

UNIVERSIDAD DR. JOSÉ MATÍAS DELGADO

RED BIBLIOTECARIA MATÍAS

DERECHOS DE PUBLICACIÓN

Basados en

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

Capítulo VI, Art. 46

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

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



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

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

UNIVERSIDAD

“DR. JOSE MATIAS DELGADO”

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

DR. LUÍS EDMUNDO VÁSQUEZ

ESCUELA DE MEDICINA

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

TITULO

**EFECTO DEL DIMETILSULFÓXIDO (DMSO) SOBRE LA
APOPTOSIS Y DAÑO RENAL EN UN MODELO ANIMAL DE
ISQUEMIA-REPERFUSIÓN**

ALUMNOS:

José Roberto Castaneda Nerio

Ana Marcella Rivas Mejía

Ricardo Salvador Urrutia Rivas

ASESOR:

Dr. William Hoyos

AÑO:

2010

Agradecimientos especiales:

Al Dr. William Hoyos, un agradecimiento especial por su espíritu entusiasta y paternal, apoyándonos incondicionalmente a lo largo de todo el desarrollo del trabajo, participando no solo como asesor, sino como un miembro más del equipo.

Al Dr. José Nicolás Astacio Soria, por demostrar como siempre ser un “*maestro*”, creyendo y apoyándonos terminantemente en nuestra investigación. ¡Maestro gracias nuevamente!

Al Dr. Pablo Salazar, Dra. Zayri García y Dr. López, por apoyarnos con sus conocimientos y tiempo.

A nuestras familias por lidiar con nuestros horarios y todas las incomodidades que surgieron para el desarrollo de nuestra investigación.

HOJA DE APROBACIÓN

ÍNDICE

| | <u>Página</u> |
|--|---------------|
| 1. Planteamiento del Problema. | 1 |
| 2. Justificación. | 2 |
| 3. Marco Teórico. | 4 |
| 3.1. Daño Renal Agudo. | 4 |
| 3.1.1. Parámetros Bioquímicos de la Función Renal. | 8 |
| 3.2. Fenómeno Isquemia-Reperusión. | 9 |
| 3.2.1. Fenómeno Isquemia. | 10 |
| 3.2.2. Fenómeno Reperusión. | 12 |
| 3.3. Muerte Celular. | 14 |
| 3.3.1. Métodos de Cuantificación de Apoptosis. | 19 |
| 3.4. Antioxidantes: El Dimetilsulfóxido (DMSO). | 21 |
| 4. Objetivos. | 28 |
| 5. Metodología. | 29 |
| 5.1. Tipo y Diseño General del Estudio. | 29 |
| 5.1.1. Diseño Experimental. | 29 |
| 5.2. Definiciones Operacionales. | 33 |
| 5.3. Universo, Selección y Tamaño de la Muestra. | 34 |
| 5.4. Criterios de Inclusión y Exclusión. | 35 |
| 5.5. Procedimiento para la Recolección de Información. | 35 |
| 5.6. Procedimientos para Considerar los Aspectos Éticos. | 36 |
| 6. Resultados | 37 |
| 6.1. Creatinina sérica | 37 |
| 6.2. Histopatología | 39 |
| 7. Discusión | 48 |
| 8. Conclusiones | 54 |
| 9. Recomendaciones | 56 |
| 10. Cronograma | 57 |
| 11. Presupuesto. | 58 |
| 12. Referencias. | 60 |

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El daño renal resultante del fenómeno de Isquemia/Reperfusion (I/R) se ha relacionado con la sobreproducción de radicales libres de oxígeno y su influencia sobre el mecanismo de muerte celular programada (apoptosis). Es importante establecer entonces: ¿Tendrá el DMSO algún impacto sobre el daño renal y la muerte celular por apoptosis en unidades experimentales sometidas a I/R de dicho órgano?

2. JUSTIFICACIÓN.

La Falla Renal Aguda (FRA) es una afección común que se desarrolla en aproximadamente 5% de todos los pacientes hospitalizados¹ y hasta en 25% de pacientes en Unidades de Cuidados Intensivos, con un rango amplio y variable de mortalidad del 15% al 60%². Las consecuencias clínicas de los pacientes que sobreviven a FRA conducen a la falla renal crónica del 2% al 10%, llegando a requerir de diálisis o trasplante renal, lo que conlleva altos costos para los sistemas de salud¹.

El fenómeno de I/R es la principal causa de FRA³. La isquemia renal es un fenómeno común que se hace presente en múltiples situaciones médicas y quirúrgicas, como: Trasplantes renales, tratamiento de aneurismas suprarrenales, reconstrucción de arterias renales, arresto cardiaco y choque^{1,3}. En todas estas afecciones hay una caída transitoria del flujo sanguíneo renal.

El restablecimiento del flujo sanguíneo es vital para la supervivencia del tejido isquémico; sin embargo, existe evidencia de que la reperfusión en sí causa un daño celular ulterior que podría ser superior al causado meramente por el período de isquemia³.

El fenómeno de reperfusión es caracterizado por la producción de radicales libres de oxígeno (RLO), activación endotelial, liberación de citoquinas, expresión de moléculas de adhesión y otros fenómenos que conllevan a la activación de los leucocitos circulantes los cuales son responsables de las principales lesiones post reperfusión⁴. Dentro de los anteriores fenómenos la sobreproducción de los RLO está identificada como uno de los desencadenantes de la apoptosis celular, la cual es un mecanismo existente para la eliminación de células indeseables o percibidas como tales sin producir reacción inflamatoria⁵.

La isquemia conduce invariablemente a necrosis; sin embargo, todos los factores que producen necrosis pueden inducir apoptosis, si las células expuestas a la noxa, sobreviven⁵.

Aunado esto, a la formación de RLO por el fenómeno de reperfusión, la apoptosis es una condición que podría llegar a causar un daño tisular mayor sobre aquel causado propiamente por la necrosis isquémica.

Se han propuesto diferentes sustancias para reducir o evitar el daño causado por el fenómeno de I/R mediante la eliminación de los RLO en diferentes órganos. El DMSO es una de ellas y se ha estudiado su efecto específicamente en el riñón, observándose propiedades protectoras posteriores a periodos de isquemia⁶.

En esta investigación se pretende reproducir un modelo de I/R renal en conejos y evaluar el efecto del DMSO sobre la apoptosis y el daño renal, en contraste con el grupo control manejado únicamente con líquidos endovenosos.

3. MARCO TEORICO.

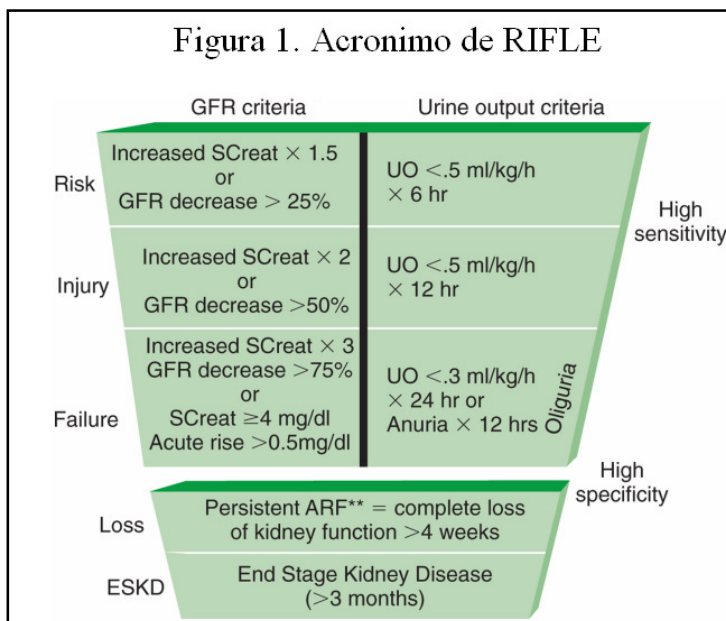
3.1. Daño Renal Agudo.

Falla renal aguda o daño renal agudo (DRA), como es ahora conocido en la literatura, se define por un súbito descenso en la función de la filtración renal^{7,8}. Dicha condición es reflejada precozmente por la disminución de la excreción urinaria y posteriormente por el aumento en la concentración sérica de creatinina y nitrógeno ureico⁷.

El DRA es de importancia crítica en medicina por presentarse aproximadamente en el 1% de todos los pacientes al momento de ser ingresados en un centro hospitalario, desarrollarse en un 2 al 7% de los pacientes ya hospitalizados y hasta de un 30% de los pacientes que se encuentran en unidad de cuidados intensivos⁷. Dicha condición presenta una mortalidad entre 25 a un 90% dependiendo de las condiciones del paciente⁸.

En el pasado han habido más de 35 definiciones de DRA basándose en valores fijos de incremento de creatinina o producción de orina^{7,9,10}. Recientemente en un consenso de la Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI), intensivistas y nefrólogos, publicaron una definición de DRA conocida como RIFLE, por sus siglas en ingles: "Risk", "Injury", "Failure", "Loss" y "End Stage"^{7,8,9,10}.

Imagen tomada de: Clarkson M, Friedewald J, Eustace J, Rabb H. Acute Kidney Injury. En Brenner B, Levine S. Brenner and Rector's: The Kidney. 8 ed. China: Elsevier, 2008. P. 943-75 Mexico: Interamericana; 1994. p.179-184.



RIFLE clasifica el DRA en tres estadios de severidad: Riesgo, Daño y Falla Renal (Figura 1), en base a esto, se categoriza el tratamiento siendo preventivo, curativo o de soporte, respectivamente^{9,10}.

El termino DRA es un concepto revolucionario por ser dinámico al valorar el daño renal, extendiéndose desde la fase de inicio, el mantenimiento, hasta la recuperación del mismo^{7,10}.

Cada fase del daño renal tiene su propia severidad y duración, existiendo así diferentes estadios del funcionamiento del filtrado renal^{7,8}; por lo tanto, el DRA puede presentarse oligúrico o no oligúrico, con o sin necrosis tubular, teniendo súbitos o lentos incrementos en los niveles séricos de los cuerpos nitrogenados⁸.

El DRA puede presentarse en tres escenarios clínicos:

1. Como un proceso adaptativo a una depleción del volumen e hipotensión, sin daño intrínseco renal.
2. En respuesta a un daño renal por citotóxicos, isquemia o proceso inflamatorio, que conlleve a un daño estructural y funcional del riñón.
3. Por una obstrucción del flujo urinario⁸.

Por lo tanto; las causas de DRA se clasifica en: Prerrenal, intrínseca y posrenal.

El DRA prerrenal representa la causa más común de daño renal^{7,8}, ya que suele presentarse comúnmente en varios escenarios clínicos caracterizados por hipovolemia, disminución de la función cardiaca, vasodilatación sistémica o vasoconstricción intrarrenal⁷; como se puede observar en las pérdidas del volumen sanguíneo por infecciones gastrointestinales, quemaduras, hemorragias, entre otros, así como en escenarios de disminución de la perfusión renal en pacientes con insuficiencia cardiaca congestiva y choque⁸.

En un DRA prerrenal la integridad del parénquima renal es mantenido por una serie de mecanismos compensatorios que van desde la activación de las arterias aferentes para relajarse, hasta la liberación de vasodilatadores prostaglandínicos y

óxido nítrico al igual que de angiotensina II por parte parénquima renal⁷, lo que mantiene la presión intraglomerular, y por ende una adecuada filtración glomerular y preservación renal.

Sin embargo, una hipoperfusión renal continua o severa (presión arterial media menor de 70 mm Hg), puede sobrepasar las acciones protectoras de los mecanismos compensatorios y causar rápidamente una Necrosis Tubular Aguda (NTA)⁷. Por lo que el DRA prerrenal y la NTA isquémica, son comúnmente vistas en la fisiopatología de la falla renal aguda, siendo entidades que coexisten frecuentemente en muchos escenarios clínicos⁷.

La NTA isquémica y tóxica son responsables de aproximadamente el 80 al 90 % de los casos de DRA intrínseco. Desde un punto de vista clínico-patológico las principales causas de DRA intrínseca son las enlistadas en la Cuadro 1.

Cuadro N°1. Causas de Daño Renal Agudo⁷.

| 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, púrpura trombocitopénica, coagulación vascular diseminada, síndrome de hiperviscosidad. |
| Afección del intersticio tubular | Isquemia por hipoperfusión. Toxinas exógenas. Antibióticos, antineoplásicos, venenos. Toxinas endógenas. Mioglobulina, mielomas, ácido úrico. Nefritis intersticial alérgica. Infecciones. Infiltrados. Linfomas, leucemias. |

Como se mencionó anteriormente el término patológico de NTA y los términos clínicos FRA o DRA son comúnmente utilizados e intercambiados cuando nos referimos a daño renal isquémico o nefrotóxico⁷. DRA prerrenal y la NTA isquémica son parte de un espectro de manifestaciones del fenómeno de hipoperfusión prerrenal, siendo el DRA observado en casos de hipoperfusión leve a moderada y la NTA isquémica en los casos de exposición prolongada o severa⁷.

Es de resaltar que la NTA se observa con mayor frecuencia en los casos clínicos donde existe una cirugía mayor, traumas e hipotensión severa, quemaduras y sepsis graves. Es una de las complicaciones más prevalentes en las cirugías donde se debe de clampar el flujo sanguíneo aórtico o renal por más de 60 minutos⁷.

Morfológicamente el DRA causado por disminución del flujo sanguíneo y/o isquemia se observa principalmente en la medula externa y corteza del riñón. Dicho daño involucra el *pars recta* del túbulo proximal y el asa ascendente gruesa de la nefrona distal. Estos daños celulares inducen estados de apoptosis, necrosis y otros tipos de disfunción celular⁷. Los cambios que se evidencian por microscopio de luz se presentan en la tabla 2¹¹.

Cuadro N°2¹¹. Cambios microscópicos característicos de la necrosis tubular aguda.

- | | |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Hiperemia medular • Vacuolización citoplasmática • Edema Intracelular • Degeneracion hidrópica esponjosa • Citoplasma epitelial basófilo • Pérdida del borde en sepillo • Ruptura de membrana celular • Adelgazamiento del epitelio • Separación de membrana basal • Tubulorrexis | <ul style="list-style-type: none"> • Células intratubulares • Cilindros Hialinos • Dilatación tubular • Presencia de leucocitos • Núcleos hipercromáticos • Cariorrexis • Cariolisis • Núcleos picnóticos • Prominencia del epitelio parietal de la cápsula de Bowman |
|--|--|
-

Como se mencionó anteriormente a existido una gran discordancia en las definición de DRA, esto se debe en su mayoría a que no existe una uniformidad en qué marcadores de daño renal a utilizar^{10,12}. Sin embargo, la mayoría de estas definiciones incluye el uso de la creatinina sérica y la excreción urinaria como parámetros para determinar el grado de funcionamiento renal¹⁰.

