se han reportado los siguientes efectos indeseados: náuseas, vómitos, calambres abdominales, dolor de cabeza, fatiga, insomnio, puede ocurrir diarrea con dosis superiores a 600 mg al día. Uno de los efectos adversos más significativos es el desarrollo de hiperoxaluria luego de la administración prolongada de grandes dosis de ácido ascórbico. El ácido ascórbico puede causar acidificación de la orina, provocando precipitación de cálculos de uratos, cistina u oxalatos. Se manifiesta con dolor en el costado o en la parte baja de la espalda(45).

Ácido ascórbico y enfermedades cardiovasculares.

Se ha demostrado que la administración de 1000 mg/ día de Vitamina C reduce los niveles de colesterol total. Esto debido a que actúa como cofactor para la 7α -monooxigenasa del colesterol, enzima involucrada en la hidroxilación del colesterol para formar ácidos biliares.

Asimismo, se ha encontrado que la Vitamina C modula la actividad de hidroximetilglutaril-CoA reductasa, enzima que juega un rol importante en la biosíntesis del colesterol. Estudios demuestran también que por cada 30mmol/L de incremento en la vitamina C plasmática, el colesterol HDL se eleva en un 4-10% y el LDL disminuye en un 4%(41).

La vitamina C puede modular la actividad de la lipoprotein lipasa. Dos estudios demostraron que la suplementación de 2000-3000 mg/día de vitamina C por 1-6 semanas incrementaban la actividad fibrinolítica y reducían la adhesión plaquetaria. También se ha comprobado que hay un incremento en la vasodilatación, esto debido a que al barrer los RL evita que estos inactiven al ON (óxido nítrico) y previene la oxidación del LDL (41).

Acido ascórbico y cáncer.

Se han encontrado diversos mecanismos por medio de los cuales el ácido ascórbico puede constituir un factor protector contra el cáncer. Uno de ellos es la protección contra compuestos mutagénicos como las nitrosaminas. Los compuestos N-Nitrosos son formados por la reacción de nitritos o nitratos con aminas o amidas. También se generan por el ON generado por respuesta inflamatoria, expresado por la óxido nítrico sintasa inducible. Estos compuestos son activados por enzimas dependientes de la citocromo P450, y han sido encontrados en cáncer de pulmón y gástrico. La vitamina C actúa como barrido del nitrito, por lo tanto previene la reacción con las aminas para formar nitrosaminas(46).

Del mismo modo, se ha visto una disminución en las concentraciones de los fecapentenos, mutágenos fecales encontrados en el cáncer de colon.

Otra manera en la que reduce la carcinogénesis, es a través de la estimulación del sistema inmune. La vitamina C puede modular funciones de los fagocitos, como la quimiotaxis, la actividad de las células natural killer y las funciones y proliferación de los linfocitos. También afecta la producción de citocinas, anticuerpos y componentes del complemento(46).

Acido ascórbico e injuria renal aguda.

Baliga et al., 1997, relacionaron al daño renal inducido por gentamicina con RL, los cuales dañaban directamente a lípidos, proteínas y DNA, destruyendo la estructura celular. Durante el estrés oxidativo ocurre una peroxidación de los lípidos de membrana, que resulta en una fragmentación de los ácidos grasos poli insaturados, alterando la función tubular y degradando los componentes colagenados y de la matriz celular, dando como resultado final una proliferación mesangial y apoptosis. Entre diversas sustancias que han demostrado tener un efecto nefroprotector, se encuentra el ácido ascórbico, el cual actúa como donante de electrones para neutralizar a los RL, por lo tanto, evita el daño por estos mismos a las estructuras celulares. Según el estudio *Cytoprotective effects of vitamin c against gentamicin induced acute kidney injury in rats*, una administración de 200 mg/kg/día de ácido ascórbico no solamente disminuyó considerablemente el daño renal asociado al tratamiento con gentamicina, sino que también reveló un efecto reparador tanto estructural como funcional.(47)

Histopatología de la injuria renal aguda.

Existen seis mecanismos básicos por medio de los cuales los medicamentos inducen daño renal agudo:

1. Reducción de la perfusión renal mediante una alteración de la hemodinámica intra renal.
2. Toxicidad tubular directa.
3. Toxicidad inducida por pigmento heme (rabdomiolisis).
4. Obstrucción intratubular por la precipitación de los agentes o sus metabolitos o subproductos.
5. Nefritis intersticial alérgica.
6. Síndrome hemolítico-urémico.

Los aminoglicosidos actúan induciendo toxicidad tubular directa y también inducen obstrucción intratubular(48).

DRUGS AND CHEMICALS ASSOCIATED WITH ACUTE RENAL FAILURE

Mechanisms

- M1 Reduction in renal perfusion through alteration of intrarenal hemodynamics
- M2 Direct tubular toxicity
- M3 Heme pigment–induced toxicity (rhabdomyolysis)
- M4 Intratubular obstruction by precipitation of the agents or its metabolites or byproducts
- M5 Allergic interstitial nephritis
- M6 Hemolytic-uremic syndrome

M1	M2	M3	M4	M5*	M6	Drugs
✓	✓				✓	Cyclosporine, tacrolimus
✓	✓					Amphotericin B, radiocontrast agents
✓				✓		Nonsteroidal anti-inflammatory drugs
✓						Angiotensin-converting enzyme inhibitors, interleukin-2†
✓	✓		✓			Methotrexate‡
	✓					Aminoglycosides, cisplatin, foscarnet, heavy metals, intravenous immunoglobulin¶, organic solvents, pentamidine
		✓			✓	Cocaine
		✓				Ethanol, lovastatin**
			✓	✓		Sulfonamides
			✓			Acyclovir, Indinavir, chemotherapeutic agents, ethylene glycol***
				✓		Allopurinol, cephalosporins, cimetidine, ciprofloxacin, furosemide, penicillins, phenytoin, rifampin, thiazide diuretics
					✓	Conjugated estrogens, mitomycin, quinine

* Many other drugs in addition to the ones listed can cause renal failure by this mechanism.

† Interleukin-2 produces a capillary leak syndrome with volume contractions.

‡ Uric acid crystals form as a result of tumor lysis.

¶ The mechanism of this agent is unclear but may be due to additives.

** Acute renal failure is most likely to occur when lovastatin is given in combination with cyclosporine.

*** Ethylene glycol–induced toxicity can cause calcium oxalate crystals.

Ilustración 8. Fármacos y químicos asociados a injuria renal aguda

Fuente: Broe de. Renal injury due to environmental toxins, drugs, and contrast agents. 1999

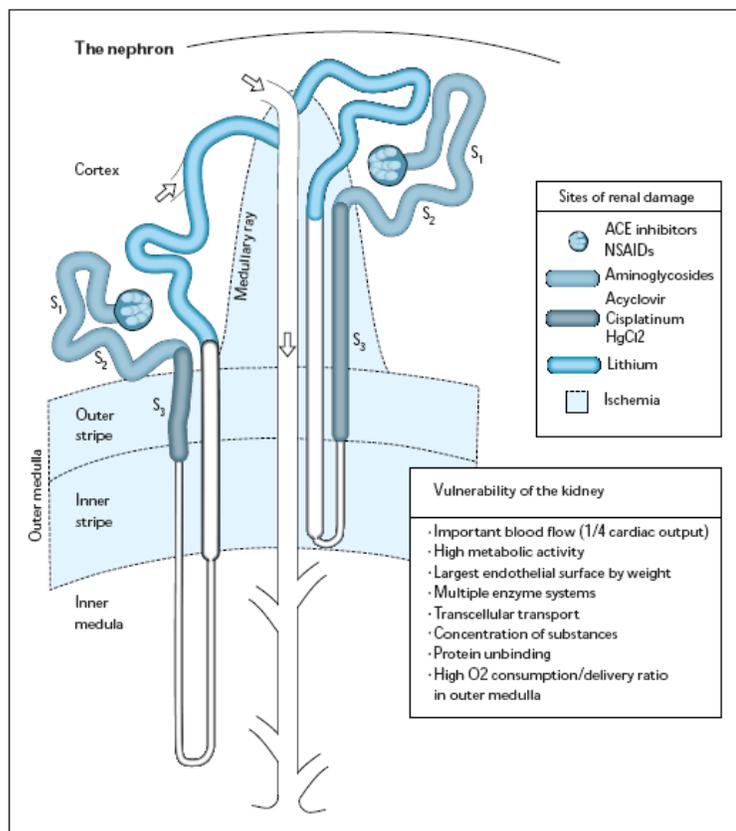


Ilustración 9. Sitios de daño renal en la nefrona

Fuente: Broe de. Renal injury due to environmental toxins, drugs, and contrast agents. 1999

Los aminoglicosidos actúan dañando principalmente los segmentos S1 y S2 de la nefrona(48).

Los túbulos afectados muestran una diversidad de alteraciones dependiendo de la naturaleza del toxico, la severidad del daño y el tiempo de dosificación de este. Los cambios estructurales incluyen cambios propios de reparación del daño, tales como, túbulos dilatados, células tubulares aplanadas con citoplasma basófilo, núcleo hiper cromático irregular o núcleo en mitosis. Material amorfo, eosinofílico o detritos celulares pueden estar presentes en el lumen de los túbulos y pueden acumularse cilindros en

el segmento distal y túbulo colector. En casos severos se puede ver edema e inflamación en el intersticio. Aunque el daño excluye al glomérulo, las células de la capsula de Bowman pueden mostrar cambios microscópicos similares a los que se observan en los túbulos. Este patrón puede ir acompañado de otras alteraciones citoplásmicas en los túbulos, entre ellas, la vacuolización, depósito de cristales, cilindros tubulares y pigmentación. A través de la microscopía electrónica se pueden detectar inclusiones lisosomales, cilindros hialinos, alteraciones mitocondriales y micro-calcificación. Además se ha detectado un incremento en número y tamaño de lisosomas secundarios (cuerpos mieloides o mielinosomas) en el citoplasma de las células del túbulo proximal, tanto en animales como en humanos. Debido a que los aminoglicosidos se acumulan en los lisosomas, los cuerpos mieloides aparecen probablemente como resultado del daño de la biodegradación de lípidos polares complejos. A medida que la dosificación de AMG continúa, los lisosomas incrementan de tamaño, y finalmente se rompen, liberando cuerpos mieloides al lumen tubular y con el daño tubular concomitante (26)(49).

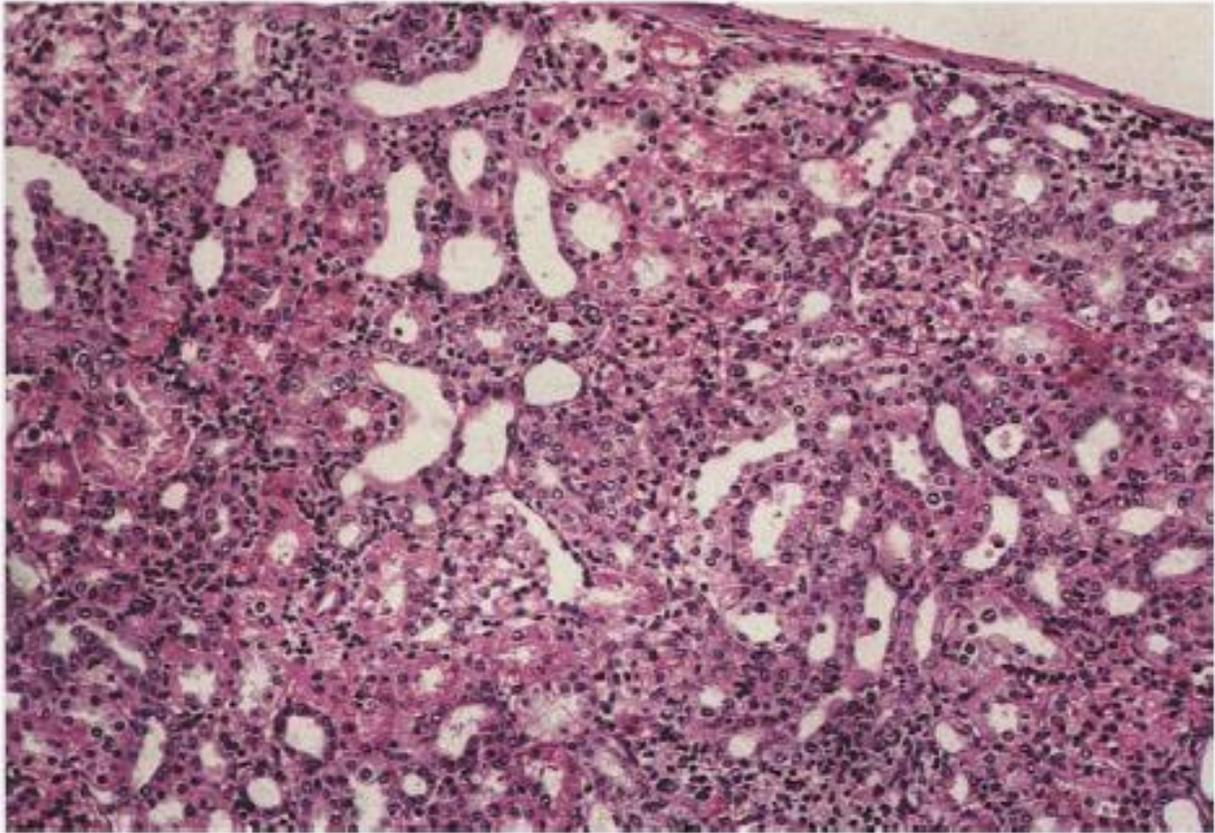


Ilustración 10. Dilatación tubular y aplanamiento de células del epitelio tubular