3.1.1. Parámetros Bioquímicos de la Función Renal.

La creatinina, es un compuesto de aminoácido derivado de la conversión no enzimática de la creatina a fosfocreatinina en el músculo esquelético y posteriormente metabolizada en el hígado para formar la creatinina sérica. Se caracteriza por ser un componente liberado constantemente en el plasma, que se filtra pasivamente en el glomérulo y no es reabsorbida o metabolizada por el riñón. Son estas características las que le proporcionan su relevancia para determinar la función renal, por reflejar de una forma indirecta la tasa de filtrado glomerular. El aumento sérico de creatinina es inversamente proporcional al filtrado glomerular y generalmente implica una disminución de la función renal^{7, 10, 12}.

La cuantificación de la excreción urinaria, es una práctica estandarizada para evaluar la función renal en los pacientes en cuidados intensivos. La medición de este parámetro ofrece un dato dinámico y correlativo con la función renal, ofreciendo una mayor sensibilidad en la determinación de la hemodinámica renal que los marcadores bioquímicos^{7, 12, 13}.

La urea sérica, es un producto soluble que proviene del metabolismo de las proteínas. Al igual que la creatinina presenta una tendencia inversamente proporcional al filtrado glomerular; sin embargo, es un marcador no específico de la función renal por presentar muchos factores extra renales que alteran sus niveles séricos, al igual que su producción no es constante como la de la creatinina. Por tanto, es un marcador pobre del filtrado glomerular y no refleja el DRA¹².

La cistatina C, es un inhibidor de la cistatina proteasa endógena. Es sintetizada y liberada al plasma de forma constante por todas las células nucleadas del cuerpo.

Su característica principal para la evaluación del funcionamiento renal, radica en que es catabolizada en más de un 99% en el riñón y filtrada libremente por el glomérulo, sin sufrir reabsorción o excreción renal de ningún tipo. Es por eso que una disminución del filtrado glomerular correlaciona con incrementos séricos de los niveles de cistatina C y viceversa. Se considera que este marcador puede ser más sensible a la detección temprana de daños renales leves y moderados en comparación con la creatinina sérica. Es de resaltar que en el presente aún no ha sido estandarizado su uso para determinar DRA por lo que no es comúnmente realizado. Además, representa un alto costo al igual que otros biomarcadores séricos de nueva generación^{7, 12, 13}.

Tanto la proteinuria como los sedimentos urinarios han sido utilizados para evaluar la función renal; sin embargo, no existen suficientes estudios clínicos que proporcionen su importancia en la detección y pronóstico del DRA^{12, 13}.

3.2. Fenómeno Isquemia-Reperusión.

El daño por I/R es una entidad compleja pero bien definida, aunque su mecanismo aún no está bien dilucidado⁶. Su importancia en la práctica médica, radica en la alta frecuencia de afección de múltiples órganos en diferentes situaciones clínicas, algunos ejemplos son: Síndromes trombo-embólicos, oclusión coronaria, terapias posreperusión, hipoxia neonatal, estados de choque, entre otros; involucrando así, varias disciplinas de la Medicina³.

Existen diferentes teorías y mecanismos por los que se ha tratado de explicar la lesión por I/R de las cuales posiblemente todas estén involucradas en una compleja interacción^{1, 3, 4}. Entre los factores más reconocidos en la lesión por I/R están: El daño tisular por radicales libres, aumento del ion calcio, activación del complemento y plaquetas, activación de citoquinas y liberación de óxido nítrico^{3, 4}.

El conocimiento de los fenómenos de I/R es de gran interés en diversos temas clínicos como trasplantes de órganos, donantes en asistolia, estados de shock, situaciones de parada cardiorrespiratoria reversibles, hipoperfusión de diferentes

órganos, tratamiento de aneurismas, reconstrucción de arterias, entre otras¹; ya que están implícitos en los acontecimientos fisiopatológicos de la revascularización del órgano tras la isquemia fría o caliente¹⁴.

Cada órgano o tejido tiene una sensibilidad y resistencia distinta para la pérdida total o parcial de su flujo sanguíneo, que varía desde pocos minutos en el caso del cerebro a horas en el caso de las extremidades¹³.

Se han descrito diferentes tipos de isquemia: La isquemia caliente, que sucede con la interrupción del flujo sanguíneo y en la que la temperatura del órgano se mantiene al mismo nivel que tiene habitualmente en el organismo, y la isquemia fría que se desarrolla con el órgano fuera del organismo, a una temperatura de 4°C, con la finalidad de enlentecer el metabolismo del órgano al máximo antes de ser implantado¹⁴.

Finalmente, con el desarrollo de los donantes en asistolia transitoria se han creado una serie de técnicas de preservación *in situ* de los órganos para mantenerlos hasta que se pueda hacer la extracción múltiple, donde se mantienen a unos 12-14 °C (isquemia tibia) durante el menor tiempo posible¹⁵.

Durante el proceso de abolición del flujo sanguíneo de un órgano y su posterior restauración, se desarrollan cronológicamente una serie de lesiones, que en función de su reversibilidad o no, van a hacer que un órgano o tejido tenga o no posterior viabilidad funcional¹⁵.

3.2.1. Fenómeno de Isquemia.

La primera fase se caracteriza por la lesión isquémica, en la que se interrumpe el aporte de oxígeno al órgano y el metabolismo celular del mismo se transforma de aerobio en anaerobio. A partir de este hecho, si el flujo sanguíneo no se restablece se produce una secuencia de procesos bioquímicos que llevan a la disfunción celular, al edema intersticial y finalmente a la muerte celular (necrosis). El metabolismo anaerobio existente, junto con el aumento del ácido láctico local, provocan una acidosis metabólica, con disminución del nivel energético que se asocia a alteraciones en el gradiente intermembrana celular que impide el

mantenimiento de la homeostasis celular. Con la disminución del nivel energético y degradación de los metabolitos de alta energía aparece una disfunción del sistema de transporte transmembrana que genera un incremento del Ca^{2+} citosólico. El aumento del Ca^{2+} activa diferentes sistemas enzimáticos proapoptóticos¹⁶. Además, se cambia el flujo de algunos sistemas enzimáticos mediante la activación de la enzima xantina oxidasa y secundariamente a la producción de peróxido de hidrógeno (Figura 2).

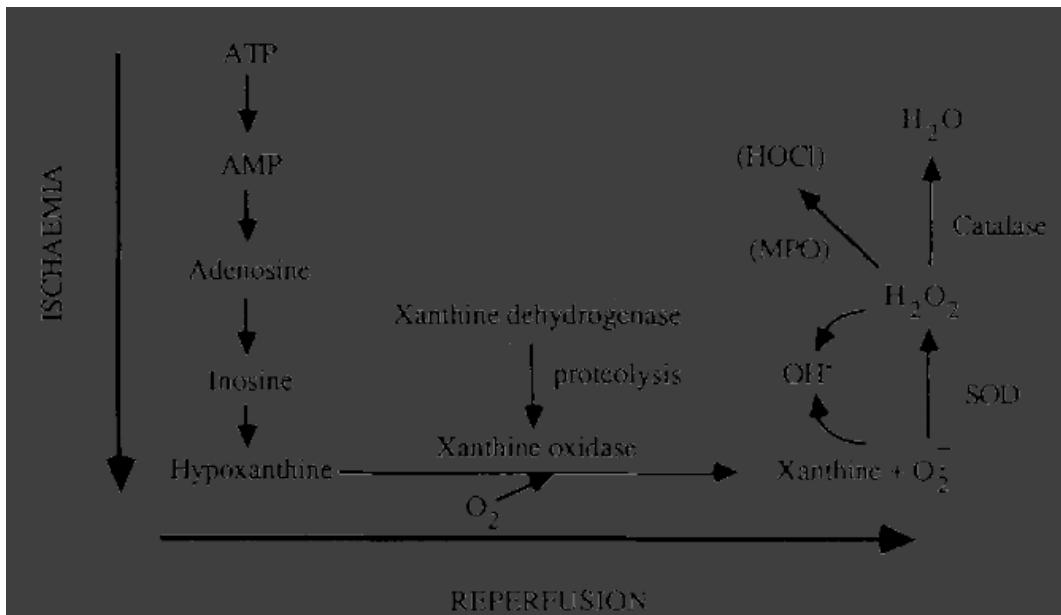


Figura N°2¹⁶. La isquemia conduce a la generación de hipoxantina y xantina oxidasa en las células endoteliales. La reintroducción del O_2 en la reperfusión conduce a la creación del anión superóxido (O_2^-) y de otros metabolitos reactivos del oxígeno, como el H_2O_2 a través de la superóxido dismutasa (SOD). El radical hidroxilo (OH^-) puede producirse a partir de la reacción del superóxido y el H_2O_2 en presencia de iones Fe^{2+} y Cu^{2+} (Reacción de Haber-Weiss) o sólo por el H_2O_2 en presencia de Fe^{2+} (Reacción de Fenton). Luego de la activación de los neutrófilos, la mieloperoxidasa (MPO) neutrofílica genera HOCl .

Imagen tomada de: Welbourn C, Golman G, Paterson I, Valeri C, Shepron D, Hechtman H. Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: Central role of the neutrophil. Br J Surg; Junio 1991, Vol. 7 (6): 651-55. (Consultado en: Febrero 2009). Disponible en la World Wide Web en: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/112199945/abstract>

Se ha demostrado que períodos de tiempo de isquemia mayores de 60 minutos son capaces de provocar alteraciones irreversibles en la estructura renal, y estas lesiones irreversibles empeoran cuando a la isquemia se le asocia un período de reperfusión¹⁵. Se ha observado que durante la restauración de nuevo del flujo sanguíneo se producen la mayoría de las lesiones o, al menos, se ponen de manifiesto aquellas que se habían iniciado durante la isquemia, denominándose por ello lesión por reperfusión¹⁵.

3.2.2. Fenómeno de Reperfusión.

Durante la reperfusión, con el restablecimiento del flujo sanguíneo, se recupera el nivel energético que había disminuido durante el período de isquemia, pasando de un ambiente anaeróbico a uno aeróbico. Se activan otra serie de procesos que conllevan a mayor daño y finalmente a muerte celular, iniciando desde pocos minutos posterior al inicio de la reperfusión (generalmente por apoptosis) continuando hasta días después del insulto inicial (por medio de autofagia y necrosis)¹⁴.

El incremento de la concentración de Ca^{2+} citosólico resultante de la fase de isquemia es un aspecto crucial para la cadena de eventos que ocurren durante la reperfusión. Como se mencionó anteriormente, el Ca^{2+} actúa como segundo mensajero activando diferentes sistemas enzimáticos, tales como fosfolipasas y proteasas que amplifican la respuesta inflamatoria en el tejido. Además, cataliza la conversión de xantina deshidrogenada a xantina oxidasa, que juega un papel vital en la formación de radicales libres de oxígeno (RLO) **Error! Marcador no definido..** La respuesta inflamatoria y los RLO en altas concentraciones, son dos pilares fundamentales y característicos de la fase de reperfusión^{17 18} y explican gran parte del daño que sufre el tejido durante esta fase del fenómeno I/R.

Radicales libres de oxígeno.

El oxígeno, en condiciones normales, es reducido en su gran mayoría por el complejo de citocromo oxidasa en la mitocondria al final de la cadena transportadora de electrones, actúa aceptando los iones hidrógeno, formando uno

de los productos finales, agua: Proceso conocido como respiración; **Error! Marcador no definido..**

Según el número de electrones que se reduzcan en el oxígeno molecular, se producen superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o radical hidroxilo ($OH\cdot$). El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es citotóxico debido a su moderada capacidad oxidativa. El radical hidroxilo es también extremadamente reactivo e inestable, y un potente oxidante. En cuanto al superóxido, es una sustancia químicamente buena reductora y moderadamente oxidativa, que también puede iniciar reacción de radical libre; **Error! Marcador no definido..**

Durante la isquemia hay una conversión de la enzima xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa, dicha conversión favorecida por el ambiente anaeróbico y las altas concentraciones de calcio, propios de la isquemia. Ambas enzimas catalizan reacciones que conllevan a la eliminación de los productos de degradación de las bases nitrogenadas; sin embargo, la xantina oxidasa produce RLO como producto de desecho. Esta reacción, durante la reperfusión se convierte en unas de las fuentes más importantes de radicales libres; ya que, posterior a la isquemia hay un acúmulo de hipoxantina y su degradación durante la reperfusión conlleva a la generación de radicales libres en presencia de oxígeno⁷.

Se han descrito otras fuentes de RLO durante la fase de isquemia: la oxidación de NADPH de los neutrófilos, la oxidación de las catecolaminas, la síntesis de las prostaglandinas y la lipoperoxidación; **Error! Marcador no definido..**

Los RLO a altas concentraciones causan daño oxidativo sobre lípidos, proteínas y los ácidos nucleicos¹⁴. La lipoperoxidación de las membranas celulares conlleva a una liberación de sustancias del citosol, expandiendo aun más la respuesta inflamatoria local. Los RLO actúan también induciendo la vía intrínseca de la apoptosis y; además, actúan como barredores de óxido nítrico, el cual se eleva durante la fase de isquemia atribuyéndosele funciones protectoras durante la fase de reperfusión¹⁹.

La respuesta inflamatoria en la fase de reperfusión.

La respuesta inflamatoria ya iniciada durante el período de isquemia se expande aun más durante la reperfusión. Los mismos RLO contribuyen a dicha expansión como se mencionó anteriormente, por medio de la lipoperoxidación, además activando la fosfolipasa produciendo un aumento de leucotrienos, tromboxanos y prostaglandinas²⁰.

Por otro lado, otros factores contribuyen a la expansión de dicha respuesta: activación de la superficie endotelial, a través de la interleucina-1 y el factor de necrosis tumoral, la activación y quimiotaxis de neutrófilos **Error! Marcador no definido..**

3.3. Muerte celular.

Por lo regular, la muerte celular puede ocurrir por dos vías: Apoptosis o necrosis. Algunas clasificaciones incluyen además la autofagia, proceso en el cual la célula genera energía y metabolitos por medio de la digestión de sus propios organelos en caso de privación de nutrientes. Generalmente, si este período es muy prolongado, la célula muere²⁰. La apoptosis es un mecanismo para la eliminación de células indeseables, o percibidas como tal, sin producir reacción inflamatoria. Representa una forma de suicidio celular, resultando de la activación de un sistema intracelular de autodestrucción inducido por una variedad de estímulos y mensajes externos o por escasez de factores que soporten la vida celular⁵.

La apoptosis resulta de la activación de una vía extrínseca y/o una vía intrínseca.

La vía extrínseca (Figura 3) está mediada por receptores que se distribuyen en la pared celular, los cuales son activados por factores de inflamación como citocinas y el factor de necrosis tumoral. Al unirse a dichos receptores, se activan las procaspasas 3, 6 y 7²⁰.

La vía intrínseca (Figura 4) está mediada por receptores en la pared mitocondrial, los cuales regulan la transcripción de proteínas Bcl que pueden ser anti o pro-apoptóticas (Figura 5) que funcionan alterando la permeabilidad de la membrana mitocondrial. Factores relacionados con estrés celular como ADN dañado, hipoxia,

RLO (los cuales además se producen dentro de la mitocondria), entre otros, aumentan la expresión de proteínas proapoptóticas, resultando en un aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial, que conlleva a un escape de citocromo C, el cual inicia una serie de reacciones que culmina en la activación de las caspasas 3, 6, 7 y 9²¹.

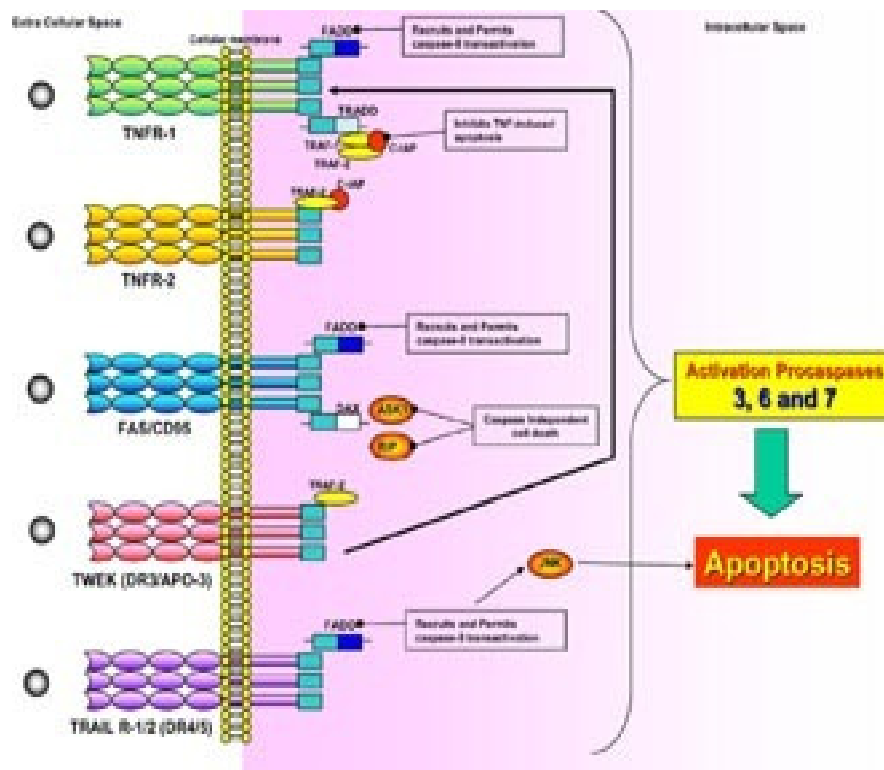


Figura N°320. Activación de la vía extrínseca: Mediada por receptores que se distribuyen en la pared celular, los cuales son activados por factores de inflamación como citocinas y el factor de necrosis tumoral. Al unirse a dichos receptores, se activan las procaspasas 3, 6 y 7.

Imagen tomada de: Lopez-Neblina F, Toledo AH, Toledo-Pereyra LH. Trauma, Surgery Research, and Molecular Biology, Borgess Research Institute, Kalamazoo, Michigan 49048, USA. J Invest Surg. 2005 Nov-Dec;18(6):335-50. (Consultado en: Febrero 2009). Disponible en la World Wide Web en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16319055>

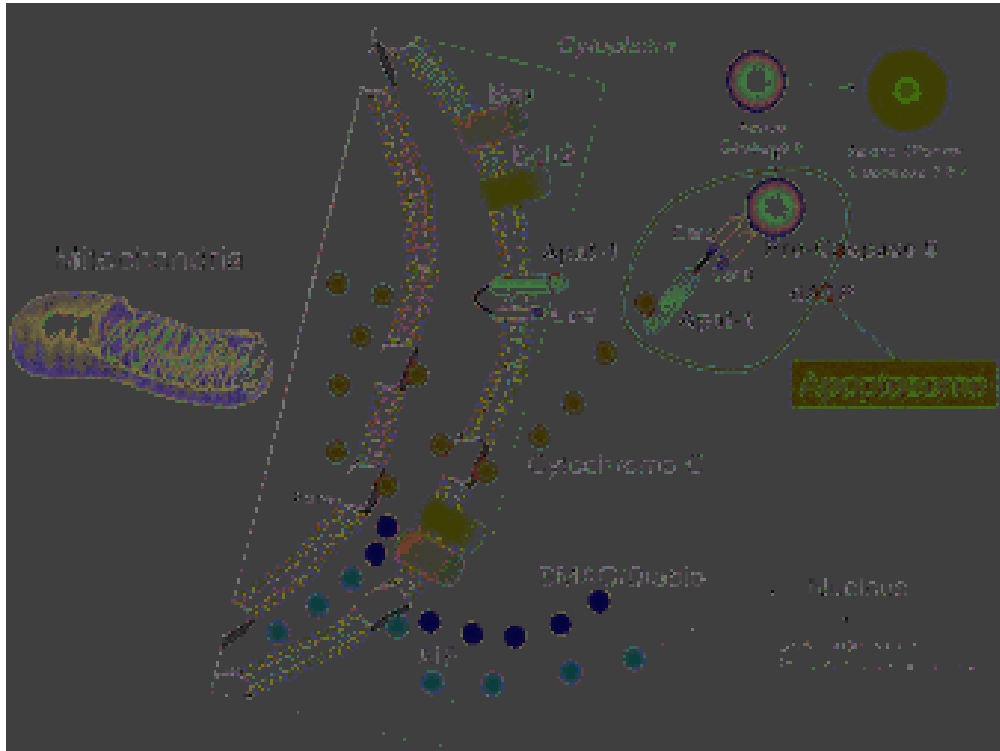


Figura N°4²⁰. Activación de la vía intrínseca: Mediada por receptores en la pared mitocondrial, los cuales regulan la transcripción de proteínas Bcl que pueden ser anti o proapoptóticas.

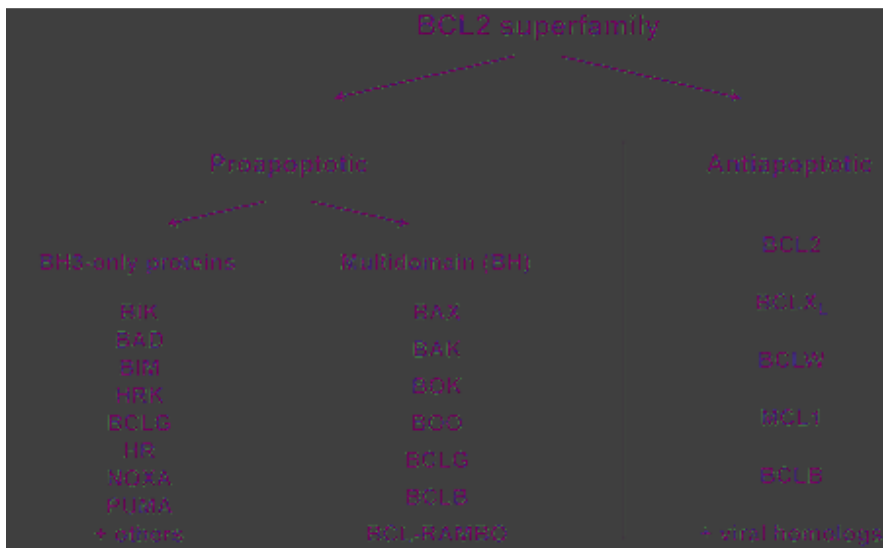


Figura N°5²⁰. Las proteínas Bcl que pueden ser anti o proapoptóticas que funcionan alterando la permeabilidad de la membrana mitocondrial.

Imágenes tomadas de: Lopez-Neblina F, Toledo AH, Toledo-Pereyra LH. Trauma, Surgery Research, and Molecular Biology, Borgess Research Institute, Kalamazoo, Michigan 49048, USA. J Invest Surg. 2005 Nov-Dec;18(6):335-50. (Consultado en: Febrero 2009). Disponible en la World Wide Web en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16319055>

Después de la activación de dichas vías, hay un aumento de concentración del ión calcio intracelular (sumado al aumento del mismo inducido por el estado pro-inflamatorio propio de la isquemia descrito antes), el cual activa enzimas calcio dependientes: Endonucleasas que fraccionan el ADN, transglutaminasas que entrelazan las proteínas citosólicas y proteasas que degradan el citoesqueleto. El calcio, a su vez, es secuestrado dentro de la mitocondria, causando disfunción de la misma⁵.

Al final de la apoptosis se detecta una depleción del glutatión no oxidado, producción de radicales reactivos de oxígeno, fragmentación del ADN y exposición aberrante de residuos de fosfatidilserina en la superficie celular. De hecho, estos residuos son la base de la detección temprana de la apoptosis, valiéndose de la afinidad de la anexina por los radicales de fosfatidilserina; la condensación de la cromatina es un fenómeno más tardío⁵.

El destino de las células que resiste la isquemia será uno de tres: Puede sobrevivir y recuperarse si los niveles de ión calcio intracelular vuelven a la normalidad posterior a la isquemia. Puede morir por apoptosis en caso de disponibilidad de energía y de los sustratos necesarios para síntesis de proteínas o puede morir por necrosis en caso de ausencia de energía, ya que es una forma pasiva de muerte donde la célula pierde actividad metabólica¹⁴.

Generalmente la muerte celular por apoptosis no se asocia a reacción inflamatoria, la necrosis en cambio, sí. La diferente apariencia morfológica nos permite distinguir las células muertas por los diferentes mecanismos (Cuadro 3 y figura 6); sin embargo, existen científicos que discuten que la necrosis es la manifestación morfológica final de la muerte celular por cualquier mecanismo²².

Cuadro N°3. Características de células muertas por diferentes mecanismos¹⁴.

| Característica celular | Célula muerta por necrosis | Célula muerta por apoptosis |
|------------------------|--|--|
| Nivel de afección | Afecta áreas de tejido. | Afecta células individuales dentro de un tejido. |
| Morfología celular | Edema celular y vacuolización previo a la desintegración celular. | La célula se vuelve más pequeña y redondas. |
| Afección mitocondrial | Mitocondria destruida. | Mitocondria intacta. |
| Cromatina | Floculación de la cromatina nuclear que mantiene su apariencia normal. | Cromatina se condensa en agregados con forma de media luna adosada a la periferia del núcleo. |
| Otras características | Síntesis proteica disminuida. | Fragmentación del núcleo y citoplasma con formación de cuerpos apoptóticos unidos a la membrana. |

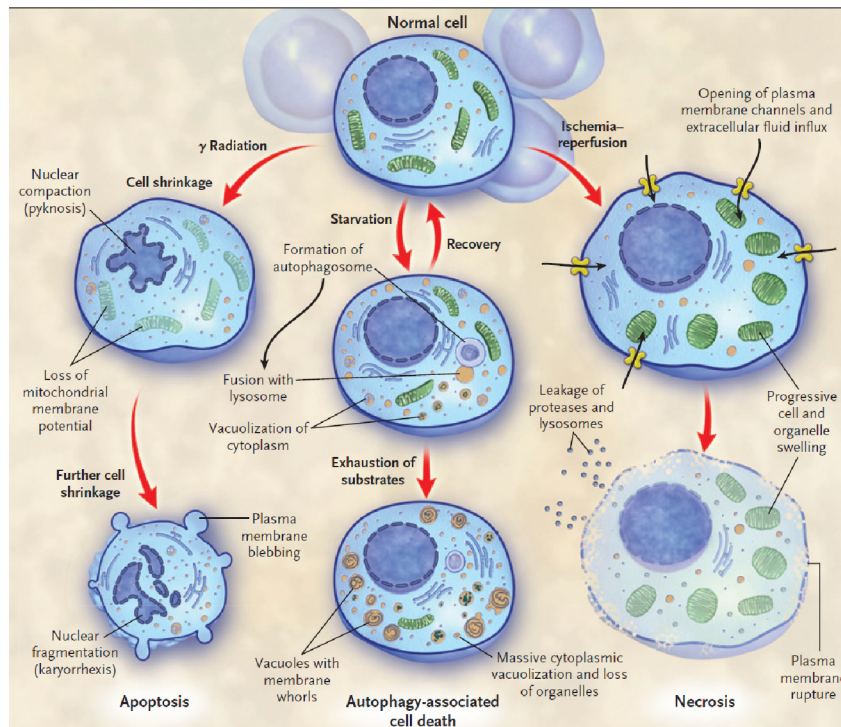


Figura N° 620 (Tomada de: Hotchkiss R MD; Strasser A PhD; McDunn J PhD; Swanson P MD. Mechanisms of Disease: Cell Death. NEJM, 1009 Octubre; 361 (16): 1570-83). Caracterización de la célula muerta por las diferentes vías. Las células que mueren por apoptosis se

caracterizan por ser pequeñas y poseer núcleos picnóticos y fragmentados. Además poseen cuerpos apoptóticos en su superficie. La célula necrótica se observa edematizada, con vacuolas en su interior. Presenta ruptura progresiva de la membrana celular y salida consecuyente de proteasas y lisosomas.

3.3.1 Métodos de Cuantificación de Apoptosis.

La apoptosis tiene 4 fases: La fase de inducción donde se integran las señales de muerte o supervivencia celular, cuando predominan las primeras, se activan sistemas celulares que inician la apoptosis. En la fase efectora, la célula queda programada para morir, se considera como el punto de no retorno, siendo el factor determinante la permeabilidad de la membrana mitocondrial. Durante la fase de degradación, se activan sistemas enzimáticos responsables de las características bioquímicas y estructurales de la apoptosis, entre estos, las caspasas que rompen proteínas, degradan ADN, exponen la fosfatidilserina y determinan los cambios morfológicos celulares característicos de la apoptosis. Finalmente durante la fase fagocítica, los fragmentos celulares generados son eliminados²¹.

Se han realizado estudios en células cardíacas con el objetivo de determinar el tiempo necesario para que ocurran las diferentes fases de la apoptosis posterior a la exposición a RLO. Los resultados mostraron que el daño a la mitocondria es el primer cambio detectable de las lesiones por estrés oxidativo, ocurre dos horas posteriores a la exposición de la célula al peróxido. Las caspasas se detectan alrededor de dos horas después, manteniéndose las concentraciones constantes desde entonces. A lo largo del tiempo, disminuyen los niveles de Bcl-2 mientras que los niveles de Bax siguen aumentando hasta nueve horas posterior a la exposición²³. Se estima que la duración del proceso es de 12-24 horas aunque en cultivos celulares, los cambios se observan desde 2 horas posteriores al insulto²⁴.