Tomado de: Histopathology of Preclinical Toxicity Studies (Third edition). New York: Academic Press; 2007

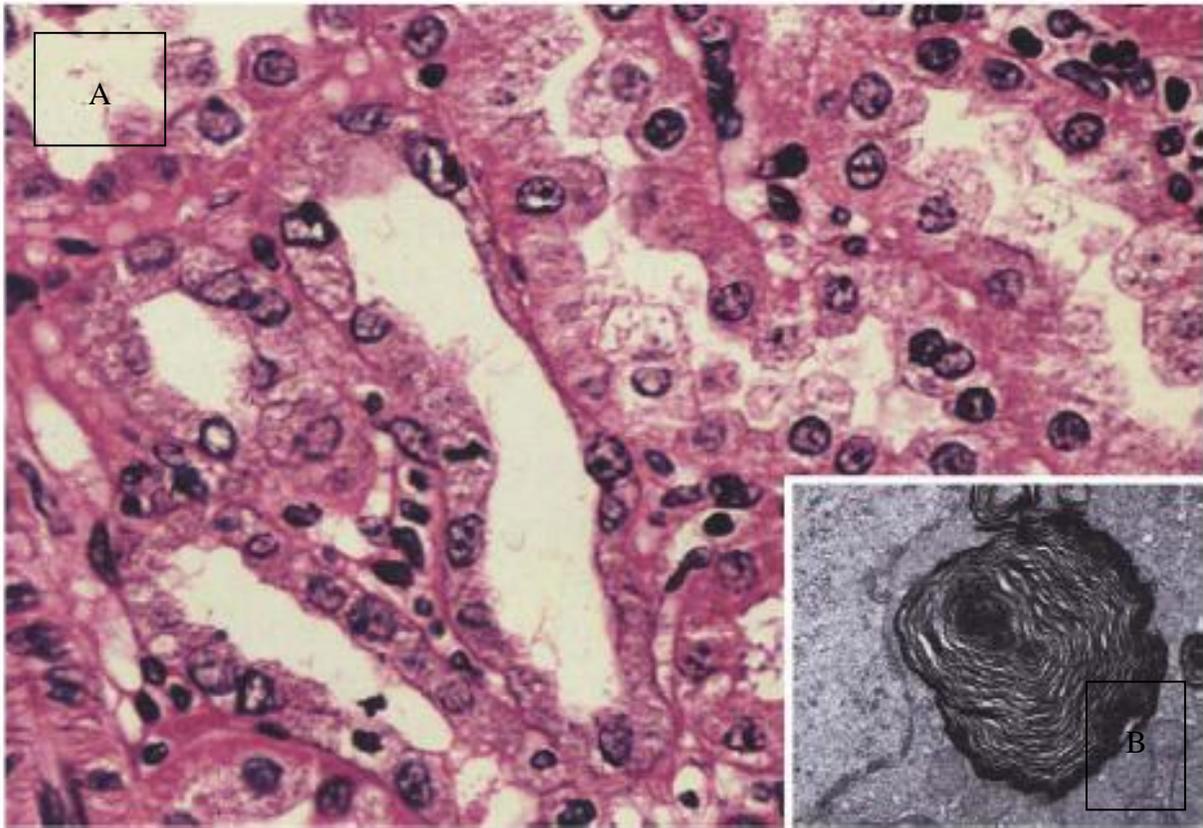


Ilustración 11. A. Regeneración epitelial tubular con evidencia de actividad mitótica. B. Micrografía electrónica que muestra inclusiones laminares de fosfolipidos, típicamente encontrados en el citoplasma de la célula tubular luego de tratamiento con gentamicina.

Tomado de: *Histopathology of Preclinical Toxicity Studies* (Third edition). New York: Academic Press; 2007

SISTEMA DE HIPOTESIS.

HIPOTESIS DE INVESTIGACION/OPERACIONAL (Hi).

Si el uso de Gentamicina produce nefrotoxicidad en conejos, entonces la utilización concomitante de Acido Ascórbico disminuirá el daño renal.

HIPOTESIS ALTERNA (Ha).

Si el uso de Gentamicina produce nefrotoxicidad en conejos, entonces la utilización concomitante de Acido Ascórbico inhibirá el daño renal.

HIPOTESIS NULA (Ho).

El acido ascórbico no tiene efecto nefroprotector en daño renal agudo inducido por el uso de Gentamicina en un modelo de daño renal en conejos.

METODOLOGIA.

Tipo y diseño general del estudio.

Investigación básica, estudio experimental controlado en el cual se evaluó el efecto nefroprotector del ácido ascórbico en un modelo de daño renal inducido por gentamicina.

Diseño experimental.

Se utilizaron 24 conejos machos, raza Nueva Zelanda, con peso entre 1.5 ± 0.5 Kg, obtenidos de la Granja Don Bosco, San José Villanueva, La Libertad, El Salvador. El bienestar animal se realizó bajo los lineamientos del consejo Canadiense para el cuidado animal, dictaminado en el año 2007.(50)

Cada animal fue alojado en cajas metabólicas individuales, con un área de superficie de 0.14m^2 , protegidos del ruido. La temperatura osciló entre $16\text{-}22^\circ\text{C}$, en un sitio con adecuada ventilación, cuya humedad se mantuvo entre el 40 - 60%. Los conejos fueron sometidos a ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Se les administró agua y comida especial (concentrado de conejo) *ad libitum*, por

medio de dispensadores individuales, los cuales estaban sujetos a las paredes de la caja metabólica, con el fin de evitar la contaminación de la comida y agua con desechos del conejo (Ver imagen 13).

Grupos experimentales.

Se seleccionaron 24 conejos al azar, aparentemente sanos, los cuales fueron distribuidos en 3 grupos:

- *Grupo Sham:* se le administró Solución Salina Normal 0.9% por vía intramuscular y por vía intraperitoneal.
- *Grupo control:* se le administró Gentamicina a dosis de 80 mg/Kg/día IM, por un período de 5 días consecutivos.
- *Grupo Daño Renal/Acido Ascórbico:* se les administró Gentamicina a dosis de 80 mg/kg/día IM, mas inyección concomitante de ácido ascórbico a una dosis de 200 mg/Kg/día intraperitoneal (IP), durante un período de 5 días consecutivos.

El procedimiento se dividió en 2 períodos: ambientación y fase experimental. Desde el inicio del procedimiento se aislaron individualmente en su respectiva caja metabólica, cuantificando diariamente el volumen urinario y peso. (Gasto urinario= ml/Kg/h)

Distribución de la muestra.

Tabla 6. Distribución de la muestra

GRUPO	CODIGO	DESCRIPCION	NUMERO DE CONEJOS
SHAM	CS	Administración de SSN 0.9% IM e IP durante 5 días.	8
CONTROL	CC	Administración de Gentamicina a 80 mg/kg/día IM durante 5 días consecutivos + SSN 0.9% IP.	8
ACIDO ASCORBICO	CA	Administración de Gentamicina a 80 mg/kg/día + Acido ascórbico a 200 mg/kg/día IP	8
	TOTAL		24

Criterios de inclusión.

- Conejos machos.
- Conejos con peso 1.5 ± 0.5 Kg.
- Conejos en buen estado de salud.

Criterios de exclusión.

- Conejos con anomalías fenotípicas.
- Conejos que fallezcan posterior a la inducción anestésica y previa finalización del procedimiento quirúrgico.
- Conejos con parámetros renales anormales en su toma basal.
- Conejos con anomalías renales macroscópicas.

Aleatorización de la muestra.

La selección de animales se realizó asignando un número a cada conejo marcando sobre la piel de la oreja el número. Los números fueron colocados en una tómbola de donde se extrajeron uno a uno los

números, colocando los números en cada grupo completando el número de animales designado, iniciando desde S1 hasta A8.

Fases de la experimentación.

Fase 1 – Ambientación.

Durante un periodo de 7 días, cada conejo fue aislado en sus cajas metabólicas, en donde se les administró concentrado para conejos y agua *ad libitum*. Se cuantificó diariamente la diuresis y el peso de cada conejo, para el cálculo diario del gasto urinario.

Fase 2 - Terapéutica.

Se mantuvo a cada conejo bajo las condiciones anteriores. Al grupo Sham se le administró SSN 0.9% IM e IP, al grupo control SSN 0.9% IP y Gentamicina IM; finalmente al grupo de daño renal/acido ascórbico, se le administró Gentamicina IM y acido ascórbico IP, como descrito anteriormente, por un periodo de 5 días. Se tomaron muestras sanguíneas y urinarias en el primer día de la fase terapéutica, tercer día y finalmente al séptimo día, en éste último día, se procedió a realizar el procedimiento quirúrgico de nefrectomía bilateral, previa preparación, asepsia y antisepsia del sitio operatorio con crema depilatoria, jabón yodado y agua estéril. Se administró a cada sujeto experimental, anestesia con Ketamina a 50 mg/kg/dosis subcutánea (SC) y Xylazina a 10mg/kg/dosis SC, y se infiltró Lidocaína al 2% en el sitio de incisión quirúrgica a nivel paravertebral subcostal. Finalmente se realizó la respectiva eutanasia al realizar una incisión sobre la aorta abdominal y liberar el pedículo vascular renal para exanguinar lo más rápido posible a las unidades experimentales.



Ilustración 12. Distribución de conejos en sus cajas metabólicas, con sus depósitos de agua y de comida respectivos y los depósitos para la recolección de orina.

Aspectos éticos.

Se tomaron en cuenta los aspectos considerados en la Asociación Canadiense de Laboratorio Clínico Animal (CALAM, por sus siglas en inglés) 2007(50). Una vez finalizada la nefrectomía bilateral se practicó eutanasia de acuerdo a los Protocolos de Eutanasia para animales de experimentación de la

Asociación Americana de Médicos Veterinarios. Utilizándose la técnica de exanguinación mientras las unidades experimentales se encontraban anestesiadas.

Toma de muestras.

Muestras sanguíneas.

Con el fin de no causar alteraciones hemodinámicas en los sujetos experimentales el volumen total de las muestras sanguíneas no excedieron los 10 mL/kg de peso.

Cada muestra fue de 1.5 mL en cada toma:

- 1° toma: al finalizar la fase de ambientación, previo al inicio de la fase experimental.
- 2° toma: al 3° día de la fase experimental.
- 3° toma: 48 horas posteriores a la finalización de la fase experimental.

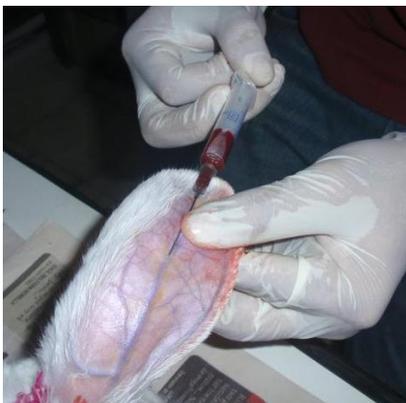


Ilustración 13. Toma de muestras sanguíneas a través de acceso venoso.

Muestras urinarias.

A través del diseño de la caja metabólica, se recolectó la orina diariamente en un depósito y posteriormente será cuantificada en mL. Al igual que con las muestras sanguíneas, se tomó en 3 momentos las muestras urinarias para analizar la actividad enzimática.