Se estima que alrededor de 1-2 horas posterior a la muerte de la célula por apoptosis, estas son fagocitadas⁵, por lo que ya no podrán ser detectadas en las muestras de tejidos.

En base a lo que se conoce acerca de los eventos que ocurren durante la apoptosis, el tiempo que dura cada fase y los cambios morfológicos que resultan de cada una

de ellas, se han desarrollado diferentes métodos para la valoración y cuantificación de apoptosis.

Estos métodos incluyen la observación de alteraciones morfológicas típicas, la determinación de un patrón en escalera en el análisis electroforético del ADN y tinciones que permiten identificar la fragmentación del ADN o la extrusión de la fosfatidilserina a la superficie externa de la célula⁵.

Se ha establecido la caracterización morfológica de dichas células apoptóticas como la técnica *Gold Standard* para detectar dichas células, es posible identificar estas células basándose en características propias de la célula muerta por apoptosis que fueron descritos anteriormente. Este método es muy económico en comparación con los que se mencionarán más adelante, sin embargo; no es reproducible y debe de ser realizado por un patólogo con experiencia. Por lo tanto; es poco práctico para detectar cambios leves en grandes poblaciones²⁵.

La fragmentación del ADN característica de la célula que muere por apoptosis también está bien establecida, de modo que la electroforesis constituye un método útil para la identificación de dichas células. La electroforesis del ADN en gel de agarosa permite detectar el patrón en «escalera» que resulta de la degradación del ADN genómico por endonucleasas en fragmentos de uno o múltiples nucleosomas (180 a 220 pares de bases)⁵.

La fragmentación del ADN a nivel unicelular puede determinarse con técnicas que permiten el marcaje enzimático del terminal fragmentado del ADN y actúa sobre ADN de una sola hebra. TUNEL de sus siglas en inglés (Terminal Deoxynucleotide Transferase dUTP Nick End Labeling) emplea la deoxinucleotidil transferasa terminal para permitir el marcaje de rupturas en ADN de doble hebra⁵.

A pesar de que TUNEL es ampliamente utilizado para la detección de apoptosis, dicha técnica presenta falsos positivos y negativos debido a que sus resultados dependen en gran medida de la tinción y fijación y del grado de proteólisis. La síntesis de RNA y el daño del ADN característico de la célula en necrosis puede causar que células en apoptosis se tiñan. Para obtener resultados adecuados, se debe de estandarizar la prueba utilizando tejidos manejados con ADNasa (control

positivo de apoptosis), además se deben incluir suficientes campos microscópicos al momento de cuantificar la apoptosis. Combinar TUNEL con otra técnica como la identificación morfológica de la célula en apoptosis hace más confiable los resultados²⁴. Sin embargo; su alto costo combinado su baja especificidad y sensibilidad vuelven este método desaniman al uso de este método.

Otras técnicas de detección de apoptosis se mencionan en el Cuadro 5 que se muestra a continuación:

Cuadro N°4⁵. Técnicas para la detección de apoptosis.

| Técnica | Descripción |
|----------------------------------|---|
| Micrsocopía óptica y electrónica | Cambios morfológicos. |
| Electroforesis de ADN | Patrón en escalera de ADN degradado en uno o multiples nucleosomas. |
| TUNEL | Adición enzimática de nucleotides marcados en fragmentos de ADN de una doble banda. |
| ISNT | Adición enzimática (ADN polimerasa) de nucleotides marcados en fragmentos de ADN de una sola hebra. |
| Tinción con yoduro de propidio | Entra en células con aumento de la permeabilidadde la membrana. |
| Tinción con Hoescht 33342 | Entra en todas las células y tine el núcleo permitiendo observar una condensación cromática. |
| Tinción con anexina V-FITC | Detecta fosfatidil serina en la superficie celular para la cual tiene gran afinidad la anexina. |

3.4. Antioxidantes: El Dimetilsufóxido (DMSO).

Los antioxidantes son agentes endógenos o exógenos que pueden prevenir la acción de los radicales libres derivados del oxígeno y, por tanto, disminuir la lesión mediada por estos. Los antioxidantes pueden actuar eliminando directamente los

radicales libres, en cuyo caso se les denomina barredores, o bien bloqueando la generación de éstos o sus efectos deletéreos^{26, 27, 28}.

Existen diferentes clasificaciones de los antioxidantes en la bibliografía. A continuación se describe la que utiliza como criterio de clasificación el modo de acción. Los fármacos con capacidad antioxidante se pueden dividir en cinco grupos fundamentales: Barredores de los radicales libres, inhibidores de la producción de radicales libres, inhibidores de los neutrófilos, inhibidores de la peroxidación y los condicionantes de la situación oxidativa y energética preisquémica^{27, 28}.

Existen otros antioxidantes que poseen múltiples propiedades protectoras y que actúan en diferentes niveles de la cascada fisiopatológica del daño por isquemia-reperusión, entre estos se encuentra el Dimetilsulfóxido (DMSO)²⁹.

El Dimetilsulfóxido (C_2H_6OS), o DMSO, es un compuesto orgánico constituido por una molécula anfipática con un dominio altamente polar y dos grupos apolares haciéndolo; de esta manera, soluble en medios orgánicos y acuosos³⁰.

El DMSO se presenta de forma natural en vegetales, frutas, granos y productos animales. Se sintetizó por primera vez en 1866 como un sub-producto de la manufactura del papel y el interés terapéutico en el producto empezó en 1963. Se reportó que el DMSO penetra a través de la piel y produce analgesia, disminuye la inflamación y promueve la cicatrización del tejido. El DMSO está disponible tanto para uso medicinal como no medicinal³¹.

Dentro de los aspectos farmacocinéticos del DMSO se puede mencionar que posee una vida media en humanos de 12 a 15 horas y es metabolizado por oxidación a Dimetilsulfona ($DMSO_2$), o por la reducción a Dimetilsulfuro (DMS)³².

El DMSO y $DMSO_2$ son excretados en la orina y heces. El DMS es eliminado por las vías aéreas y la piel. La excreción en humanos cuando el DMSO se administra por vía oral se completa en 120 horas, por vía urinaria como método de eliminación primario³².

El metabolito $DMSO_2$ puede persistir en los humanos hasta por 2 semanas. Se ha demostrado que la tasa de depuración renal es similar en la administración crónica

como en las administraciones individuales sin importar la concentración o dosis. No se ha demostrado acumulación residual del DMSO en humanos o animales por periodos prolongados de administración sin importar la ruta o dosis administrada³².

En 1978 fue aprobado por la United States Food and Drug Administration (FDA) para ser utilizado en el tratamiento de la cistitis intersticial, a través de su instilación intravesical³⁰.

Existe documentado una gran cantidad de acciones farmacológicas primarias sobre el Dimetilsulfóxido (DMSO) en estudios de laboratorio: Transporte de membrana, efectos sobre el tejido conectivo, antiinflamatorios, bloqueo nervioso (analgesia), bacteriostasis, diuresis, aumento o reducción de la efectividad de otros fármacos, inhibición de la colinesterasa, aumento no específico de la resistencia a infecciones, vasodilatación, relajación muscular, antagonismo de la agregación plaquetaria, e influencia sobre el colesterol sérico en hipercolesterolemia experimental. Esta sustancia induce la diferenciación y función de células leucémicas y malignas. El DMSO incluso posee propiedades radioprotectoras y acciones crioprotectoras. Protege contra el daño por isquemia²⁹.

Se ha utilizado con éxito en el tratamiento de la amiloidosis dermatológica, urinaria, pulmonar, reumática y renal. Se ha comprobado que cruza la barrera hematoencefálica y es efectivo en el edema cerebral postraumático. También se ha utilizado para el tratamiento de desórdenes musculoesqueléticos, adenocarcinoma pulmonar, enfermedades reumatológicas, prostatitis crónica, enfermedades dermatológicas, esquizofrenia, y como analgésico tópico. Además, se ha sugerido como tratamiento para la enfermedad de Alzheimer³⁰.

En múltiples estudios se demuestra el efecto protector de DMSO frente al daño por I/R en diferentes órganos: Riñón^{33,34}, mucosa intestinal³⁵, retina³⁶, hígado³⁷, cerebro³⁸, piel³⁹, músculo⁴⁰, corazón⁴¹, médula espinal⁴², entre otros.

Se han propuesto diferentes mecanismos por los cuales el DMSO crea un efecto protector frente al daño por I/R. Las respuestas bioquímicas y vasculares ante el daño aparentan tener una relación de causa y efecto, la cual puede integrarse en

términos de sustancias que pueden incrementar o disminuir el flujo sanguíneo. El efecto de dichas sustancias puede ser físico (reducción o aumento de la obstrucción del lumen del vaso sanguíneo) o químico (reducción o aumento de la diámetro del vaso sanguíneo: Vasoconstricción/vasodilatación)²⁹.

Las plaquetas, por ejemplo, pueden inducir ambas condiciones al producirse la agregación plaquetaria (obstrucción del lumen) y al liberar sustancias vasoactivas locales (vasoconstricción/vasodilatación). El DMSO puede antagonizar una variedad de estas sustancias vasoactivas liberadas por las plaquetas, las cuales consecuentemente pueden inducir vasoconstricción u obstrucción del lumen del vaso sanguíneo. Se cree que puede actuar a través del aumento de los niveles de cAMP (un fuerte desagregante plaquetario)²⁹ y además de la inhibición de la liberación de calcio a partir de las células isquémicas y de las plaquetas, antagonizando la acción de este ion sobre el músculo de la pared arteriolar (vasoespasmos)²⁹. Liberación plaquetaria inducida por el colágeno, también puede ser bloqueada por el DMSO circulante³⁰.

Se ha descrito también, que los neutrófilos juegan un papel importante en la lesión por I/R. La evidencia sugiere que los neutrófilos que entran en el tejido que ha sido reperfundido se vuelven activos y aumentan la síntesis de metabolitos del oxígeno (Ácido hipocloroso HOCl⁻ y el Peróxido de Hidrógeno H₂O₂) y enzimas proteolíticas; además, se vuelven más adhesivos al endotelio¹⁶.

Lo anterior puede ocasionar una exacerbación de la lesión anóxica al ocluirse el lumen del vaso sanguíneo y al secretar enzimas proteolíticas como la elastasa, la cual es liberada por los neutrófilos activados y; que junto con los productos oxidativos generados por estos como el HOCl⁻ y el H₂O₂, resultaría en lisis de las proteínas esenciales de la matriz estructural celular como la elastina, conduciendo a un aumento en la permeabilidad de la microvasculatura¹⁶.

Existen estudios en los que se ha reportado que el DMSO puede aumentar la síntesis de Prostaglandina E-1 (PGE-1), un vasodilatador moderado²⁶. La PGE-1 puede reducir la agregación plaquetaria al producir un aumento de los niveles de

cAMP y al inhibir la liberación de calcio inducida por la noradrenalina en las terminales nerviosas, un efecto que puede antagonizar la vasoconstricción²⁹.

También se ha reportado que el DMSO puede bloquear los receptores de PFG-2 y reducir la síntesis de PFE-2. Ambos compuestos causan agregación plaquetaria y se sabe que la PFG-2 induce vasoconstricción⁴³. El efecto del DMSO sobre la síntesis de tromboxanos es desconocida, pero se cree que puede inhibir la biosíntesis del Tromboxano A-2, lo cual aumenta específicamente los niveles de cAMP²⁹.

La habilidad del DMSO para proteger la integridad de la membrana celular se encuentra bien documentada a través de varios modelos de daño por isquemia/reperfusión. En este caso, el efecto del DMSO puede deberse a dos mecanismos: Reducción de la adhesión plaquetaria por el colágeno y reducción de la adhesión plaquetaria al proteger el endotelio vascular y asegurar la liberación de PGI-2²⁹.

También se ha demostrado que el uso de antioxidantes o barredores antes de la reperfusión, previene la acumulación de neutrófilos en el tejido reperfundido con la consecuente protección de la elastina celular¹⁶.

Los RLO juegan un rol importante en la patogénesis de la isquemia, los cuales pueden elaborarse de la peroxidación de las uniones lipídicas de la membrana celular, en donde el transporte de oxígeno no se encuentra totalmente abolido, como en la isquemia o la hipoxia; cuando el oxígeno es resuplido luego de un episodio isquémico¹⁴ y cuando los neutrófilos activados inducen la producción de estos¹⁶.

Uno de los sitios más significativos donde se pueden formar los RLO es en la mitocondria. Se conoce que el DMSO es un efectivo barredor de RLO. Puesto que se ha comprobado que el DMSO puede mejorar la fosforilación oxidativa de la mitocondria, se ha sugerido que el DMSO actúa neutralizando los efectos citotóxicos de los RLO sobre las mitocondrias mismas. La fosforilación oxidativa es una de las actividades bioquímicas primarias que se ve afectada negativamente en el daño isquémico. También se ha reportado que el DMSO reduce la actividad de la

ATPasa en las partículas submitocondriales, un efecto que puede reducir la utilización de oxígeno durante la isquemia celular²⁹.

Parece probable que el efecto neutralizante del DMSO sobre el daño causado por los RLO luego de un daño puede disminuir el resultado negativo de la isquemia. Sin embargo, la formación de los RLO es dependiente del tiempo y de la disponibilidad de oxígeno, pero el desarrollo de la isquemia es inmediato y su reversibilidad puede depender más de subsistemas prevalentes como el de los prostaglandínicos y las interacciones plaquetarias²⁹.

Otro efecto importante del DMSO frente a la protección en el daño por I/R, es su acción sobre el ion calcio intracelular²⁹, el cual se aumenta dramáticamente luego de la liberación de los RLO. Como se mencionó anteriormente, el aumento del calcio intracelular es crucial en la activación de la fosforilasa de membrana A₂ plasmática con la subsecuente generación de productos del ácido araquidónico¹⁶. Existen investigaciones que muestran una acción no específica del DMSO en la inhibición del daño celular por aumento intracelular de dicho ion³⁰.

Aunado a los efectos del DMSO descritos anteriormente frente al daño por I/R, a continuación se resumen sus efectos antiinflamatorios (Cuadro 5):

Cuadro N°5. Breve resumen de los efectos del DMSO reportados en estudios de procesos inflamatorios, observados en modelos experimentales³⁰.

-
- Inhibe la producción de la interleucina-8 de manera dosis-dependiente, directamente a nivel transcripcional. Previene la adhesión de neutrófilos al endotelio. Barre el ClO⁻ y posiblemente reduce la actividad de la NADPH-Oxidasa.
 - Inhibe la agregación plaquetaria inducida por el ADP, ácido araquidónico, factor activador de plaquetas y el colágeno, de manera concentración-dependiente, siendo un mejor inhibidor de agregación inducida por el ADP y el colágeno, más que por el factor de activación plaquetaria o el ácido araquidónico.
 - Estimula la producción de prostaglandina E-2 y ácido hidroxieicosatetraenoico a través de la prostaglandina sintasa de vesículas seminales bovinas, e inhibe la producción del ácido trihidroxieicosatetraenoico mediante la vía de la lipooxigenasa.
 - Inhibe la activación del factor nuclear kB inducido por sepsis, resultando en la supresión intracelular de la expresión del gen para la molécula de adhesión 1 en el hígado de ratas con peritonitis séptica.
 - Potencia la citotoxicidad del factor de necrosis tumoral alfa en varias líneas celulares mieloides humanas.
 - Inhibe la formil-metionil-leucil-fenilalanina y el leucotrieno B4 inducido de adherencia leucocitaria en forma dosis-relacionada en el endotelio venoso de colon de rata.
-

A pesar de todas las aplicaciones farmacológicas descritas previamente para el tratamiento de diferentes patologías, se han reportado varios efectos adversos sistémicos dependientes del uso del DMSO, tales como: Náuseas, vómito, diarrea, hemólisis severa mimetizando una reacción hemolítica transfusional; reacciones anafilácticas manifestadas como rash, eritema y ocasionalmente broncoespasmo; falla renal, hipertensión diastólica y sistólica, bradicardia, bloqueo cardiaco, y raramente edema pulmonar o arresto cardiaco³⁰.

Un efecto secundario significativo del DMSO es el aliento y sabor a ajo en la boca debido a la excreción pulmonar de una mínima cantidad de DMSO como Dimetilsulfuro³⁰.

Su aplicación tópica, aunque es bien tolerada, puede causar quemaduras locales transitorias leves, rash y prurito. Se ha reportado un caso de sulfhemoglobinemia luego de la aplicación dérmica de DMSO en el tratamiento de la cistitis intersticial; con fatiga, cianosis y disnea a esfuerzos moderados. También se ha descrito hiperosmolaridad sérica en el control del aumento de la presión intracraneana con DMSO intravenoso³⁰.

Los primeros estudios de DMSO contemplados por la FDA en años anteriores fueron interrumpidos en 1965 debido a reportes de alteraciones en el cristalino de perros, conejos y cerdos. Estas alteraciones estaban relacionadas con cambios en la refracción de los mismos y no con opacidades. En estos animales se encontraron áreas con diferente refracción. Las unidades experimentales en las cuales se presentaron estos cambios recibieron dosis de 5 g/kg/día⁴³.

4. OBJETIVOS.

Objetivo General

Evaluar el efecto del DMSO sobre la apoptosis y daño renal en un modelo animal de I/R.

Objetivos Específicos

- Comparar el grado de daño renal entre unidades experimentales expuestas a I/R mediante análisis de las muestras histopatológicas.
- Determinar el grado de apoptosis en las muestras histopatológicas renales de unidades experimentales expuestas a I/R.
- Comparar el grado de daño renal entre unidades experimentales expuestas a I/R mediante pruebas bioquímicas.

5. METOLOGÍA.

5.1. Tipo y Diseño General del Estudio.

Investigación Básica, estudio experimental controlado en el cual se evaluó el efecto del DMSO en un modelo experimental animal de injuria por I/R renal.

5.1.1. Diseño Experimental.

Se utilizaron conejos machos, raza Nueva Zelanda, con peso entre 2.5kg \pm 0.5 kg obtenidos de criaderos de conejos nacionales. El bienestar animal se realizó bajo los lineamientos del Consejo Canadiense para el cuidado animal dictaminado en el año 2007⁴⁴. Cada animal permaneció en jaulas aisladas administrándosele agua *ad libitum* y alimentación especial (concentrado de conejo)⁴⁵.

La muestra estuvo conformada por tres grupos: Grupo sham, Grupo Isquemia-Reperusión-Solución Salina Normal y Grupo Isquemia-Reperusión-DMSO, los cuales se asignaron aleatoriamente a las unidades experimentales.

Los grupos fueron manejados de la siguiente manera:

- Grupo Sham. Sobre los cual se realizó todo el procedimiento quirúrgico sin ejecutar el período de isquemia ni la administración de DMSO, únicamente líquidos endovenosos.
- Grupo Isquemia-Reperusión-SSN (I/R-SSN). Sobre los cual se realizó todo el procedimiento quirúrgico e isquemia renal por 30 minutos, luego fueron reperfundido por ocho horas, únicamente con líquidos endovenosos.
- Grupo Isquemia-Reperusión-DMSO (I/R-DMSO). Sobre los cual se realizó todo el procedimiento quirúrgico e isquemia renal por 30 minutos, luego fueron reperfundido por ocho horas con líquidos endovenosos y manejados con DMSO.

El efecto del evento I/R fue medido tanto en los sujetos del Grupo I/R-SSN como en los del Grupo I/R-DMSO, a través de la cuantificación de creatinina sérica y análisis de muestras histopatológicas renales analizadas con el método tradicional de hematoxilina-eosina.

Preparación Prequirúrgica.

Cada animal fue evaluado para corroborar su estado general posterior a esto fue pesado y preparado para el procedimiento (rasurado del área quirúrgica).

Preparación del área quirúrgica.

Una vez comprobado el estado anestésico de la unidad experimental se realizó asepsia del campo quirúrgico mediante la aplicación de Digluconato de Clorhexidina al 20%, seguido de la aplicación subcutánea de Lidocaína al 2% en las áreas donde se realizo la incisión quirúrgica. Se colocaron campos quirúrgicos estériles sobre el área de trabajo.

Premedicación y anestesia.

Se pre medicaron mediante la inyección IM de Maleato de Acepromacina (20mg/ml) a una dosis de 0.2 mg/kg y Ketamina (10mg/ml) a una dosis de 30 mg/kg; respectivamente, como dosis inicial. La dosis de mantenimiento fue continuada con la mitad de la dosis de la combinación anterior por aplicación IV cada 15-30 minutos según necesidad, en base a parámetros de evaluación del plano anestésico, específicos para la especie: El tono mandibular y el reflejo de retirada en la extremidad anterior y posterior frente a estímulos dolorosos⁴⁶.

Acceso venoso.

Se disecó por planos en el área submandibular derecha hasta ubicar la vena yugular común. Luego se canalizó con Venocat flexible #18 G, para la administración de Solución Fisiológica 0.9% a un volumen de 8cc/kg/hora, al igual que los anestésicos, el DMSO según el grupo y el cloruro de potasio para la ulterior eutanasia de la unidad experimental.

Monitorización de las constantes vitales.

La monitorización básica de las variables fisiológicas consistió en la obtención de la frecuencia cardíaca, la frecuencia respiratoria y la temperatura corporal tomada a nivel rectal⁴⁵.

Procedimiento Quirúrgico.

En decúbito prono se practicó una incisión paravertebral bilateral 2 cm bajo los rebordes costales, disecando por planos hasta ubicar ambos riñones y su respectivo hilio. Se realizó nefrectomía unilateral derecha⁴⁷. Luego se disecó la arteria renal izquierda y se interrumpió el flujo sanguíneo mediante clampaje atraumático durante 30 minutos³³. Durante este tiempo el riñón se mantuvo eutérmico dentro de la cavidad abdominal.

Finalizado el tiempo de isquemia se restituyó el flujo sanguíneo verificando la permeabilidad arterial evaluando el retorno de la coloración renal preisquémica, en caso contrario se descartó la unidad experimental.

Se cerró nuevamente la cavidad y se reperfundió por un periodo de 8 horas⁴⁸ , seguido de nefrectomía y eutanasia de la unidad experimental.

Toma de Muestras.

Muestras sanguíneas.

Con el fin de no causar alteraciones hemodinámicas en las unidades experimentales el volumen total de las muestras sanguíneas no excedió los 10cc/kg de peso.

Cada muestra tuvo un volumen mínimo de 2.5cc en cada toma:

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

Cada muestra fue procesada en equipo automatizado para el análisis de creatinina sérica. Los resultados fueron categorizados según la clasificación de RIFLE mencionada anteriormente.

Muestras anatomopatológicas.

Luego de la nefrectomía izquierda se realizó una incisión coronal en la línea media del mismo donde se colocó papel filtro y se introdujo en frascos individuales con formalina buferizada para su preservación hasta su fijación en parafina y posterior análisis histopatológico con tinción histoquímica de hematoxilina eosina, según estándares internacionales.

Los estudios histopatológicos del riñón fueron realizados por un único patólogo quien desconocía el grupo al cual pertenece cada muestra. Se utilizó un microscopio óptico binocular analizando cada lamina en 10 campos ecofuertes.

Los hallazgos fueron reportados de una manera homogénea, categorizando cada variable como ausente, leve, moderado o severo según el criterio del patólogo. (Anexo1).

Eutanasia.

Una vez finalizado el procedimiento se realizó eutanasia de la unidad experimental siguiendo las normas de la American Veterinary Medical Association⁴⁹. Para tal efecto se administro Cloruro de Potasio por vía I.V. a dosis de 2 mmol/kg.

5.2. Definiciones Operacionales.

| NOMBRE | TIPO | DEFINICION | UNIDADES |
|-------------------------------|-------------------------------|---|---|
| Niveles séricos de creatinina | Dependiente. Cuantitativa. | Prueba química sanguínea, utilizado como marcador de función renal (Valor normal en conejo de 0.5-2.5mg/dl) | mg/dl |
| Histología renal | Dependiente cualitativa | Evaluación de la estructura histopatológica del tejido renal. <ul style="list-style-type: none"> • Extensión del daño (focal, multifocal, Extensa) • Hiperemia medular • Presencia de leucocitos • Dilatación tubular | Daño: Ausente = 0% Leve =1-10%, Moderado =11-24% |

| | | | |
|-------------------------------|-------------------------|--|---|
| | | <ul style="list-style-type: none"> • Presencia de cuerpos hialinos • Adelgazamiento del epitelio tubular • Presencia de células intratubulares • Tubulorrexis | <p>Severo =25-45%</p> <p>Muy Severo > 46%</p> |
| Cambios celulares apoptóticos | Dependiente Cualitativa | <p>Se considerará como célula en apoptosis, aquella que cumpla una o más de las siguientes características:</p> <p>Fase de ejecución:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Reducción del tamaño celular. • Cromatina nuclear condensada por debajo de la membrana nuclear. <p>Fase de degradación:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cariorrexis • Ruptura celular en varios fragmentos (cuerpos apoptóticos). <p>Fase fagocítica:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cariólisis • Fagocitosis de los cuerpos apoptóticos por las células adyacentes. | <p>Daño:</p> <p>Ausente = 0%</p> <p>Leve =1-10%,</p> <p>Moderado =11-24%</p> <p>Severo =25-45%</p> <p>Muy Severo > 46%</p> |
| Cambios celulares necróticos | Dependiente Cualitativa | <p>Se considerará como célula necrótica, aquella que cumpla una o más de las siguientes características:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Edema celular. • Vacuolización. • Perforaciones de la | <p>Daño:</p> <p>Ausente = 0%</p> <p>Leve =1-10%,</p> <p>Moderado</p> |

| | | | |
|--|--|---|---|
| | | membrana celular. • Destrucción celular. | =11-24% Severo =25-45% Muy Severo > 46% |
|--|--|---|---|

5.3. Universo, Selección y Tamaño de la Muestra.

El tamaño de la muestra estuvo compuesto por un total de 29 conejos los cuales fueron divididos en las siguientes categorías:

- Grupo sham: Comprendido por 5 de conejos.
- Grupo Isquemia-Reperfusión-SSN (I/R-SSN): Comprendido por 12 conejos.
- Grupo Isquemia-Reperfusión-DMSO (I/R-DMSO): Comprendido por 12 conejos.

Aleatorización de la muestra.

La selección de las unidades experimentales se realizó asignando un número a cada conejo, el cual fue marcado sobre la piel de la oreja del mismo. Los números fueron colocados en una tómbola de donde se extrajeron uno a uno, los cuales fueron colocados en cada grupo completando el total de animales designado para cada uno, iniciando desde el Grupo Control hasta el Grupo sham.

5.4. Criterios de Inclusión y de Exclusión.

Criterios de Inclusión.

- Conejos machos de la raza Nueva Zelanda.
- Conejos con peso entre 2 ± 0.5 Kg.
- Conejos en aparente buen estado de salud.

Criterios de Exclusión.

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

5.5. Procedimiento para la Recolección de la Información.

Análisis estadístico.

Los valores obtenidos fueron tabulados en el programa Microsoft Excel 2007 y analizados en el programa estadístico SPSS 15.0 para Windows. Cada variable fue explorada para determinar su distribución mediante el test de Shapiro-Wilk para definir su tratamiento con estadística paramétrica o no paramétrica

- *Variables Paramétricas:* Fueron analizadas mediante prueba T para explorar su significancia, de encontrarse un valor p menor de 0.05 se procedió al análisis mediante U de Mann-Whitney para determinar la significancia estadística entre los 3 grupos.
- *Variables no Paramétricas:* Fueron analizadas mediante la prueba de Kruskal Wallis y posteriormente mediante Mann-Whitney para determinar la significancia entre los grupos.

5.6. Procedimientos para Considerar los Aspectos Éticos.

El bienestar animal se realizó bajo los lineamientos del Consejo Canadiense para el Cuidado Animal dictaminado en el año 2007. Cada animal permaneció en jaulas aisladas administrándosele agua *ad libitum* y alimentación especial (concentrado de conejo). Una vez finalizado el procedimiento se procedió a realizar eutanasia siguiendo las normas de la American Veterinary Medical Association⁴⁸. Para tal efecto se administró Cloruro de Potasio por vía I.V. a dosis de 2 mmol/kg.

6. RESULTADOS.

A continuación se presentan los datos obtenidos del análisis de las pruebas de laboratorio y muestras histopatológicas de las 29 unidades experimentales.

Inicialmente, a cada variable, se le realizaron pruebas exploratorias de normalidad: Shapiro Wilk para determinar el tipo de pruebas con el que se analizarían los resultados – paramétricas o no paramétricas. La creatinina sérica pre y post reperfusión cumplieron criterios de normalidad, mientras que las variables de histopatología no. Sin embargo; el grupo sham solo estuvo constituido por cinco unidades experimentales, por lo que para el análisis de dicho grupo, solo se utilizaron pruebas no paramétricas.

6.1 Creatinina Sérica

La variable creatinina sérica basal se analizó mediante pruebas estadísticas paramétricas (prueba T) y no paramétricas (Kruskal-Wallis) obteniendo significancias de $P = 0.911$ y $P = 0.965$ respectivamente, se estableció la homogeneidad inicial de los sujetos en cuanto a valores de creatinina se refiere. Las medias, valores mínimos y máximos se representan en el cuadro 1.