Muestras anatomopatológicas.

Al séptimo día de la fase experimental y previa eutanasia se realizó nefrectomía bilateral. Inmediatamente posterior a la nefrectomía se procedió a pesar cada riñón y posteriormente a la sección longitudinal de las muestras, colocando papel filtro en el medio. Se procedió a la fijación con formalina.

Análisis de las muestras.

Muestras séricas.

Cada muestra fue procesada en equipo automatizado para el análisis de creatinina sérica.

Muestras urinarias.

Fueron analizadas con el kit enzimático N-acetil-beta-D-glucosaminidasa (Roche Diagnostic Systems).



Ilustración 14. Kit enzimático NAG

Muestras anatomopatológicas.

Posterior a la fijación con formalina, se procesaron con deshidratación con metanol anhidro por un periodo de 3 horas en 3 diferentes depósitos, luego se aclaró con xylol durante 2 horas en 2 diferentes depósitos, finalmente, inmersión en parafina en dos diferentes baños por 2 horas. Se realizaron los bloques de parafina y se solidificaron. Luego se realizaron los cortes al micrófono rotatorio. Se efectuaron 2 cortes de cada riñón.

Posteriormente se realizó tinción histoquímica de hematoxilina eosina para visualizar membranas basales. Luego se interpretaron histológicamente con microscopio binocular de luz por patólogo.

Análisis estadístico.

Los datos obtenidos fueron introducidos a la base de datos del sistema computarizado GraphPad versión Prism 5 Project, por medio del cual se procesó la información.

Se realizaron pruebas estadísticas *intragrupo*, para evaluar el comportamiento de cada grupo de investigación desde el momento inicial (M1) hasta el momento final (M3), y pruebas *intergrupo*, para analizar el comportamiento de los tres grupos de investigación en cada momento del tiempo (M1, M2 y M3).

Se determinó la normalidad de cada variable, mediante el test de D'Agostino Pearson. Las variables que cumplieron con los parámetros de normalidad, fueron analizadas posteriormente con el test de ANOVA de un factor, y se utilizó el post test de Bonferroni para comparar a cada grupo entre sí. Las variables que no cumplieron con los parámetros de normalidad, fueron analizadas con la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis y posteriormente se analizaron con el post test de Dunn.

Variables operacionales.

Tabla 7. Variables operacionales.

VARIABLE	DEFINICION	UNIDAD	VALORES NORMALES
Creatinina (Cr)	Prueba bioquímica. Marcador sérico de la función renal	mg/dL	0.5 – 2.5 mg/dL
N-acetil-β-D glucosaminidasa	Ensayo enzimático urinario.	UI/L	N/A
Gasto urinario	Volumen urinario en un periodo de tiempo	mL/h	Riesgo: < 0.5mL/Kg/h durante 6 h. Injuria: < 0.5mL/Kg/h durante 12 h. Fallo: < 0.3mL/kg/h durante 24 h. ó anuria (<0.15 ml/Kg/h) por 12 h.
Histopatología renal	Evaluación de la estructura histopatológica del riñón.	Escala de daño tubular(50). Grados 0 – 4.	0: normal. 1A: descamación de células epiteliales tubulares en focos. (<1% de la población tubular involucrada) 1B: degeneración focal granulovacuolar y detritos granulares en el lumen tubular con/sin descamación. 2: necrosis epitelial tubular y descamación prominente pero <50% de los túbulos corticales.

			3: >50% de los túbulos con necrosis y descamación. 4: 90-100% de necrosis tubular.
--	--	--	---

RESULTADOS.

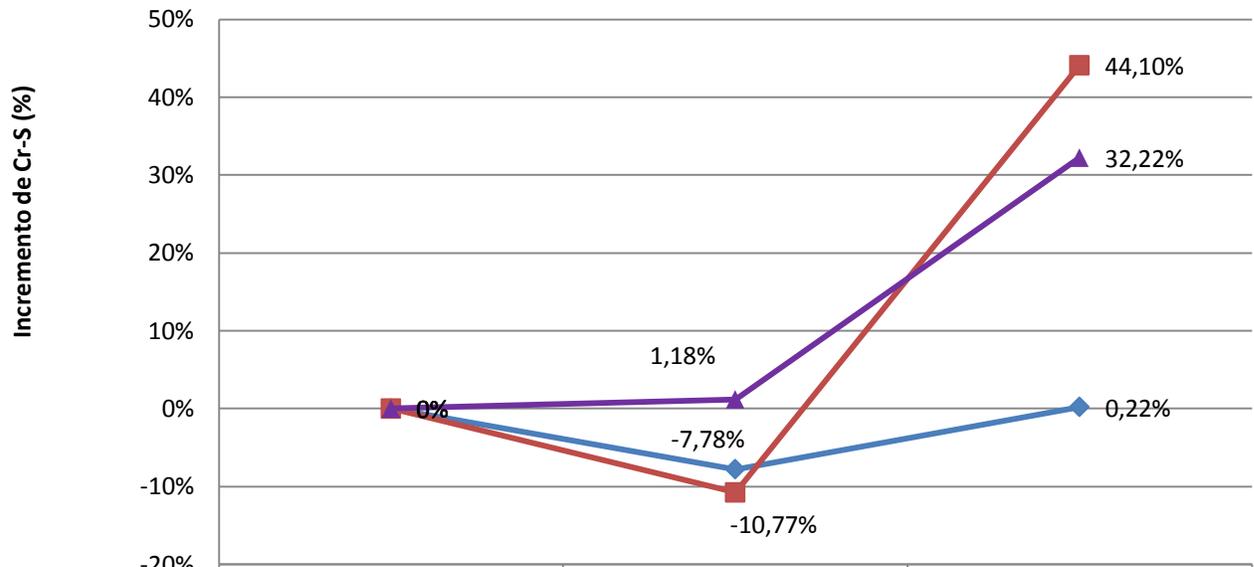
Creatinina Sérica.

Los valores de creatinina sérica superaron la prueba exploratoria de normalidad mediante la aplicación del test de D'Agostino Pearson, la homogeneidad de los datos fue validada para su posterior análisis paramétrico.

El comportamiento del parámetro creatinina en cada grupo se analizó mediante el dato obtenido en cada uno de los momentos de la toma (3 en total) la tendencia de los grupos Sham y Control exhiben un comportamiento similar en el que se observan decrementos de los valores en el segundo momento de la muestra 7.78% y 10.77% respectivamente, mientras que para el grupo tratado con Ácido Ascórbico describe un aumento de 1.18%.

El análisis concluyente del incremento del valor de creatinina desde la primera muestra (M1) hasta el final del proceso experimental (M3) muestra valores de incrementos porcentuales de 44.10% en el grupo Control, 0.22% en el grupo Sham y 32.22% en el grupo tratado con Acido Ascórbico.

COMPORTAMIENTO DE LA VARIABLE CREATININA /INCREMENTO PORCENTUAL POR TOMA



	M1	M2	M3
SHAM	0%	-7,78%	0,22%
CONTROL	0%	-10,77%	44,10%
ACIDO ASCORBICO	0%	1,18%	32,22%

Gráfico 1. Variación porcentual de la media de Cr-S por grupo y momento de muestra

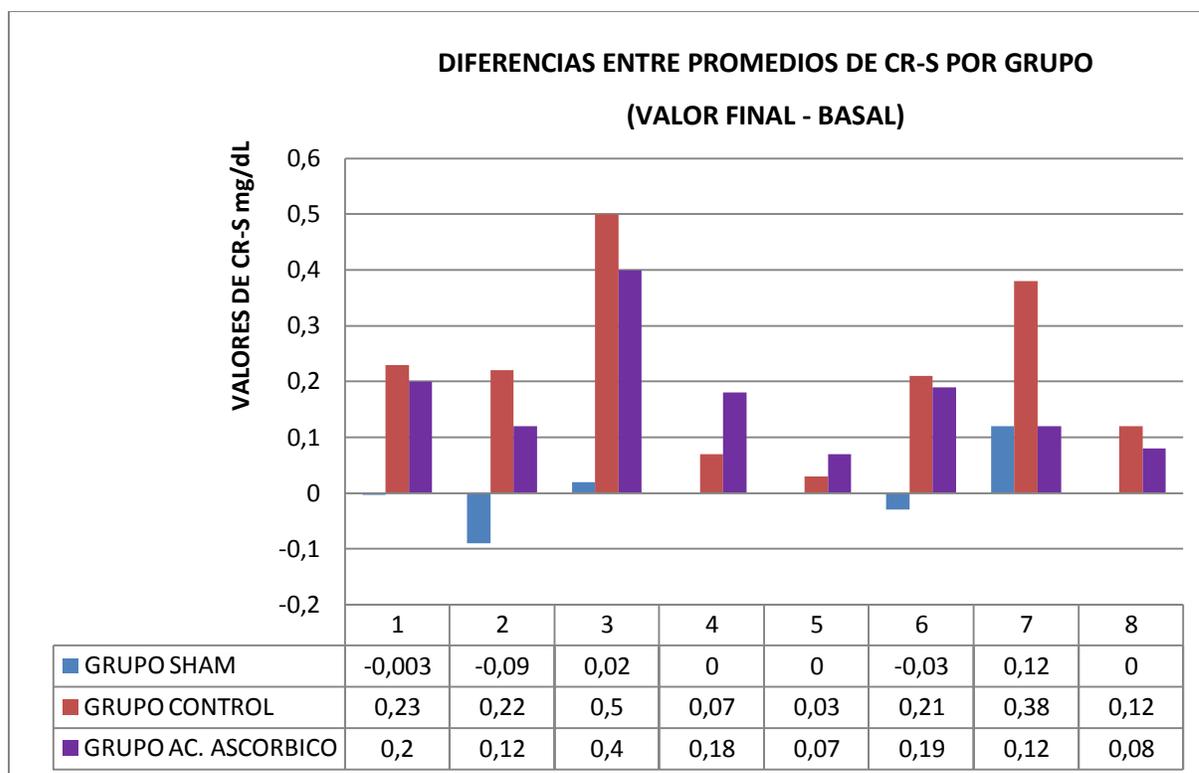


Gráfico 2. Diferencias entre promedios de Cr-S por grupos

Resultados intragrupo.

El análisis intragrupo por ANOVA no mostro variación estadísticamente significativa para los diferentes tiempos de muestra (M1, M2 y M3) en el grupo Sham $p= 0.098$, mientras que los cambios observados en el tiempo y la tendencia al incremento de los valores de creatinina en los grupos Control y Acido Ascórbico mostraron significancia estadística $p<0.0001$ y $p<0.001$ respectivamente mostrándose específicamente entre los valores de la tomas M1-M3 y M2-M3

Los sujetos de experimentación fueron analizados de acuerdo al incremento de los niveles de creatinina basal (M1) y final (M3) para estadificar el grado de injuria según los criterios propuestos

por la ADQI (Acute Dialysis Quality Initiative) para injuria renal aguda, conocidos con el acrónimo RIFLE (Risk, Injury, Failure, Loss, End-Stage Renal Disease). (Ver gráfica 3 y tabla 9).

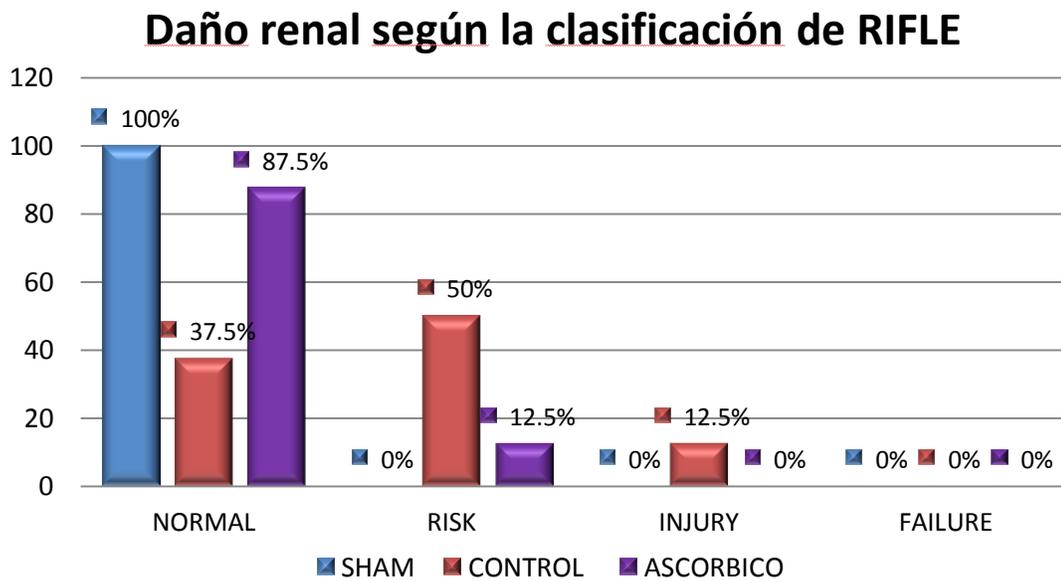


Gráfico 3. Daño renal según clasificación RIFLE

Tabla 8. Estadificación de daño renal según RIFLE/Distribución porcentual por grado de daño

	NORMAL	RISK	INJURY	FAILURE
SHAM	100	0	0	0
CONTROL	37.5	50	12.5	0
ASCORBICO	87.5	12.5	0	0

Resultados intergrupo

La comparación entre grupos mediante test de ANOVA para la primera (M1) y segunda toma (M2) no mostraron significancia estadística $p=0.3545$ y $p=0.0843$, el análisis correspondiente a la toma final del procedimiento experimental exhibe variación estadística $p=0.0123$, presentándose entre el grupo Control vs grupo Sham ($p<0.05$) y entre Control vs Acido Ascórbico ($p<0.05$).