Los valores de creatinina de las muestras tomadas al finalizar de las ocho horas de reperfusión resultaron diferentes para cada grupo ($p=0.02$). Los contrastes entre grupos muestran significancia en todos los casos:

- Grupo I/R-SSN vs Grupo I/R-DMSO $p=0.003$
- Grupo I/R-SSN vs Grupo sham $p= 0.000$
- Grupo I/R-DMSO vs. Sham $p=0.002$

Esto se refleja en los valores máximos, mínimos y medias de cada grupo (cuadro 6).

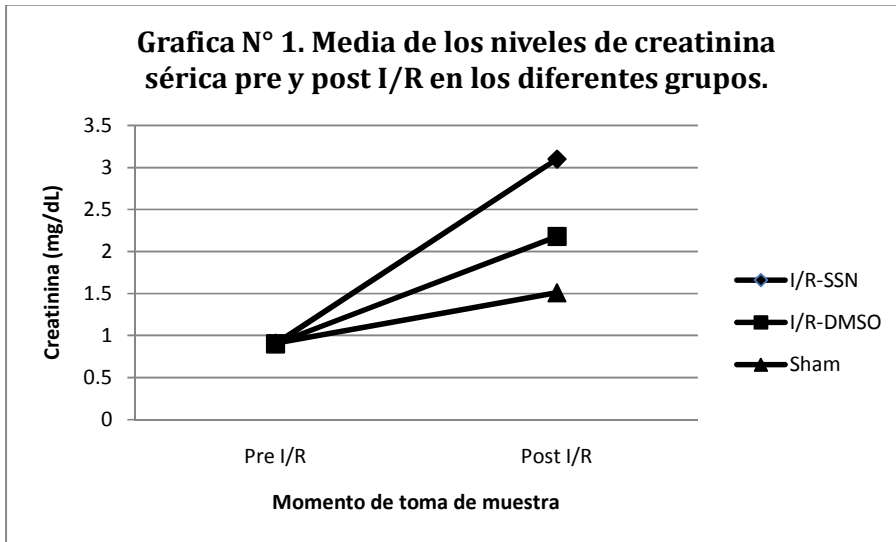
Cuadro N° 6. Comportamiento de la \bar{x} (max-min) creatinina basal y final (mg/dl).

| | | Grupo I/R-SSN | Grupo I/R - DMSO | Grupo sham | P |
|-------|----------------------|---------------|------------------|--------------|-------|
| BASAL | \bar{x} creatinina | 0.91mg/dl | 0.92mg/dl | 0.92mg/dl | 0.095 |
| | (min -max) | (0.74-1.10) | (0.70-1.10) | (0.78-1.10) | |
| FINAL | \bar{x} creatinina | 2.9 mg/dl | 2.26 mg/dl | 1.5 mg/dl | 0.002 |
| | (min -max) | (2.32-3.89) | (1.75- 3.20) | (1.26- 1.87) | |

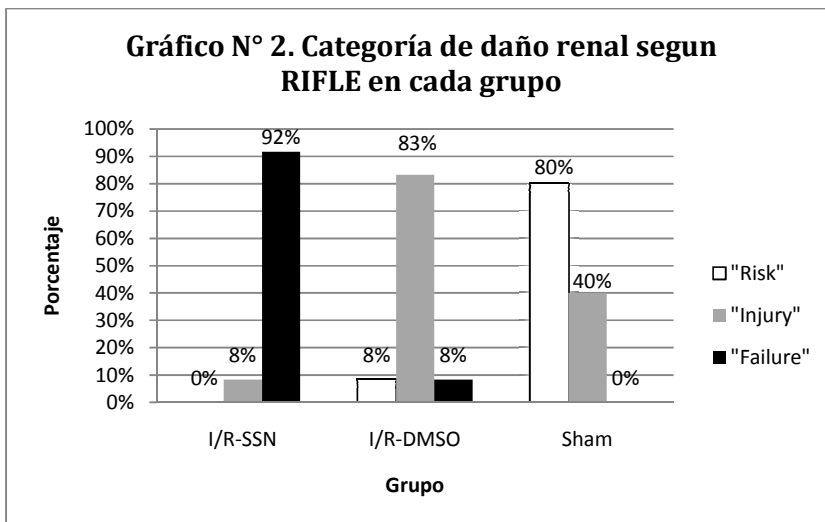
Grupo I/R-SSN: Isquemia-Reperfusión-Solución Salina Normal
Grupo I/R-DMSO: Isquemia-Reperfusión Dimetilsulfóxido

Los valores de creatinina post intervención mostraron un incremento en todos los grupos al compararlos con los valores de creatinina basal, siendo el aumento más

notable en el grupo I/R-SSN (incremento de 318%), seguido por el grupo I/R-DMSO (incremento 245%) y finalmente el grupo Sham, (incremento de 178%). Mostrando significancia estadística con valores menores a $p=0.001$ para todos ellos.



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

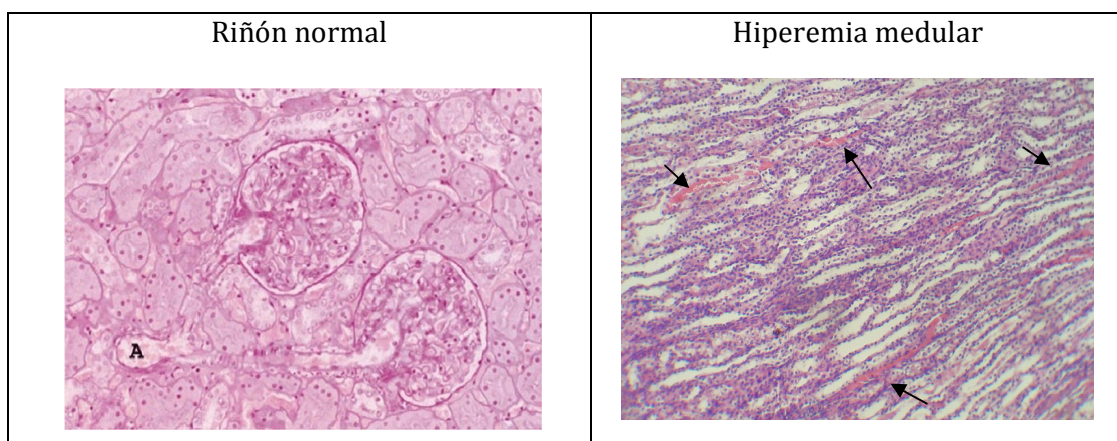


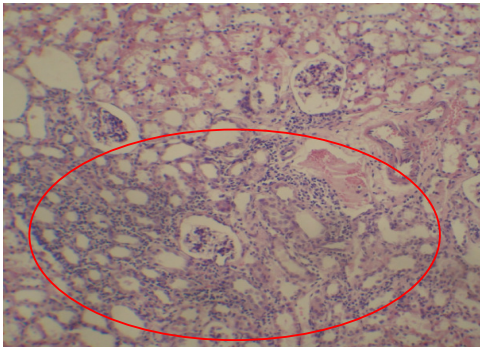
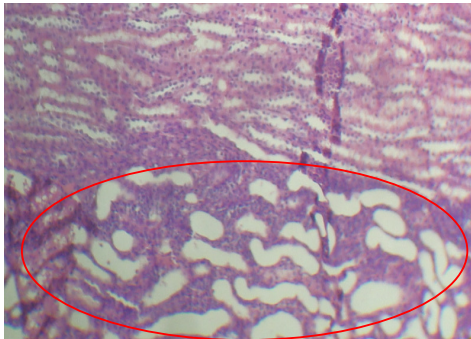
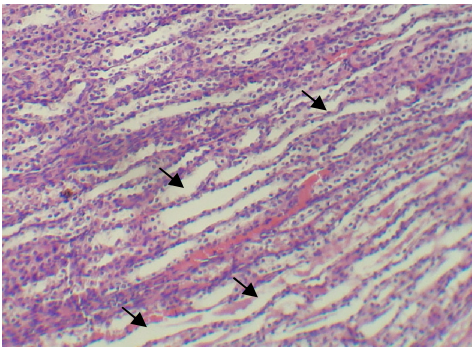
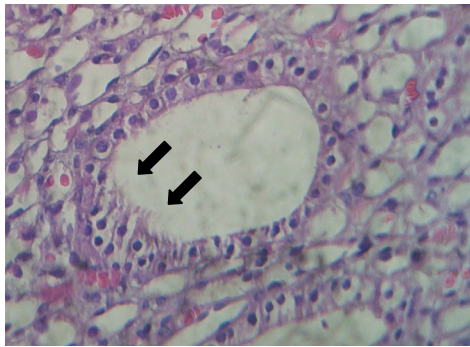
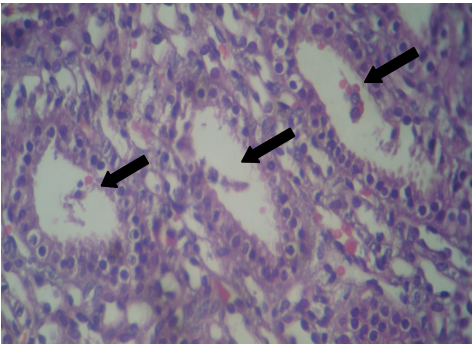
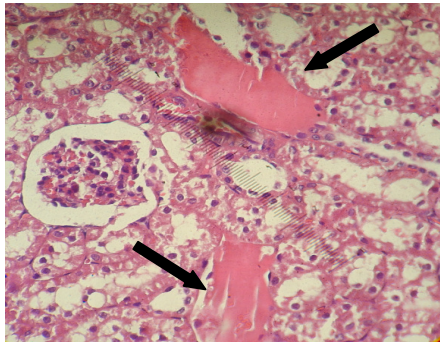
En el grupo I/R-SSN predominó el nivel más severo de daño renal según la clasificación de RIFLE 92%- “*Failure*”, en el grupo I/R-DMSO el nivel intermedio de daño renal - “*Injury*” 83% y finalmente en el grupo sham predominó “*Risk*” 80%, que equivale al nivel más leve de daño renal. Diferencias apoyadas por la significancia estadística encontrada.

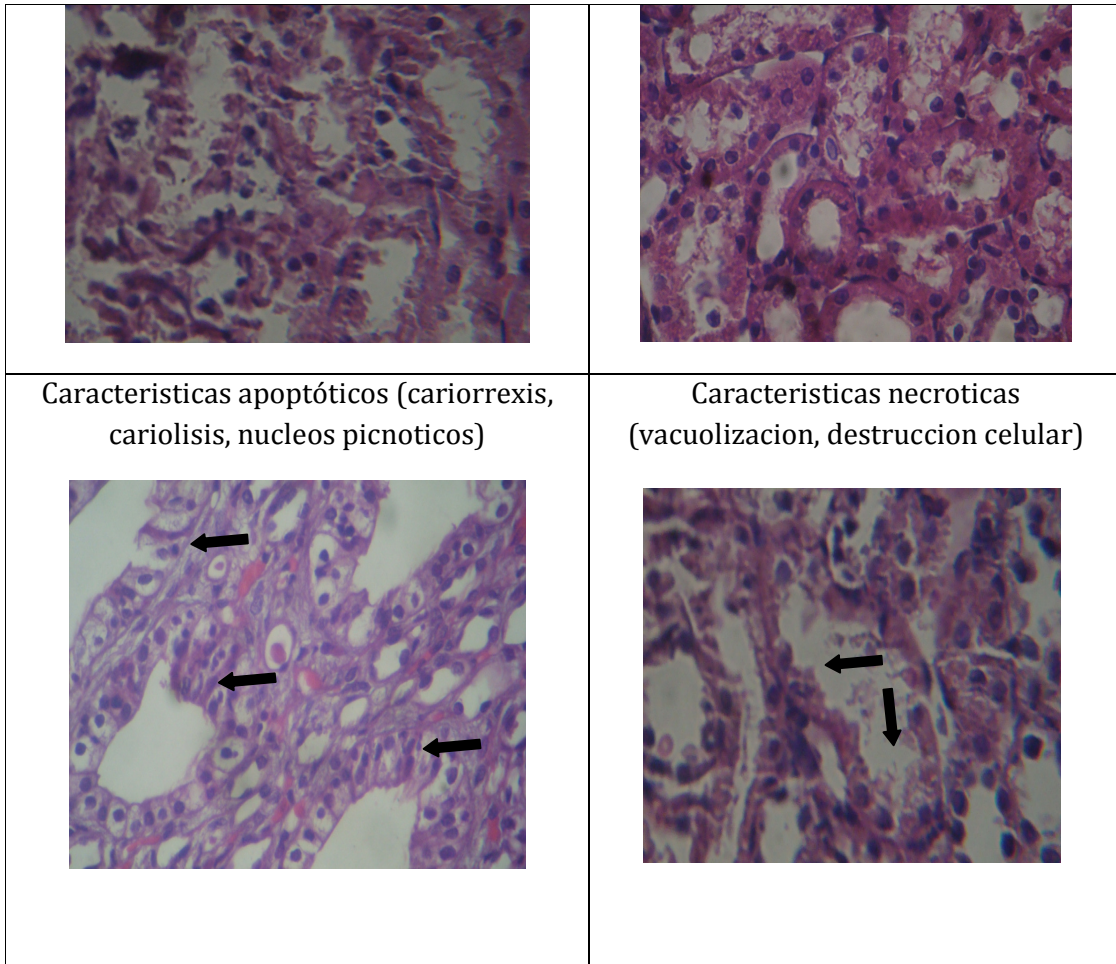
6.2 Histopatológicos

El análisis histopatológico de los riñones de las unidades experimentales se realizó con el fin de determinar el grado de severidad de las lesiones al igual que los cambios apoptóticos y necróticos en cada grupo según los parámetros establecidos en la metodología (Cuadro 7).

Cuadro N°7. Hallazgos histopatológicos en los grupos isquémicos.



| | |
|---|---|
| <p style="text-align: center;">Leucocitos</p>  | <p style="text-align: center;">Dilatación tubular</p>  |
| <p style="text-align: center;">Adelgazamiento de Epitelio Tubular</p>  | <p style="text-align: center;">Ruptura de membrana celular</p>  |
| <p style="text-align: center;">Células Intratubulares</p>  | <p style="text-align: center;">Cilindros Hialinos</p>  |
| <p style="text-align: center;">Tubulorrexis</p> | <p style="text-align: center;">Vacuolización citoplasmática</p> |



Se evaluaron las 17 variables histopatológicas en cada muestra, categorizando cada una como ausente, leve, moderado o severo según lo establecido anteriormente. Se cuantificó por grupo experimental el número de asignaciones - ausente, leve, moderado y severo - por variable, determinado el porcentaje de cada una de ellas en cada grupo (Gráfica 3). De la misma manera se agruparon los parámetros indicativos de apoptosis cuantificándolos en cada grupo (Figura 7).