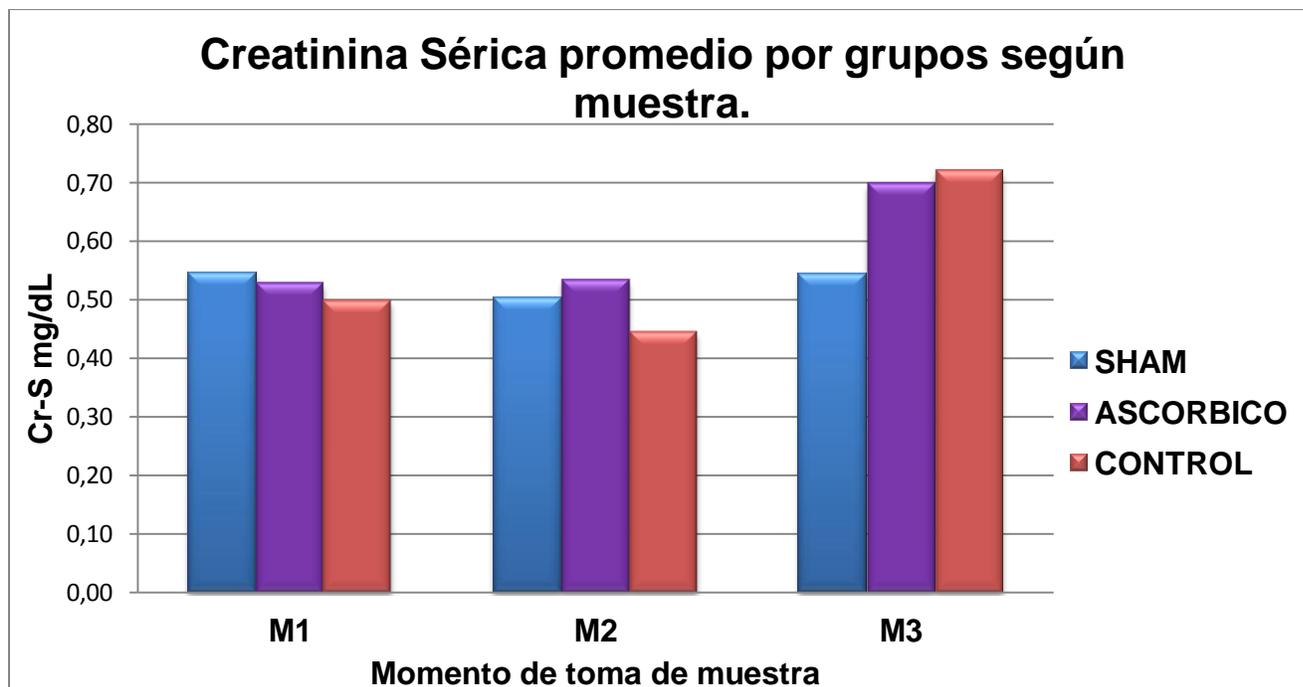


Gráfico 4. Daño renal según clasificación RIFLE

Gasto Urinario.

Los resultados referentes a la cuantificación de la diuresis deben ser analizados con precaución debido a fallas en el diseño de las cajas metabólicas en donde se presentaban pérdidas urinarias no cuantificables. Los resultados presentados son el resultado de la comparación de medias de las diuresis día/grupo experimental.

Se observó una tendencia a la poliuria en la fase inicial de adaptación con una posterior estabilización a la normalidad (7° día); entre el 9° y 11° día es perceptible un incremento de la diuresis dentro del

grupo Control alcanzando niveles acordes a la poliuria, los grupos Sham y Acido Ascórbico se mantienen en rangos normales hasta la finalización de la fase experimental. (Ver grafica 3).

GASTO URINARIO PROMEDIO

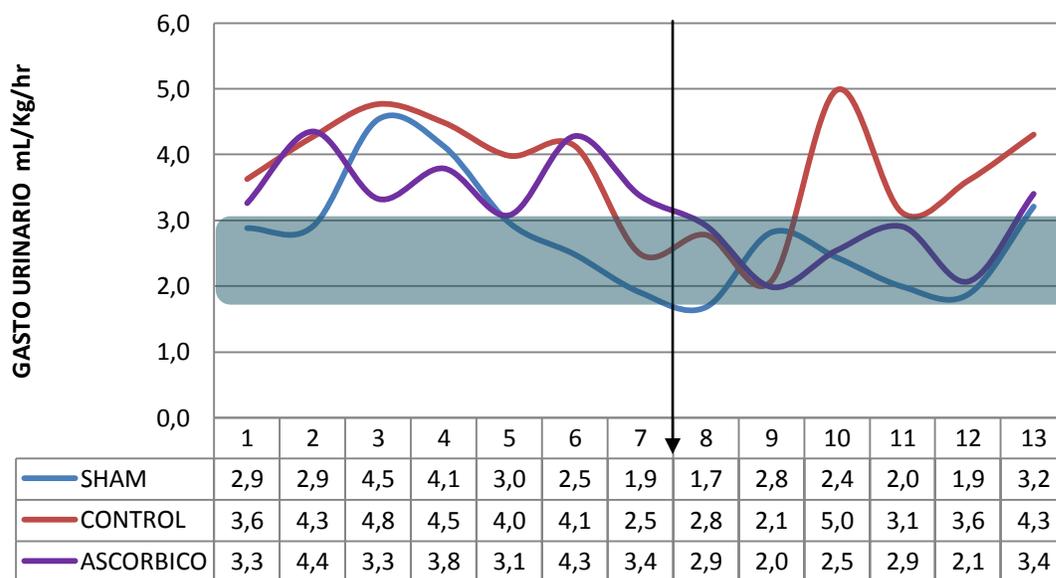


Gráfico 5. Promedio de Gasto urinario por día y grupo de experimentación

■ Rango normal de diuresis en conejos (50-75 ml/kg/día)

N-acetil β-D glucosaminidasa NAG

El resultado de la prueba exploratoria para establecer normalidad mediante el test de D’Agostino Pearson no fue superado por lo que los datos fueron analizados mediante estadística no paramétrica

Análisis intragrupo.

El análisis de la actividad enzimática de NAG muestra significancias estadísticas para los grupos Control y Sham $p=0.0003$ y $p<0.0001$, respectivamente; focalizada para el grupo control entre la

primera y la tercera medición (M1-M3) ($p < 0.0001$) y para el grupo Sham se identificaron valores con diferencias estadísticamente significativas en M1-M3 y M2-M3, ($p < 0.001^{**}$) y ($p < 0.05^{*}$) respectivamente. El grupo tratado con Acido Ascórbico no evidenció significancia estadística ($p = 0.3651$) entre las tomas.

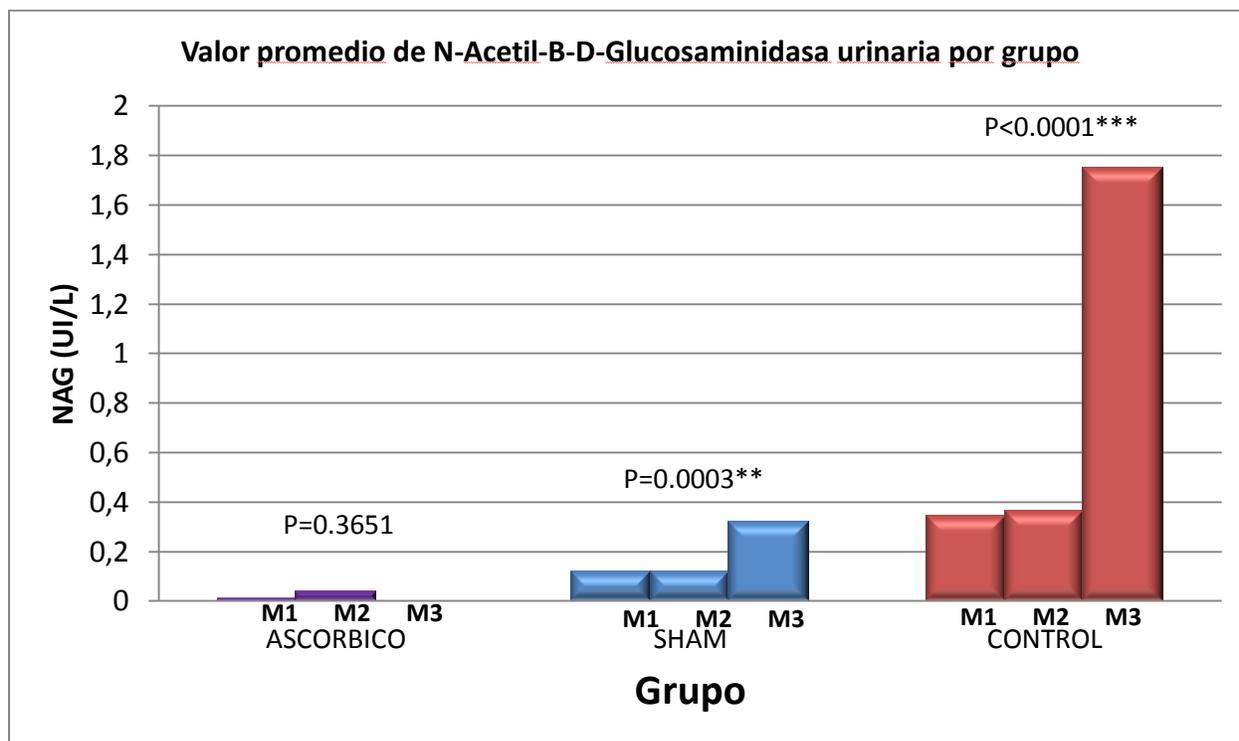


Gráfico 6. Valor promedio de N-Acetil-B-D-glucosaminidasa urinaria por grupo

Análisis intergrupo.

Los análisis por Kruskal Wallis de los valores correspondientes a la actividad enzimática entre cada grupo y en la toma basal (M1) no mostraron diferencias estadísticas ($p = 0.4263$). Mientras que para M2

y M3 fueron significativas $p=0.019$ y $p<0.0001$ respectivamente, El post test de Dunn reveló diferencias entre los grupos Control - Acido Ascórbico en M2 = $p<0.01$ y M3 = $p<0.001$.