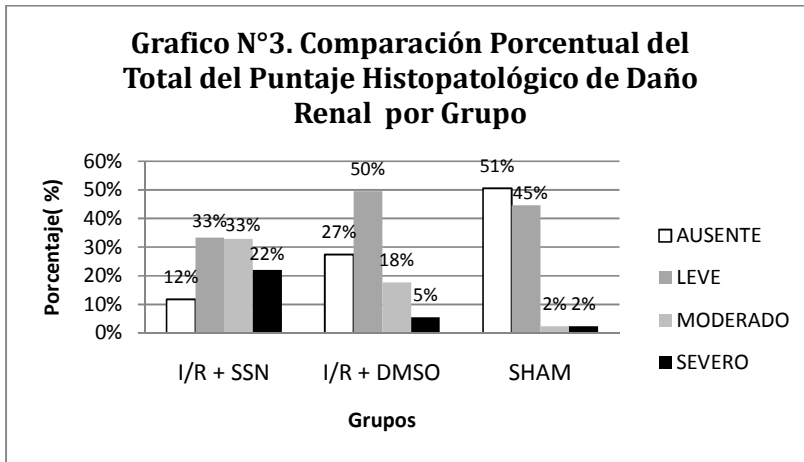
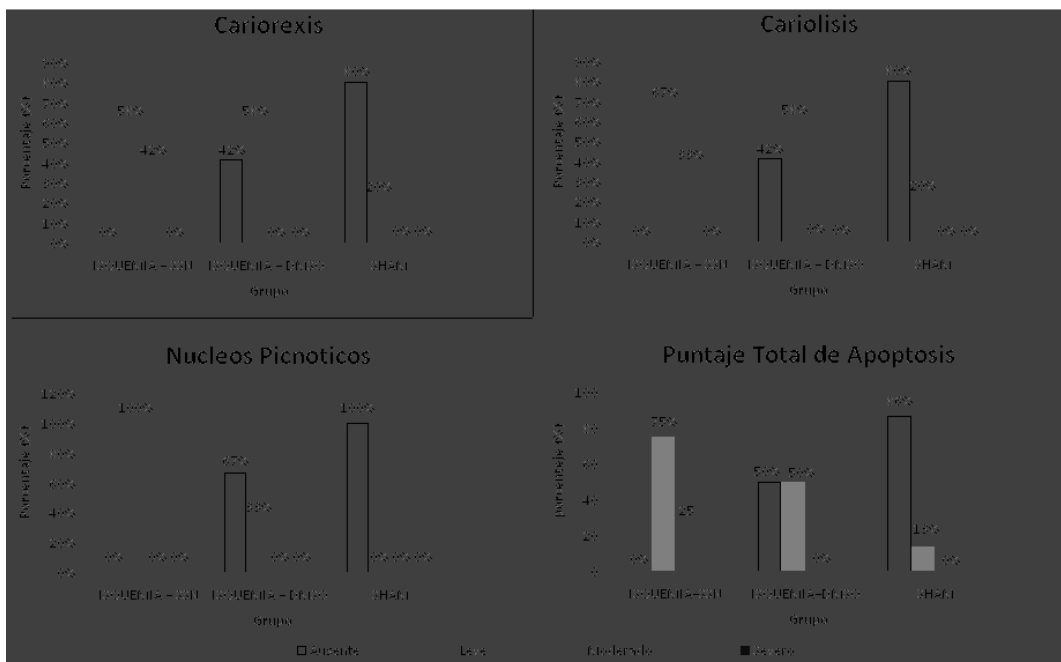


Figura N°7. Parámetros indicativos de apoptosis en los diferentes grupos.



Entre los grupos, se observaron diferencias histopatológicas entre el grado de severidad de las variables; las más relevantes por grupo se pueden observar en la (Figura 8).

Figura N°8. Hallazgos histopatológicos encontrados en los diferentes grupos con sus características distintivas.

Grupo sham

Leve Hiperemia medular.

Leve cantidad de cuerpos hialinos.

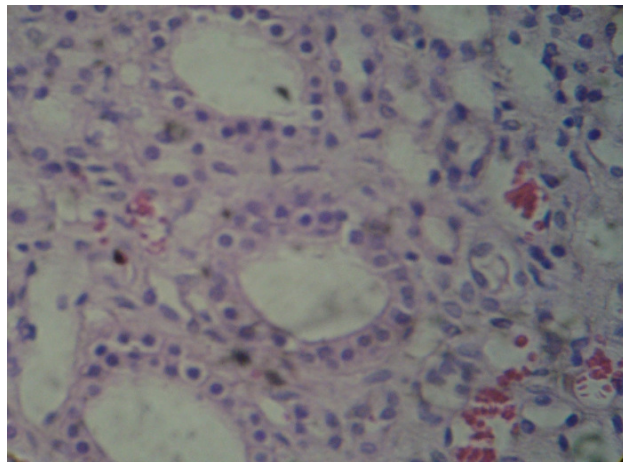
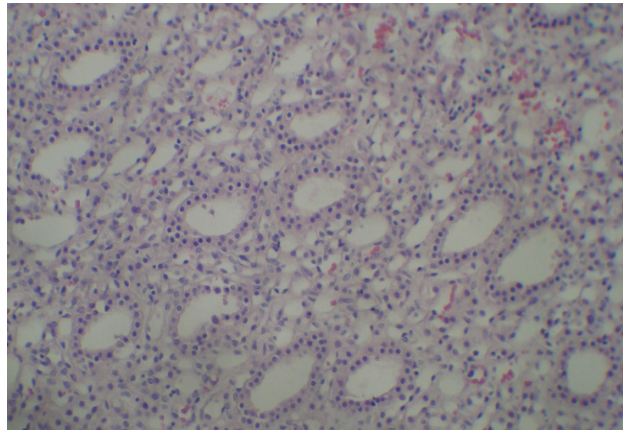
Leve adelgazamiento del epitelio.

Leve presencia edema intersticial, tubular e intracelular.

Ausente a leve presencia de células intratubulares.

Parámetros de necrosis ausentes a leves.

Parámetros de apoptosis ausentes a leves.



Grupo I/R-SSN

Leve hiperemia medular.

Leve a moderada presencia de células intratubulares.

Moderada a severa cantidad de cuerpos hialinos.

Moderado a severo adelgazamiento del epitelio.

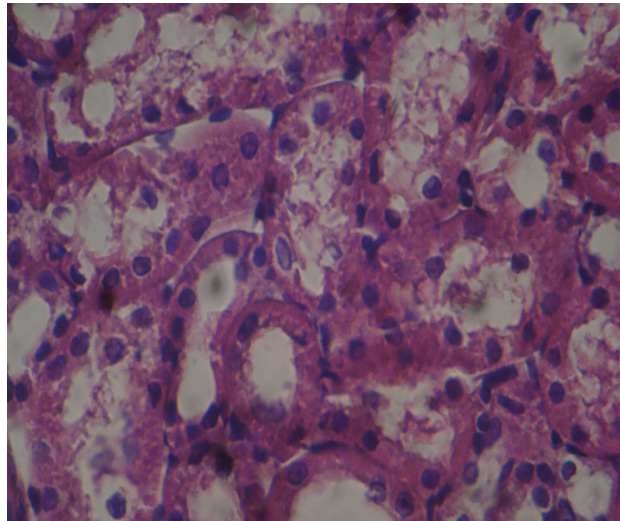
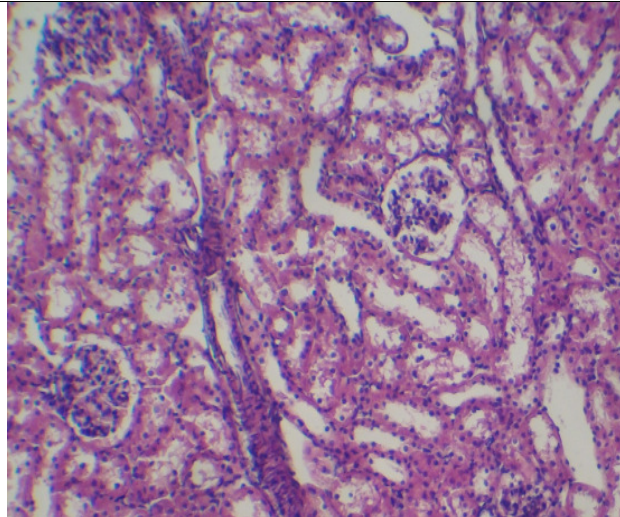
Moderada a severa presencia de edema intersticial, tubular e intracelular.

Severos daños por necrosis:

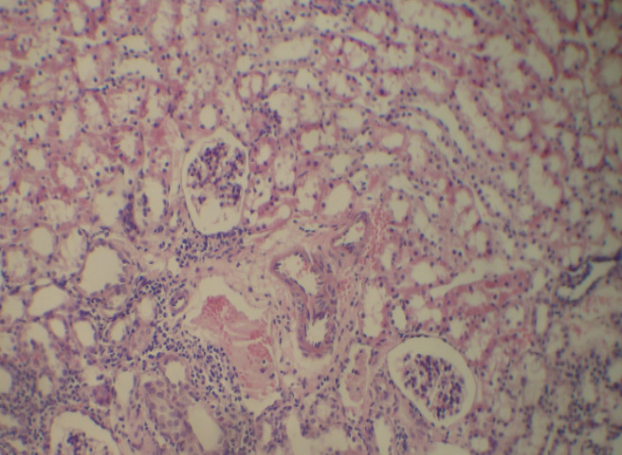
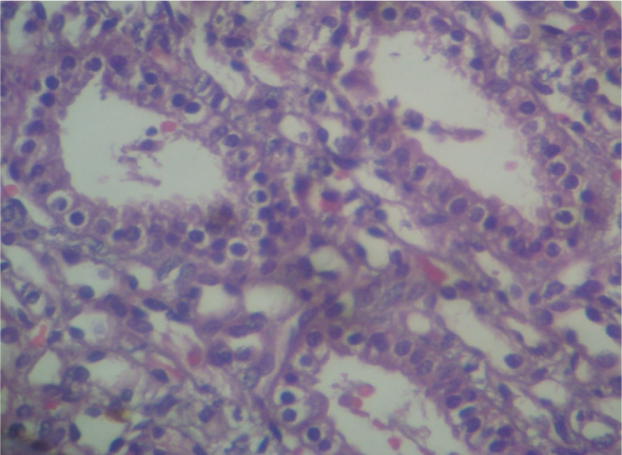
- Vacuolización celular
- Perforaciones de la membrana celular.
- Destrucción celular y desprendimiento de membrana basal

Leve a moderada presencia de apoptosis:

- Núcleos picnóticos
- Cariorrhexis
- Cariólisis



Grupo I/R + DMSO

| | |
|--|--|
| <p>Leve hiperemia medular.</p> <p>Leve a moderada presencia de células intratubulares.</p> <p>Leve adelgazamiento del epitelio.</p> <p>Leve a moderada cantidad de cuerpos hialinos.</p> <p>Leve a moderada presencia de edema intersticial, tubular e intracelular.</p> <p>Leves daños por necrosis:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Vacuolización celular • Perforaciones de la membrana celular. • Destrucción celular y desprendimiento de membrana basal <p>Leve presencia de apoptosis:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Núcleos picnóticos • Cariorrhexis • Cariólisis |   |
|--|--|

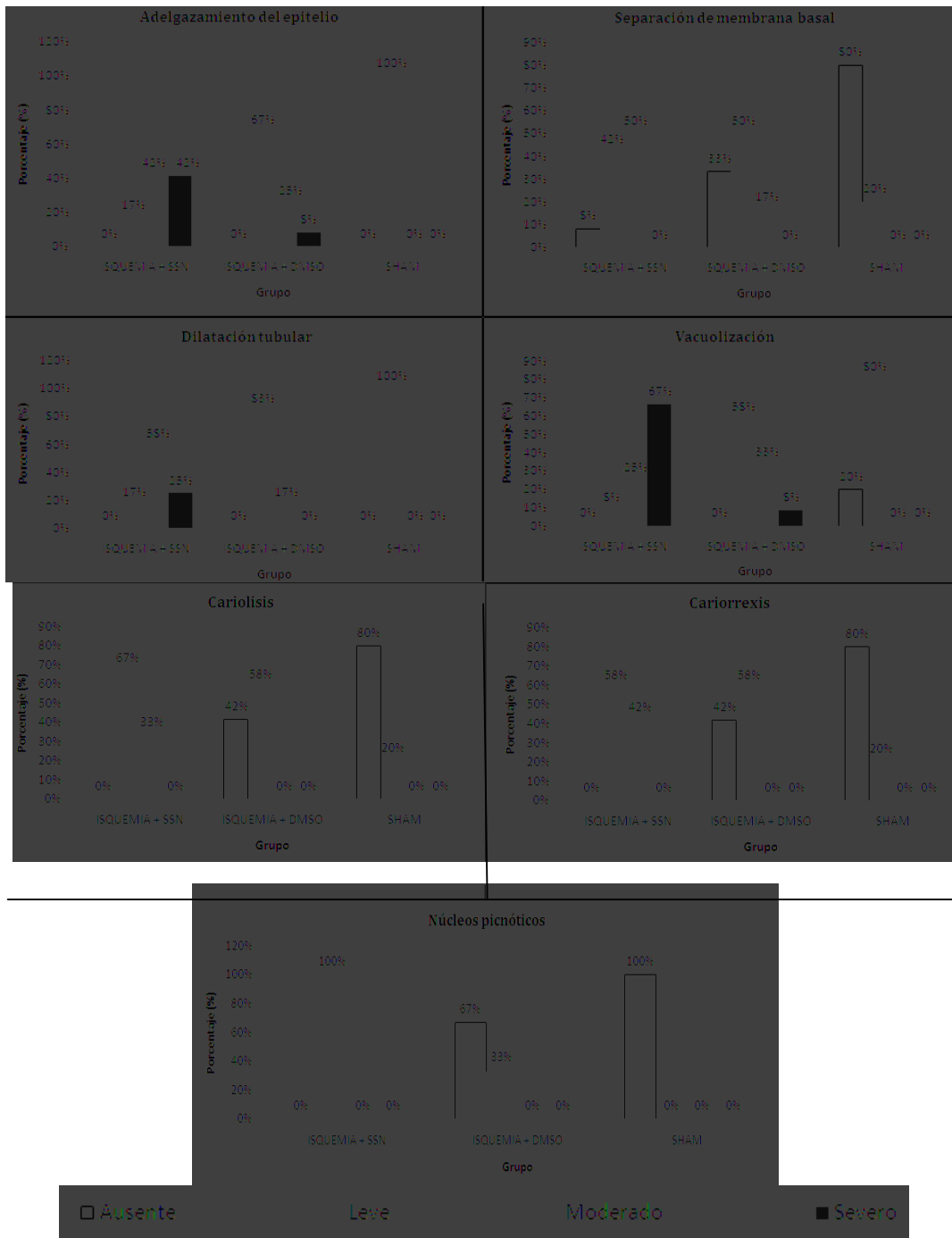
Cada variable histopatológica, fue analizada por estadística no paramétrica mediante el test de Kruskal Wallis, una vez determinada la diferencia entre los grupos, ($P < 0.05$) se analizó la diferencia estadística entre pares mediante la prueba estadística de Mann Whitney (Cuadro 8).