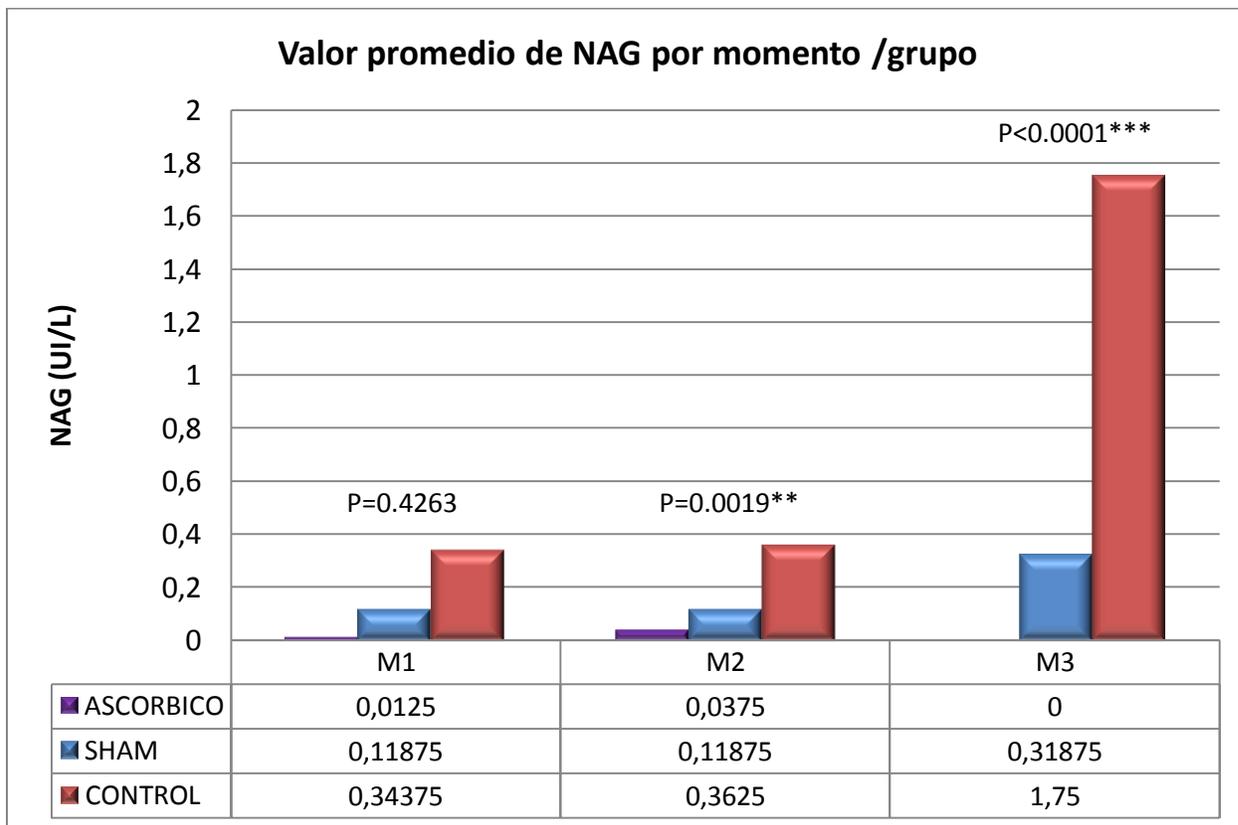


Gráfico 7. Actividad enzimática de NAG por grupo de experimentación y tiempo

Histopatología Renal

Hallazgos macroscópicos.

No se encontraron alteraciones anatómicas congénitas o preestablecidas en las unidades experimentales.

Hallazgos incidentales.

El análisis histopatológico por microscopia de luz, reveló los siguientes hallazgos de forma incidental:

- Microquistes renales.
- Infiltración grasa.
- Congestión vascular glomerular.

En 1 sujeto del grupo Sham y en 2 sujetos del grupo Control, se evidenció hemorragia intra parenquimatosa renal de etiología traumática.

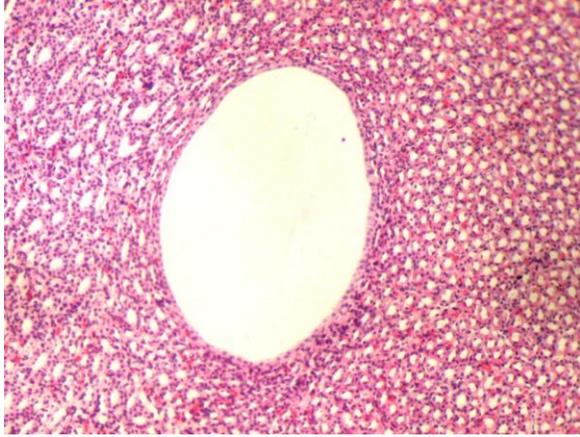


Ilustración 15. Conejo Sham #6. Hallazgo incidental de microquiste renal visto al microscopio de luz, tinción hematoxilina-eosina (magnificación 4x)

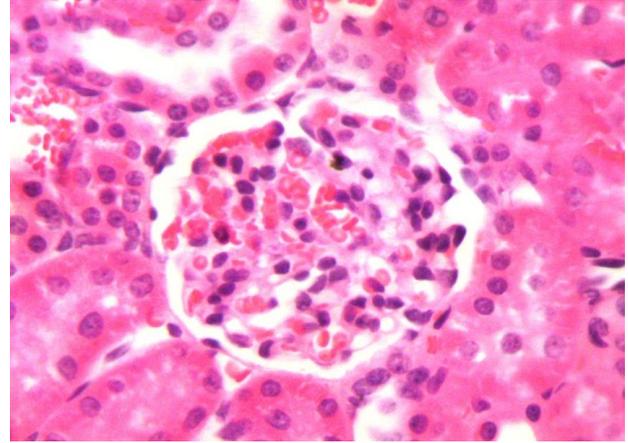


Ilustración 16. Conejo Sham #1. Hallazgo incidental de dilatación y congestión vascular, visto al microscopio de luz, tinción hematoxilina-eosina (magnificación 40x)

Hallazgos en Grupo Control.

Hallazgos histopatológicos congruentes con NTA.

- Detritos celulares.
- Restos proteínicos intraluminales.
- Pérdida del borde en cepillo.
- Cambios mitóticos.
- Apoptosis.

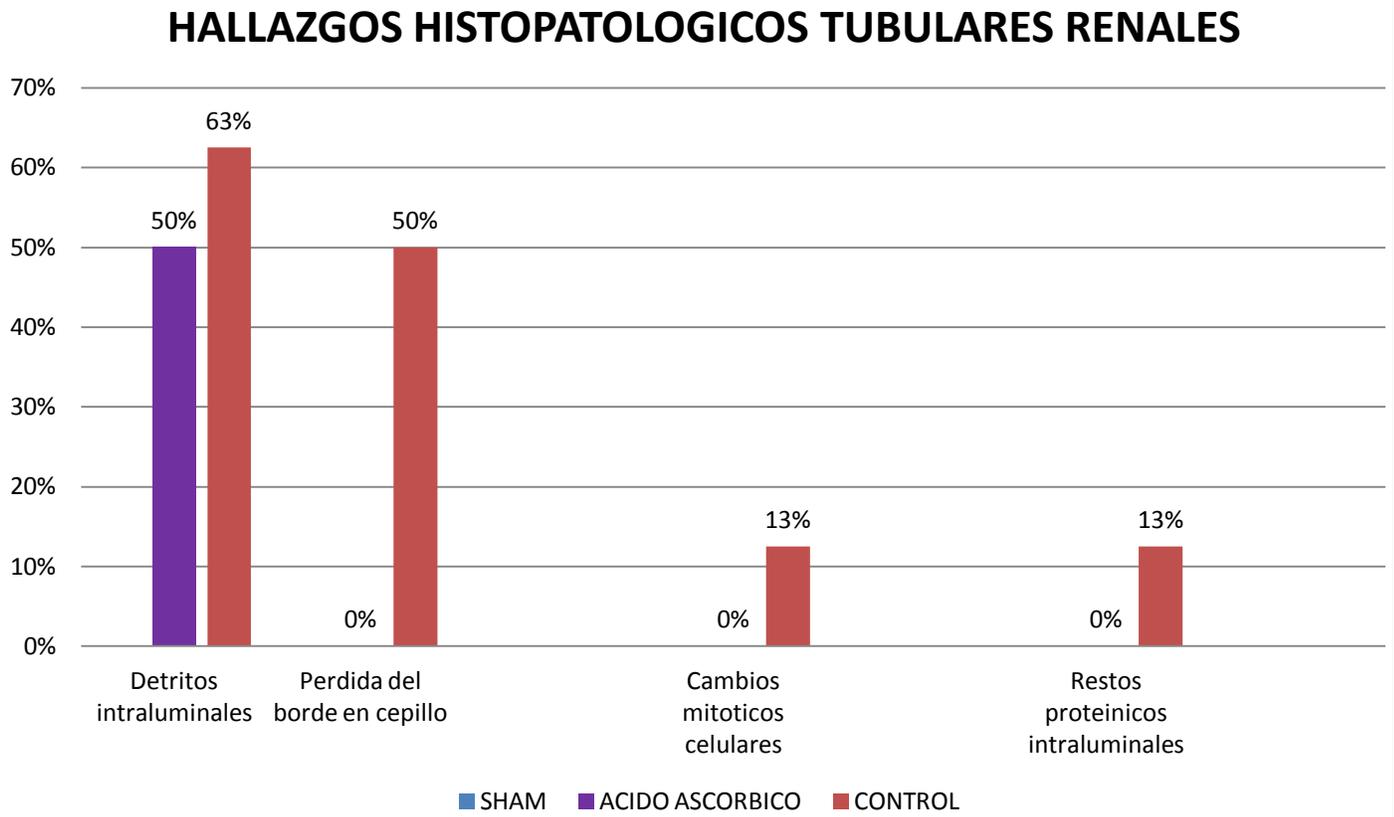
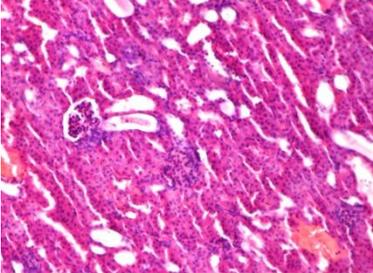
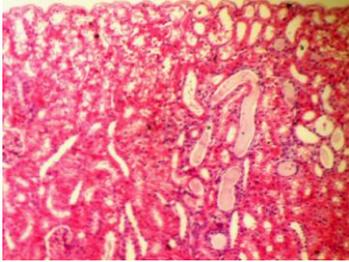
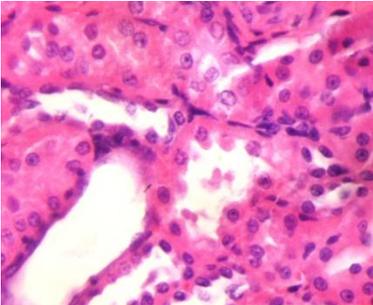
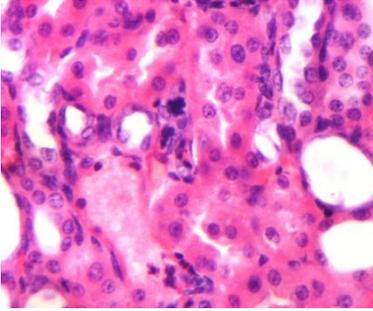
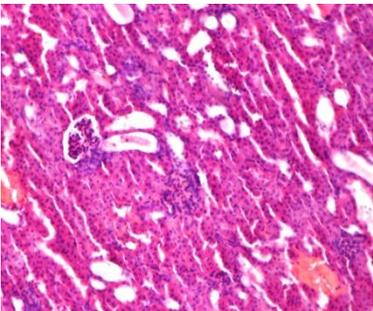


Ilustración 17. Hallazgos histopatológicos de necrosis tubular aguda

Tabla 9. Hallazgos histopatológicos por grupo de experimentación.

GRUPO/ HALLAZGO HISTOPATOLOGICO	GRUPO SHAM		GRUPO CONTROL		GRUPO ACIDO ASCORBICO	
DETRITOS INTRALUMINARES	AUSENTE	0%		63%		50%
PERDIDA DEL BORDE EN CEPILLO	AUSENTE	0%		50%	AUSENTE	0%

CAMBIOS MITOTICOS CELULARES	AUSENTE	0%		13%	AUSENTE	0%
RESTOS PROTEINICOS INTRALUMINARES	AUSENTE	0%		13%	AUSENTE	0%

Estadificación de daño tubular proximal.

Se utilizó la escala propuesta por Houghton & cols., a través de la cual se identificó al 100% de los sujetos del grupo Sham con criterios de normalidad. Luego, en el grupo Control se ubicó 87.5% dentro del estadio 3, y el 12.5% restante en el estadio 4. Finalmente, en el grupo de Acido Ascórbico 50% se encontró dentro de la categoría 1, mientras que el 50% restante correspondió a la categoría 2.

SCORE PROMEDIO DAÑO HISTOPATOLOGICO RENAL

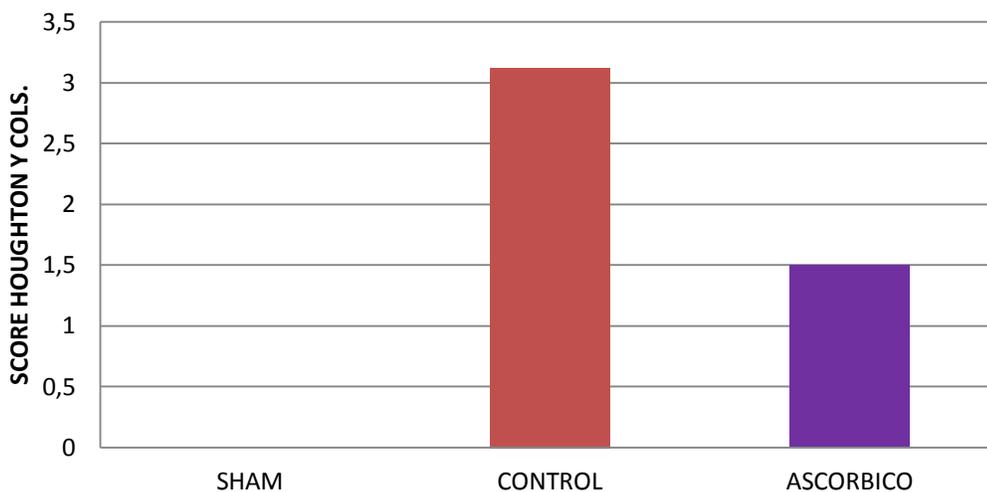


Gráfico 8. Score promedio de daño histopatológico renal (Houghton y cols)

Análisis estadístico.

La prueba exploratoria de normalidad no fue superada, el tratamiento estadístico de los datos para la evaluación histopatológica se realizó mediante el test de Kruskal Wallis, que reveló significancia estadística entre los tres grupos ($p < 0.0001$ ****), encontrando además diferencias entre el grupo Sham y Control ($p < 0.001$ ***). No existió diferencia estadísticamente significativa entre los grupos Sham vs. Acido Ascórbico ni entre el grupo Control vs. Acido Ascórbico ($p > 0.05$).

DISCUSION.

La injuria renal aguda puede estar asociada al uso de aminoglicósidos (AMG), antimicrobianos usados en escenarios clínicos para el control de enfermedades infecciosas ocasionadas por bacterias gram negativas. Los mecanismos involucrados en la nefrotoxicidad ocasionada por AMG son diversos, entre ellos se encuentran la muerte de las células tubulares, las alteraciones subletales en la reabsorción tubular, el daño glomerular y el stress oxidativo (Rivas-Cabañero, 1995).

Se ha demostrado que animales tratados con dosis bajas pero terapéuticas (10-20 mg/kg/día) de AMG, han presentado apoptosis y fosfolipidosis lisosomal en las células tubulares proximal(51) (El Mouddeh et al., 2000), su uso en humanos ha demostrado que la administración de gentamicina está relacionada directamente a daño tubular renal, corroborándose con elevaciones significativas de la enzima N-acetil- β -D glucosaminidasa y elevación de parámetros bioquímicos como la creatinina sérica(52,53), Wiland et al, 2003 y Selby et al., 2009. Desde este punto de vista y dada la utilidad de estos agentes terapéuticos en el manejo de infecciones por gram negativos surge la posibilidad de investigar sustancias capaces de disminuir directa o indirectamente el impacto nefrotóxico de la gentamicina; situación en la cual juegan un papel importante los antioxidantes.

El ácido ascórbico es un reconocido antioxidante que actúa como barredor de radicales libres de oxígeno y como co-antioxidante (Padayatti et al, 2004)(42). La mayoría de sus reacciones se deben a su fuerte potencial reductor desplazando al ácido L-ascórbico a su forma oxidada L-dehidroascórbico, lo cual permite su acción contra radicales oxidativos (Ustundag et al, 2008). Dichos mecanismos lo

hacen idóneo para plantear su uso como aminorador del daño oxidativo ocasionado a nivel renal por la gentamicina.

El modelo animal de nefrotoxicidad inducida por gentamicina permitió evaluar el efecto protector de ácido ascórbico mediante la determinación de parámetros bioquímicos, enzimáticos e histopatológicos. A su vez, éste logra reproducir el efecto deletéreo de la dosis de gentamicina utilizada en el tiempo. El resultado del análisis estadístico demuestra variaciones estadísticas dentro del grupo control en los diferentes momentos ($p < 0.05$), además se observa la tendencia a la elevación de los niveles séricos de creatinina, con el incremento concomitante de la actividad enzimática (NAG) con respecto a los demás grupos experimentales.

La tendencia al incremento de los niveles de Cr-S entre M2 y M3 (72 horas), concuerdan con la literatura, donde se cita que la elevación de la creatinina logra detectarse a partir de las primeras 48-72 horas posterior a la injuria renal (53) (Lerma et al, 2011). Sin embargo los incrementos porcentuales dados de M1 a M3 fueron de 0.22% en el grupo SHAM ($p=0.0989$), 44.1% para el grupo tratado con Gentamicina ($p=0.0001$) y 32.22% para el grupo tratado con Acido Ascórbico ($p=0.0011$), dichos resultados muestran un efecto amortiguador leve en el incremento de creatinina, en comparación al daño ocasionado por gentamicina administrada aisladamente, esta diferencia no reportó significancia estadística, pero es sustentada por la tendencia en la disminución observada en los parámetros de actividad enzimática e histopatología que se reportaran más adelante. Los estudios realizados por (Stojiljkovic et al, 2010; Mehri et al, 2005) reflejan tendencias similares en el comportamiento de Cr-S posterior al tratamiento único con gentamicina vs. Tratamiento con gentamicina y ácido ascórbico administrado simultáneamente.

Al analizar las muestras de Cr-S individualmente, se evidenció que según la clasificación RIFLE el 100% de los sujetos del grupo Sham se encuentran dentro de una categoría “Normal”, mientras que en el grupo Control se encontró una distribución de estadificación en la categoría “Risk” (Riesgo) a un 50% de las unidades experimentales, 12.5% en “Injury” (Injuria), y un 37.5% restante en el grado de “Normal”. En forma contrastante, el grupo tratado con Acido Ascórbico en su mayoría 87.5% se ubico en la categoría NORMAL y un 12.5% ubicado en “Risk” permitiendo concluir que la aplicación de Gentamicina en el modelo genera mayores porcentajes de daño renal; resultados que extrapolados a información bibliográfica clínica muestran un comportamiento similar, [Selby et al, en el año 2009](#) estudiaron durante un mes a 228 pacientes tratados con gentamicina a los que se monitorizo sus niveles de creatinina sérica los resultados dentro de la clasificación RIFLE obtuvieron porcentajes de 17.7% en risk, 4.3% en injury, 2.4% en failure.

La actividad enzimática de N-Acetil- β -D glucosaminidasa guarda una estrecha relación con el daño del túbulo proximal renal, sitio en donde se localiza el daño por AMG, el incremento de las cifras de la actividad enzimática son proporcionales a la magnitud del daño tubular proximal, en el modelo los valores encontrados resultaron ser ascendentes para el grupo control con una \bar{x} en M1 de 0.4287UI/L y 1.4UI/L en M3 (327%), en el grupo Sham una elevación porcentual de 185% y CERO elevación para el grupo tratado con acido ascórbico, resultados esperanzadores a favor de la terapia con vitamina C, respaldado por [Mehri y colaboradores en el año 2005](#) quienes reportaron la inhibición de las enzimas urinarias mediante la administración oral de 200 mg de acido ascórbico solo o en combinación a vitamina E, en ratas tratadas con gentamicina.

El gasto urinario al inicio de la fase de ambientación estuvo manifestado en poliuria, muy probablemente debido a estrés de los sujetos de experimentación. Después de esta fase de ambientación se consigue una estabilización previa a la fase terapéutica.

La fase de tratamiento mostro una tendencia al aumento del gasto urinario, sin embargo los niveles del gasto urinario en el grupo control alcanzaron niveles poliúricos entre el 9°-11° como lo describe

López-Novoa, 2011 en donde se afirma el desarrollo de una falla renal no oligúrica o poliúrica por el uso de aminoglucósidos. Dicha tendencia no fue observada en los grupos Sham o Acido Ascórbico donde se observaron valores dentro de los límites normales de diuresis.

El análisis histopatológico muestra lesiones principalmente en el epitelio tubular proximal, tal como se ha observado en otros estudios que aplican modelos similares en los que se ha administrado gentamicina, evidenciando hallazgos de necrosis tubular aguda.

Los resultados derivados del estudio muestran un 63% de unidades experimentales con detritos intraluminales proteínicos, los hallazgos referentes a la pérdida del borde en cepillo (50%), cambios celulares mitóticos (13%), restos proteínicos intraluminales (13%) entre otros. Stojiljkovic et al, y Mehri et al reportan estos hallazgos de igual manera. Es importante recalcar que la presencia de las características anteriores fueron vistas a predominancia del grupo tratado con gentamicina, contrario al comportamiento del grupo sham y acido ascórbico, donde las alteraciones histopatológicas fueron significativamente menores o nulas.

La evidencia obtenida del modelo permite concluir que el acido ascórbico aminora el efecto nefrotóxico de la gentamicina, inhibe la actividad enzimática y disminuye los porcentajes relativos de daño renal convirtiéndolo en un agente nefroprotector.

CONCLUSIONES.

- Gentamicina a dosis de 80 mg/kg/día vía I.M. en conejos, durante un periodo de 5 días, se comporta conforme al escenario clínico, por lo tanto puede constituir un modelo experimental para estudios de daño por AMG.
- A pesar de no haber obtenido una diferencia estadísticamente significativa, el ácido ascórbico presentó niveles séricos de creatinina considerablemente menores que el grupo Control.
- La actividad de la enzima N-acetil β -D glucosaminidasa fue considerablemente mayor en el grupo manejado aisladamente con Gentamicina.
- El ácido ascórbico inhibe totalmente la actividad de la enzima N-acetil- β -D glucosaminidasa a dosis de 200 mg/kg/día por vía intraperitoneal, durante un periodo de 5 días.
- A través del análisis del gasto urinario, se concluye que la gentamicina induce una falla renal no oligúrica/polirúrica.
- La gentamicina induce lesiones en el túbulo proximal renal, visibles a la microscopia de luz, relacionadas a las alteraciones bioquímicas, enzimáticas y funcionales del riñón. Mientras que el ácido ascórbico aminora histopatológicamente el daño renal.

RECOMENDACIONES.

- Realizar modelos con una mayor cantidad de sujetos experimentales, y aumentar así el tamaño de la muestra.
- Realizar mejoras en el diseño estructural de la caja metabólica, para obtener medidas más exactas de la diuresis en cada sujeto de experimentación.
- Ejecutar estudios de investigación en los que se observe el comportamiento de los parámetros bioquímicos, enzimáticos y funcionales con mayor frecuencia y durante un mayor periodo de tiempo.
- Elaborar trabajos experimentales utilizando ácido ascórbico y vitamina E como sustancias nefroprotectoras de manera aislada y simultáneamente.
- Realizar modelos experimentales de injuria renal aguda, evaluando otras variables que puedan brindar información funcional adicional, entre ellos: tasa de filtración glomerular, depuración de creatinina, densidad urinaria, fosfolipiduria, Na⁺ y K⁺ urinario, microscopía electrónica.
- Formular modelos experimentales que utilicen ácido ascórbico por otras vías de administración, menos invasivas que la vía intraperitoneal.

PRESUPUESTO

Tabla 10. Presupuesto

Insumo	Costo (\$)
Gentamicina	115.50
Jaulas primeras	65.00
Jaulas segundas	18.00
Mallas	8.80
Mano de obra jaulas	48.00
Alambrón	2.30
Abrazaderas	7.55
Ketamina primera fase	60.00
Conejos piloto	30.80
Conejos Sham/Control	61.60
Concentrado conejos	18.75
Ganchos adhesivos	5.10
Botellas para bebederos	5.52
Botes de vidrio (riñones)	9.00

Conejos Ac. Asc./DMSO	61.60
Ketamina segunda fase	20.00
Abastecimiento concentrado	6.00
Jeringas	31.93
Agujas	8.82
Tubos de ensayo	10.00
Pipetas	6.78
Caja para láminas microscopio	11.30
Cajas para transporte muestras en formalina	8.36
Pinzas Murphy	15.00
Solución Salina Normal 0.9% # 2	4.44
Báscula	18.00
Puntas azules para pipeta	1.81
Puntas amarillas para pipeta	6.23
Envíos de muestras a laboratorio	69.30
Gabachones	50.00
Kit de NAG (N-Acetil-β-D glucosaminidasa)	1200.00
Total Presupuesto	\$1,985.49

CRONOGRAMA.

Tabla 11. Cronograma de trabajo

PROYECTO	FECHA INICIO	DURACION	FECHA FINAL
SELECCIÓN DE TEMA DE INVESTIGACION	1/2/2011	20	20/02/2011
BUSQUEDA DE BIBLIOGRAFIA	21/02/2011	8	28/02/2011
REDACCION DE PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, JUSTIFICACION, MARCO TEORICO	1/3/2011	11	11/3/2011
ENTREGA PROTOCOLO PRELIMINAR	12/3/2011	1	12/3/2011
REDACCION DE OBJETIVOS, MARCO TEORICO, BIBLIOGRAFIA	13/3/2011	15	27/3/2011
CORRECCIONES POR ASESOR	27/3/2011	5	31/3/2011
PRESUPUESTO	11/4/2011	18	28/4/2011
DISEÑO Y CONSTRUCCION DE CAJAS METABOLICAS	2/5/2011	27	29/5/2011
PRUEBA DE FUNCIONALIDAD DE CAJAS METABOLICAS	30/5/2011	7	5/6/2011
SOLICITAR AUTORIZACION PARA ALOJAR CONEJOS EN LABORATORIO DE UJMD	6/6/2011	6	12/6/2011
LOGISTICA DE FASE EXPERIMENTAL	13/6/2011	7	19/6/2011
COMPRA DE CONEJOS SEÑUELO Y AMBIENTACION POR 1 SEMANA	27/6/2011	7	3/7/2011
EJECUCION DE PRUEBA PILOTO	4/7/2011	8	11/7/2011
ANALISIS DE RESULTADOS P. PILOTO	11/7/2011	7	17/7/2011
COMPRA DE CONEJOS GRUPO SHAM Y AMBIENTACION	18/7/2011	7	24/7/2011
EJECUCION FASE EXPERIMENTAL GRUPO SHAM	25/7/2011	7	31/7/2011
ANALISIS DE RESULTADOS GRUPO SHAM	1/8/2011	7	7/8/2011
COMPRA DE CONEJOS GRUPO CONTROL Y AMBIENTACION	8/8/2011	7	14/8/2011
EJECUCION DE FASE EXPERIMENTAL GRUPO CONTROL	15/8/2011	7	21/8/2011
ANALISIS RESULTADOS GRUPO CONTROL	22/8/2011	7	28/8/2011
COMPRA DE CONEJOS GRUPO ACIDO ASCORBICO Y AMBIENTACION	29/8/2011	7	4/9/2011
EJECUCION DE FASE EXPERIMENTAL GRUPO AC. ASCORBICO	5/9/2011	7	11/9/2011
ANALISIS DE RESULTADOS GRUPO AC. ASCORBICO	12/9/2011	7	18/9/2011
ENTREGA DE MUESTRAS A PATOLOGO	25/9/2011	1	25/9/2011
CONSOLIDADO DE RESULTADOS	26/9/2011	7	2/10/2011
LECTURA DE MUESTRAS HISTOPATOLOGICAS	3/10/2011	7	9/10/2011
REDACCION DE RESULTADOS, ANALISIS, DISCUSION, CONCLUSIONES Y	10/10/2011	7	16/10/2011

RECOMENDACIONES			
REVISION DE DOCUMENTO FINAL CON ASESOR	24/10/2011	7	30/10/2011
CORRECCIONES FINALES DE DOCUMENTO	31/10/2011	7	6/11/2011
ENTREGA DE DOCUMENTO FINAL A COMITÉ DE GRADUACION Y EVALUADOR	7/11/2011	7	13/11/2011
ELABORACION DE PRESENTACION DE DEFENSA DE TESIS	14/11/2011	14	27/11/2011
DEFENSA ORAL DE TESIS	1/2/2012	25	25/2/2012

ANEXOS

Anexo 1. Volumen urinario y gasto urinario por día y por sujeto de experimentación

GRUPO SHAM.

GRUPO/ # DE CONEJO	DIA	PESO Kg	VOL. URINARIO mL	GASTO URINARIO mL/kg/hr
CS1	1	1.3	64	2.1
	2		41	1.3
	3		80	2.6
	4		155	5.0
	5		50	1.6
	6		40	1.3
	7		36	1.2
	8	1.3	52	1.7
	9		60	1.9
	10		43	1.4
	11		50	1.6
	12		50	1.6
	13		41	1.3
CS2	1	1.2	100	3.5
	2		145	5.0
	3		125	4.3
	4		125	4.3
	5		100	3.5

	6		118	4.1
	7		62	2.2
	8	1.3	71	2.3
	9		155	5.0
	10		136	4.4
	11		80	2.6
	12		150	4.8
	13		128	4.1
CS3	1	1.3	85	2.7
	2		100	3.2
	3		140	4.5
	4		210	6.7
	5		50	1.6
	6		102	3.3
	7		55	1.8
	8	1.3	42	1.3
	9		60	1.9
	10		56	1.8
	11		40	1.3
	12		50	1.6
	13		45	1.4

CS4	1	1.2	80	2.8
	2		97	3.4
	3		140	4.9
	4		90	3.1
	5		110	3.8
	6		75	2.6
	7		48	1.7
	8	1.35	50	1.5
	9		60	1.9
	10		102	3.1
	11		145	4.5
	12		50	1.5
	13		174	5.4
CS5	1	1.2	100	3.5
	2		78	2.7
	3		200	6.9
	4		30	1.0
	5		60	2.1
	6		55	1.9
	7		35	1.2
	8	1.3	50	1.6

	9		170	5.4
	10		70	2.2
	11		40	1.3
	12		50	1.6
	13		87	2.8
CS6	1	1.2	110	3.8
	2		60	2.1
	3		200	6.9
	4		200	6.9
	5		150	5.2
	6		51	1.8
	7		77	2.7
	8	1.3	45	1.4
	9		70	2.2
	10		80	2.6
	11		40	1.3
	12		40	1.3
	13		76	2.4
CS7	1	1.2	70	2.4
	2		60	2.1
	3		105	3.6

	4		115	4.0
	5		80	2.8
	6		63	2.2
	7		50	1.7
	8	1.4	47	1.4
	9		80	2.4
	10		50	1.5
	11		35	1.0
	12		45	1.3
	13		164	4.9
CS8	1	2	110	2.3
	2		165	3.4
	3		120	2.5
	4		90	1.9
	5		150	3.1
	6		130	2.7
	7		136	2.8
	8	1.4	72	2.1
	9		60	1.8
	10		83	2.5
	11		80	2.4

	12		40	1.2
	13		112	3.3

GRUPO CONTROL.

GRUPO	DIA	PESO Kg	VOL. URINARIO mL	GASTO URINARIO mL/kg/hr
CC1	1	1	85	3.5
	2		70	2.9
	3		75	3.1
	4		75	3.1
	5		75	3.1
	6		63	2.6
	7		42	1.8
	8	1.025	46	1.9
	9		55	2.2
	10		100	4.1
	11		30	1.2
	12		85	3.5

	13		100	4.1
CC2	1	1.2	100	3.5
	2		125	4.3
	3		100	3.5
	4		135	4.7
	5		120	4.2
	6		85	0.7
	7		86	3.0
	8	1.2	60	2.1
	9		55	1.9
	10		100	3.5
	11		60	2.1
	12		95	3.3
	13		96	3.3
CC3	1	1.3	90	2.9
	2		120	3.8
	3		110	3.5
	4		110	3.5
	5		100	3.2
	6		187	6.0
	7	85	2.7	

	8		125	4.7
	9		60	2.3
	10		225	8.5
	11		165	6.3
	12		100	3.8
	13	1.1	152	5.8
CC4	1	1.2	100	3.5
	2		140	4.9
	3		150	5.2
	4		135	4.7
	5		130	4.5
	6		110	3.8
	7		47	1.6
	8	1.25	92	3.1
	9		45	1.5
	10		196	6.5
	11		100	3.3
	12		100	3.3
	13		67	2.2
CC5	1	1.2	100	3.5
	2		150	5.2

	3		180	6.3
	4		155	5.4
	5		150	5.2
	6		90	3.1
	7		45	1.6
	8		46	1.6
	9		80	2.8
	10		105	3.6
	11		90	3.1
	12		80	2.8
	13	1.2	76	2.6
CC6	1		110	4.2
	2		145	5.5
	3		180	6.8
	4		185	7.0
	5		105	4.0
	6		183	6.9
	7	1.1	33	1.3
	8		95	3.3
	9		50	1.7
	10	1.2	172	6.0

	11		100	3.5
	12		130	4.5
	13		178	6.2
CC7	1	1.2	130	4.5
	2		120	4.2
	3		110	3.8
	4		100	3.5
	5		110	3.8
	6		166	5.8
	7		135	4.7
	8	1.2	45	1.6
	9		30	1.0
	10		45	1.6
	11		60	2.1
	12		80	2.8
	13		142	4.9
CC8	1	1.2	100	3.5
	2		95	3.3
	3		170	5.9
	4		115	4.0
	5		110	3.8

	6		117	4.1
	7		94	3.3
	8	1.2	115	4.0
	9		90	3.1
	10		175	6.1
	11		95	3.3
	12		140	4.9
	13		152	5.3

GRUPO ACIDO ASCORBICO.

GRUPO	DIA	PESO Kg	VOL. URINARIO mL	GASTO URINARIO mL/kg/hr
CA1	1	1.25	82	2.7
	2		105	3.5
	3		95	3.2
	4		60	2.0
	5		50	1.7
	6		60	2.0
	7		30	1.0
	8		100	3.3

	9		30	1.0
	10		55	1.8
	11		60	2.0
	12		40	1.3
	13		50	1.7
CA2	1		150	5.2
	2		100	3.5
	3		165	5.7
	4		100	3.5
	5		60	2.1
	6		80	2.8
	7		45	1.6
	8		40	1.4
	9		10	0.3
	10		40	1.4
	11		80	2.8
	12		50	1.7
	13	1.2		70
CA3	1		93	3.2
	2		180	6.3
	3	1.2		140

	4		165	5.7
	5		150	5.2
	6		200	6.9
	7		150	5.2
	8		215	7.5
	9		120	4.2
	10		120	4.2
	11		90	3.1
	12		30	1.0
	13		50	1.7
CA4	1		45	1.6
	2		130	4.7
	3		105	3.8
	4		100	3.6
	5		120	4.3
	6		150	5.4
	7		165	6.0
	8		50	1.8
	9		35	1.3
	10		40	1.4
	11	1.15	50	1.8

	12		50	1.8
	13		100	3.6
CA5	1	1.2	110	3.8
	2		120	4.2
	3		60	2.1
	4		95	3.3
	5		100	3.5
	6		140	4.9
	7		80	2.8
	8		80	2.8
	9		60	2.1
	10		50	1.7
	11		40	1.4
	12		50	1.7
	13		60	2.1
CA6	1	1.1	120	4.5
	2		100	3.8
	3		50	1.9
	4		105	4.0
	5		50	1.9
	6		50	1.9

	7		50	1.9
	8		60	2.3
	9		80	3.0
	10		55	2.1
	11		70	2.7
	12		60	2.3
	13		140	5.3
CA7	1		66	2.2
	2		80	2.7
	3		50	1.7
	4		110	3.7
	5		65	2.2
	6		60	2.0
	7		120	4.0
	8		50	1.7
	9		35	1.2
	10		135	4.5
	11		80	2.7
	12		40	1.3
	13	1.25		90
CA8	1	1.1	72	2.7

	2	165	6.3
	3	90	3.4
	4	120	4.5
	5	100	3.8
	6	220	8.3
	7	120	4.5
	8	70	2.7
	9	75	2.8
	10	85	3.2
	11	180	6.8
	12	140	5.3
	13	195	7.4

Anexo 2. Escala de daño tubular (Houghton y cols) Escala de daño tubular.

FECHA _____

ESPECIMEN _____

RIÑÓN DERECHO IZQUIERDO

DIMENSIONES _____

HALLAZGOS CASUALES _____

GLOMERULOS _____

TUBULOS _____

CALICES _____

OTROS _____

ESCALA DAÑO TUBULAR 0 1 2 3 4

0: Normal

1: Desquamation of tubular epithelial cells in small foci (<1% of total tubule population involved)

1: Focal granulovacuolar epithelial cell degeneration and granular debris in tubular lumina with or without desquamation

2: Tubular epithelial necrosis and desquamation are prominent but involve <50% of cortical tubules.

3: >50% proximal tubules are undergoing necrosis and desquamation, but intact tubules are easily identified.

4: 100%-90% proximal tubular necrosis

Anexo 3. Valores absolutos Cr-S, NAG // Escala de daño histopatológico y RIFLE por grupo de experimentación y sujeto.

CREATINA									
	SHAM			CONTROL			ASCORBICO		
CASO	M1	M2	M3	M1	M2	M3	M1	M2	M3
1	0.45	0.55	0.42	0.49	0.47	0.72	0.57	0.39	0.77
2	0.55	0.45	0.46	0.51	0.48	0.73	0.5	0.46	0.62
3	0.58	0.44	0.6	0.46	0.56	0.96	0.48	0.56	0.88
4	0.6	0.41	0.6	0.53	0.36	0.6	0.57	0.53	0.75
5	0.42	0.43	0.42	0.5	0.41	0.53	0.58	0.43	0.65
6	0.6	0.5	0.57	0.52	0.38	0.73	0.44	0.55	0.63
7	0.66	0.42	0.78	0.4	0.36	0.78	0.49	0.69	0.61
8	0.51	0.47	0.51	0.58	0.54	0.7	0.59	0.66	0.67

NAG									
	SHAM			CONTROL			ASCORBICO		
SUJETO	M1	M2	M3	M1	M2	M3	M1	M2	M3
1	0.05	0.25	0.55	0.5	0.8	0.9	0.05	0	0
2	0.15	0.1	0.35	0	0.65	1.75	0	0	0
3	0	0.1	0.3	0.2	0.4	0.95	0	0	0
4	0.05	0	0.15	0.25	0.15	5.15	0	0	0
5	0	0.25	0.5	0.15	0.15	1.3	0	0	0
6	0.4	0	0.05	0.75	0.35	2	0	0	0
7	0.3	0.15	0.2	0.25	0.15	0.9	0.05	0.3	0
8	0	0.1	0.45	0.65	0.25	1.05	0	0	0

HISTOPATOLOGIA			
GRUPO	SHAM	CONTROL	ASCORBICO
SUJETO	M3	M3	M3
1	0	3	2
2	0	3	1
3	0	3	2
4	0	4	2
5	0	3	1
6	0	3	1
7	0	3	2
8	0	3	1

RIFLE (SEGÚN CR-S)			
GRUPO	SHAM	CONTROL	ASCORBICO
SUJETO	M3	M3	M3
1	NORMAL	RISK	NORMAL
2	NORMAL	RISK	NORMAL
3	NORMAL	INJURY	RISK
4	NORMAL	NORMAL	NORMAL
5	NORMAL	NORMAL	NORMAL
6	NORMAL	RISK	NORMAL
7	NORMAL	RISK	NORMAL
8	NORMAL	NORMAL	NORMAL

Anexo 4. Caja metabólica



REFERENCIAS

1. Lopez-Novoa JM, Quiros Y, Vicente L, Morales AI, Lopez-Hernandez FJ. New insights into the mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity: an integrative point of view. *Kidney Int.* 2011 Jan;79(1):33–45.
2. Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM. Aminoglycosides: nephrotoxicity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999 May;43(5):1003–12.
3. L. Rivas-Cabañero, A. Rodríguez-Barbero, N. Eleno y J. M. López-Novoa. Mecanismos básicos de nefrotoxicidad. *NEFROLOGIA.* Vol. XV. Suplemento 1, 1995.
4. Ustundag S, Yalcın O, Sen S, Cukur Z, Ciftci S, Demirkan B. Experimental Myoglobinuric Acute Renal Failure: The Effect of Vitamin C. *Ren Fail.* 2008 Jan;30(7):727–35.
5. Kumar A, Fausto. Robins y Cotran. *Patología Estructural y Funcional.* 7º ed. España: Elsevier; 2005.
6. Guyton H. *Tratado de Fisiología Medica.* 10º ed. Mexico: McGraw-Hill/Interamericana; 2001.
7. Kellum JA, Venkataraman. Defining acute renal failure: The RIFLE criteria. *Journal of Intensive Care Medicine* [Internet]. 2007;22(4). Available from: <http://www.smjr.org/files/nephro/RIFLE.PDF>
8. Kellum JA, Hoste EAJ. Acute kidney injury: epidemiology and assessment. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 2008;241:6–11.
9. Glenn M. Chertow. Acute Kidney Injury, Mortality, Length of Stay, and Costs in Hospitalized Patients. *American Society of Nephrology.* 2005;16:3365–70.
10. Abosaif NY, Tolba YA, Heap M, Russell J, El Nahas AM. The outcome of acute renal failure in the intensive care unit according to RIFLE: model application, sensitivity, and predictability. *Am. J. Kidney Dis.* 2005 Dec;46(6):1038–48.
11. Martin RK. Acute kidney injury: advances in definition, pathophysiology, and diagnosis. *AACN Adv Crit Care.* 2010 Dec;21(4):350–6.
12. Kellum JA, Bellomo R, Ronco C. Definition and classification of acute kidney injury. *Nephron Clin Pract.* 2008;109(4):c182–187.

13. Hoste EAJ, Clermont G, Kersten A, Venkataraman R, Angus DC, De Bacquer D, et al. RIFLE criteria for acute kidney injury are associated with hospital mortality in critically ill patients: a cohort analysis. *Crit Care*. 2006;10(3):R73.
14. Lattanzio MR, Kopyt NP. Acute kidney injury: new concepts in definition, diagnosis, pathophysiology, and treatment. *J Am Osteopath Assoc*. 2009 Jan;109(1):13–9.
15. Kellum JA. Acute kidney injury. *Crit. Care Med*. 2008 Apr;36(4 Suppl):S141–145.
16. Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P. 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;8(4):R204–R212.
17. Rinaldo Bellomo, Claudio Ronco, John A Kellum, Ravindra L Mehta, Paul Palevsky and the ADQI 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. *Critical Care* 2004, 8:R204-R212 (DOI 10.1186/cc2872).
18. Cerdá J, Lameire N, Eggers P, Pannu N, Uchino S, Wang H, et al. Epidemiology of Acute Kidney Injury. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2008 May;3(3):881 –886.
19. Waikar SS, Bonventre JV. Biomarkers for the diagnosis of acute kidney injury. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens*. 2007 Nov;16(6):557–64.
20. Skálová S. The diagnostic role of urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG) activity in the detection of renal tubular impairment. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2005;48(2):75–80.
21. Aminoglycosides - 50 years on [Internet]. [cited 2011 Feb 25]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1365070/pdf/brjclinpharm00008-0014.pdf>
22. Mingeot-Leclercq M-P, Tulkens PM. Aminoglycosides: Nephrotoxicity. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999 May;43(5):1003–12.
23. Barclay ML, Begg EJ, Hickling KG. What is the evidence for once-daily aminoglycoside therapy? *Clin Pharmacokinet*. 1994 Jul;27(1):32–48.
24. Lopez-Novoa JM, Quiros Y, Vicente L, Morales AI, Lopez-Hernandez FJ. New insights into the mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity: an integrative point of view. *Kidney Int*. 2011 Jan;79(1):33–45.

25. Peter G. 10 - Urinary Tract. *Histopathology of Preclinical Toxicity Studies* (Third edition) [Internet]. New York: Academic Press; 2007 [cited 2011 Nov 27]. p. 570–660. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444527714500110>
26. Laurent G, Kishore BK, Tulkens PM. Aminoglycoside-induced renal phospholipidosis and nephrotoxicity. *Biochem. Pharmacol.* 1990 Dec 1;40(11):2383–92.
27. Fillastre JP, Hemet J, Tulkens P, Morin JP, Viotte G, Olier B, et al. Comparative nephrotoxicity of four aminoglycosides: biochemical and ultrastructural modifications of lysosomes. *Adv. Nephrol. Necker Hosp.* 1983;12:253–75.
28. Havasi A, Borkan SC. Apoptosis and acute kidney injury. *Kidney Int.* 2011 Jul;80(1):29–40.
29. Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem. Sci.* 2007 Jan;32(1):37–43.
30. Meyer RD. Risk factors and comparisons of clinical nephrotoxicity of aminoglycosides. *Am. J. Med.* 1986 Jun 30;80(6B):119–25.
31. Abdel-Gayoum AA, Ali BH, Ghawarsha K, Bashir AA. Plasma lipid profile in rats with gentamicin-induced nephrotoxicity. *Hum Exp Toxicol.* 1993 Sep;12(5):371–5.
32. Tulkens PM. Nephrotoxicity of aminoglycoside antibiotics. *Toxicol. Lett.* 1989 Mar;46(1-3):107–23.
33. Brion N, Barge J, Godefroy I, Dromer F, Dubois C, Contrepois A, et al. Gentamicin, netilmicin, dibekacin, and amikacin nephrotoxicity and its relationship to tubular reabsorption in rabbits. *Antimicrob Agents Chemother.* 1984 Feb;25(2):168–72.
34. Deng A, Wead LM, Blantz RC. Temporal adaptation of tubuloglomerular feedback: effects of COX-2. *Kidney Int.* 2004 Dec;66(6):2348–53.
35. Rodriguez-Barbero A, López-Novoa JM, Arévalo M. Involvement of platelet-activating factor in gentamicin nephrotoxicity in rats. *Exp. Nephrol.* 1997 Feb;5(1):47–54.
36. Tulkens PM. Experimental studies on nephrotoxicity of aminoglycosides at low doses. Mechanisms and perspectives. *Am. J. Med.* 1986 Jun 30;80(6B):105–14.
37. RADHAKRISHNA BALIGA, NORISHI UEDA, PATRICK D. WALKER, SUDHIR V. SHAH. OXIDANT MECHANISMS IN TOXIC ACUTE RENAL FAILURE. 1999. Available from: <http://hinari-gw.who.int/whalecominformahealthcare.com/whalecom0/doi/abs/10.1081/DMR-100101947%20>

38. Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2011 Jun;25(3):287–99.
39. Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic. Res.* 1999 Oct;31(4):261–72.
40. Carr AC, Frei B. Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 1999 Jun 1;69(6):1086 –1107.
41. Frei B, Stocker R, England L, Ames BN. Ascorbate: the most effective antioxidant in human blood plasma. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1990;264:155–63.
42. Padayatty SJ, Sun H, Wang Y, Riordan HD, Hewitt SM, Katz A, et al. Vitamin C Pharmacokinetics: Implications for Oral and Intravenous Use. *Annals of Internal Medicine.* 2004 Abril;140(7):533 –537.
43. Frei B, England L, Ames BN. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1989 Aug;86(16):6377–81.
44. Brunton L, Lazo J, Parker K. Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Eleventh Edition. 11th ed. McGraw-Hill Professional; 2005.
45. Hecht SS. Approaches to cancer prevention based on an understanding of N-nitrosamine carcinogenesis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1997 Nov;216(2):181–91.
46. Stojiljkovic N, Stojiljkovic M, Randjelovic P, Veljkovic S, Mihailovic D. Cytoprotective effect of vitamin C against gentamicin-induced acute kidney injury in rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* [Internet]. 2010 Jul 7 [cited 2011 Nov 17]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20619622>
47. Broe de. Renal injury due to environmental toxins, drugs, and contrast agents [Internet]. 1999 [cited 2011 Nov 27]. Available from: <http://ir.anet.ua.ac.be/irua/handle/10067/236880151162165141>
48. Jennette JC, Heptinstall RH. *Heptinstall's pathology of the kidney*. Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
49. CALAM Standards of Veterinary Care.
50. Houghton DC, Plamp CE, DeFehr JM, Bennett WM, Porter G, Gilbert D. Gentamicin and tobramycin nephrotoxicity. A morphologic and functional comparison in the rat. *Am J Pathol.* 1978 Oct;93(1):137–52.

-
51. MOHAMMED EM, GUY L. Apoptosis in Renal Proximal Tubules of Rats Treated with Low Doses of Aminoglycosides. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*. Vol. 44, No. 3(Mar. 2000):p. 665–675.
 52. Selby NM, Shaw S, Woodier N, Fluck RJ, Kolhe NV. Gentamicin-associated acute kidney injury. *QJM*. 2009 Diciembre;102(12):873 –880.
 53. Wiland P, Szechciński J. Proximal tubule damage in patients treated with gentamicin or amikacin. *Pol J Pharmacol*. 2003 Aug;55(4):631–7.