Cuadro N°8. Significancia estadística de las variables histopatológicas y su relación entre ellas.

| | Pruebas estadísticas | | | |
|----------------------------------|----------------------|------------------------|-------------------|-------------------|
| | kruskal-wallis | Mann Whitney | | |
| | | I/R + SSN vs I/R +DMSO | I/R + SSN vs Sham | I/R+ DMSO vs SHAM |
| Vacuolización | 0.000 | 0.002 | 0.001 | 0.104 |
| Edema Intracelular | 0.003 | 0.007 | 0.006 | 0.279 |
| Degeneracion hidropica | 0.003 | 0.002 | 0.027 | 0.442 |
| Citoplasma Basofilico | 1.000 | X | X | X |
| Separacion de Membrana Basa | 0.010 | 0.780 | 0.006 | 0.130 |
| Ruptura de Membrana Celular | 0.000 | 0.002 | 0.000 | 0.160 |
| Adelgazamiento del Epitelio | 0.003 | 0.017 | 0.00 | 0.328 |
| Dilatacion Tubular | 0.001 | 0.002 | 0.006 | 0.646 |
| Cilindros Hialinos | 0.062 | X | X | X |
| Celulas Intratubulares | 0.001 | 0.007 | 0.001 | 0.130 |
| Leucocitos | 0.078 | X | X | X |
| Tubulorrexis | 0.001 | 0.028 | 0.001 | 0.009 |
| Cariorrexis | 0.001 | 0.005 | 0.002 | 0.234 |
| Nucleos Hiper Cromaticos | 0.982 | X | X | X |
| Cariólisis | 0.001 | 0.010 | 0.004 | 0.234 |
| Núcleo Picnóticos | 0.000 | 0.005 | 0.000 | 0.328 |
| Hiperhemia Medular | 0.149 | X | x | X |
| Total de Puntuacion | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.370 |
| Total de Puntuacion de Apoptosis | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 1.300 |

Grupo I/R-SSN: Isquemia-Reperfusión-Solución Salina Normal Grupo I/R-DMSO: Isquemia-Reperfusión Dimetilsulfóxido

Figura N°9. Variables histopatológicas en las que se observó una diferencia significativa entre el grupo I/R-SSN y I/R-DMSO y no entre I/R-DMSO y sham.



7. DISCUSIÓN.

Pese a los nuevos conceptos existentes sobre daño renal agudo y a los grandes avances en su manejo, la mortalidad por dicha causa se mantenido entre un 30% y un 50% durante el último medio siglo^{50 51}. Estos avances, centrados en la regeneración de las células afectadas, han dejado a un lado el importante rol de la prevención del daño celular característico de la necrosis tubular, resultante de situaciones comunes como el arresto cardiaco, choque, trasplante renal, tratamiento quirúrgico de aneurismas suprarrenales o procedimientos vasculares mayores^{1,3,50,51}.

La falla renal aguda producida por el fenómeno I/R es un síndrome complejo que involucra diferentes mecanismos como la anoxia, la liberación de RLO y la acumulación de neutrófilos que magnifican la respuesta inflamatoria⁵².

El arsenal farmacológico propuesto, aun en fase experimental, incluye la utilización de algunos scavengers de RLO, cuyo principal mecanismo de acción es la disminución del daño hístico y la afectación directa a las membranas celulares por medio de la peroxidación de ácidos grasos polisaturados, con la subsecuente elevación de calcio citosólico, la depleción de ATP y la activación de las caspasas como paso inicial del proceso apoptótico.^{20,21,51, 52}

El DMSO como scavenger de radicales libres posee además actividad antiinflamatoria e inhibitoria de la agregación plaquetaria, atributos que lo convierten en una sustancia idónea para el tratamiento de una condición con tan diversas implicaciones fisiológicas²⁸, como lo es el fenómeno I/R, tal y como lo han demostrado algunos estudios en diferentes órganos: Mucosa intestinal, retina, hígado, cerebro, piel, músculo, corazón, médula espinal, entre otros^{35,36,37,38,40, 41,42}.

El papel del DMSO en la protección renal no es aun claro, sin embargo estudios previos han evidenciado efectos benéficos en la protección o amortización del daño renal por I/R⁶. Este estudio reafirma dicha aseveración y propone al DMSO como una sustancia protectora y minimizadora de la muerte celular por apoptosis, posiblemente por la disminución de la presencia de RLO, abriendo la puerta a una opción de tratamiento sobre la premisa de que la célula afectada por la necrosis es difícilmente recuperable; sin embargo, la célula afectada por apoptosis puede ser potencialmente viable⁵¹

Hoyos W y cols evaluaron el uso de DMSO como protector renal en el fenómeno I/R, administrando DMSO en diferentes momentos del fenómeno- previo, durante y posterior al inicio de la reperfusión. Los investigadores, en base a sus resultados, atribuyen al DMSO propiedades protectoras para el riñón, observándose los mejores resultados en el grupo de unidades experimentales tratados con DMSO al momento de inicio de la reperfusión⁶ tal y como se hizo en este estudio.

Dentro de la función renal la creatinina resulta un excelente marcador del daño renal en sus primeras 72 horas tal y como lo demostraron O' Donell y Cols al comparar la depuración de inulina administrada por vía endovenosa con los niveles de creatinina en un modelo animal de I/R renal.⁵³

El comportamiento de los valores medios de creatinina exhibe un incremento con respecto a los valores basales de cada uno de los grupos 178% grupo sham, 245% I/R-DMSO y 318% I/R-SSN, con una significancia estadística de $P < 0.00$ entre grupos (grafica 1), estos hallazgos respaldan la función protectora de DMSO sobre la filtración glomerular. La elevación de creatinina observada en el grupo sham puede explicarse por tres situaciones; la primera de ellas, la usencia por extracción

quirúrgica del riñón derecho, segundo, la sobrecarga de líquidos endovenosos durante el procedimiento quirúrgico y reperfusión o por el stress quirúrgico al que fue sometida la unidad experimental.

El consenso Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI), estableció y validó la clasificación R.I.F.L.E de las siglas en inglés 'Risk' (Riesgo), "Injury" (lesión) y "Failure" (falla), clasificando la lesión renal de acuerdo al incremento en los niveles de creatinina con respecto al valor basal en 150%, 200% y 300% respectivamente^{7,8,9,10}. En este estudio las unidades experimentales correspondientes al grupo I/R-SSN se distribuyeron en un 92% dentro de la categoría Failure, comparado con 8% en esta categoría para el grupo I/R-DMSO y 0% en el grupo sham (gráfica 2), con una diferencia estadística entre grupos de $P=0.000$.

Los hallazgos histopatológicos respaldan el incremento en los valores de creatinina y el estadiaje de daño renal y constituyen el eje central para la determinación del daño por isquemia reperfusión. La caracterización morfológica celular por microscopía sigue siendo el gold estándar para la identificación de apoptosis a pesar de la existencia de métodos cuantitativos más novedosos²⁵.

El estudio histopatológico de las muestras por microscopía de luz, refleja diferencias estadísticamente significativas entre los especímenes del grupo I/R-DMSO y el grupo I/R-SSN. La severidad del daño entre ambos grupos se distribuye en forma heterogénea donde la categorización del daño como "severo" fue mayor en el grupo I/R-SSN con un promedio de 22%, seguido por el grupo I/R-DMSO (5%) y el grupo sham (2%) (Gráfica 3).

La diferencia entre apoptosis y necrosis se debe principalmente a como la membrana celular participa en cada uno de estos procesos. En la necrosis existe una pérdida temprana de la membrana celular, lo que permite la entrada de iones y líquido extracelular hacia el interior de la célula y conlleva a edema y vacuolización de la célula y sus organelos. En cambio, en la apoptosis, la integridad de la membrana celular persiste hasta las etapas tardías del proceso, por lo que los cambios se ven más que todo a nivel del núcleo²⁰ estas diferencias eran evidentes en los especímenes, siendo clara el nivel mayor de apoptosis en el grupo I/R-SSN, reforzando la actividad antiapoptotica de DMSO.

Al analizar las variables de forma individual, los resultados muestran diferencias entre grupos en aspectos característicos de apoptosis: la aparición de núcleos picnóticos, cariorrexis y cariólisis²⁰ con mayor frecuencia y severidad en los riñones del grupo I/R-SSN en comparación a los demás grupos (Figura 7), indican que DMSO como scavenger de RLO, posee una función antiapoptótica en el fenómeno I/R, lo que explicaría, en parte, su capacidad protectora en el riñón durante un período de reperfusión, tal y como se ha descrito en trabajos anteriores donde se evalúa la utilización de sustancias antioxidantes para aminorar el daño por I/R, en los cuales además, han cuantificado los niveles de RLO encontrando una relación directa entre su concentración y la severidad del daño⁵².

Existen además resultados en este estudio que sugieren la influencia positiva del DMSO sobre hallazgos característicos de la necrosis como lo son la vacuolización y ruptura de la membrana celular, dichas variables muestran mayor severidad en el grupo I/R-SSN que I/R-DMSO ($p=0.00$). Esto pudiera explicarse por la acción

antiinflamatoria ya descrita del DMSO en otros estudios^{29,30,32} y la relación directa entre necrosis e inflamación.

Las tendencias en cuanto a daño son visibles en las diferentes ilustraciones, sin embargo llama la atención que variables como vacuolización, adelgazamiento del epitelio tubular, dilatación tubular, cariorrexis, cariólisis y núcleos picnóticos no muestran diferencias estadísticas significativas entre el grupo I/R-DMSO y el grupo sham, pero si entre I/R-SSN y I/R-DMSO, hallazgos que permiten aseverar que la severidad del daño en el grupo sham, que no fue sometido a la isquemia y el grupo tratado con DMSO no son diferentes a pesar de la injuria ocasionada por I/R (figura 9).

Las demás variables evalúan en forma general la lesión hística y por consiguiente la funcionalidad orgánica; parámetros como la presencia o no del ribete en cepillo de las células epiteliales, la presencia de células intratubulares, cuerpos hialinos y la dilatación tubular son de gran importancia en el diagnóstico histopatológico del daño renal.

El grupo sham en su gran mayoría mostró un epitelio simple cúbico alto; formado por células con numerosas microvellosidades en su borde apical, constituyendo el ribete en cepillo; núcleo voluminoso situado hacia la base y nucleolo prominente, el citoplasma se observó escasamente teñido de aspecto homogéneo y leve edema ocasionado probablemente por la sobrecarga de líquidos. Mientras que el grupo I/R-SSN e I/R-DMSO muestran diferentes grados de afectación siendo siempre menores en el grupo tratado con DMSO.

Los resultados histológicos referentes a integridad tubular muestran resultados similares a los obtenidos por otros autores⁵⁴ sobre el efecto de algunas sustancias antioxidantes sobre la protección de las células epiteliales de los tubulos proximales que aunados a los hallazgos antiapoptoticos convierten a DMSO en una sustancia promisoría para el tratamiento del daño renal por isquemia reperusión. La investigación básica deberá puntualizar y explicar en un futuro los mecanismos de acción y encontrar sus indicaciones más precisas, así como las dosis y efectos secundarios para su posterior uso y beneficio a la humanidad.

8. CONCLUSIONES.

- El modelo experimental creado logra simular el escenario fisiopatológico de un evento de isquemia-reperfusión renal.
- Se observaron cambios histológicos compatibles con daño renal agudo de origen pre-renal y aumento de la creatinina sérica posterior a la intervención en los tres grupos.
- El manejo con DMSO en el fenómeno de I/R administrado posterior a un período de isquemia renal, parece disminuir el deterioro de la función renal durante el período de reperfusión, siendo superior al manejo convencional con líquidos endovenosos.
- El manejo con DMSO en el fenómeno de I/R administrado posterior a un período de isquemia renal, parece disminuir el daño tubular renal desde el punto de vista histopatológico, durante el período de reperfusión, siendo superior al manejo convencional con líquidos endovenosos.
- El daño renal observado presentó una distribución multifocal en todas las muestras de los diferentes grupos.
- El daño renal se observó predominantemente en la corteza renal, en los tubulos proximales y distales.
- El manejo con DMSO disminuye la muerte celular por apoptosis y en un modelo de isquemia-reperfusión renal en comparación al manejo convencional con líquidos endovenosos.
- El estudio histopatológico de las muestras renales teñidas con hematoxilina eosina evaluadas bajo el microscopio de luz por un patólogo permite identificar a las células necróticas y apoptóticas y determinar el grado de daño renal.

- Los parametros de RIFLE resultaron compatibles con los hallazgos histopatologicos de dano renal y podran ser utilizados en modelos experimentales similares para determinar el grado de dano renal.
- El grado de deterioro de la función renal reflejado por los cambios de creatinina coincide con el grado de daño renal reflejado en el estudio histopatológico en los diferentes grupos.
- Los resultados obtenidos permiten identificar la superioridad del DMSO versus el manejo convencional con líquidos endovenosos.

9. RECOMENDACIONES.

- Mejorar el modelo experimental para futuros estudios teniendo en cuenta un adecuado monitoreo de signos vitales, gasto urinario y un mejor manejo de los líquidos endovenosos.
- Utilizar métodos cuantitativos como cualitativos para la medición de apoptosis y necrosis a nivel histopatológico.
- Realizar estudios que evalúen otros efectos del medicamento sobre el fenómeno de I/R en este modelo experimental.
- Realizar estudios que evalúen los efectos del medicamento con periodos de reperfusión más prolongados (24-48 horas).
- Realizar estudios que evalúen la sobrevida de las unidades experimentales utilizando este modelo experimental.

10. CRONOGRAMA.

Cronograma de Actividades.

| MES \ ACTIVIDAD | ABRIL | MAYO | JUNIO | JULIO | AGOSTO | SEPTIEMBRE | OCTUBRE | NOVIEMBRE | DICIEMBRE | ENERO |
|---------------------------------------|-------|------|-------|-------|--------|------------|---------|-----------|-----------|-------|
| Entrega de protocolo comité de tesis. | | | | | | | | | | |
| Entrega de solicitud de asesor. | | | | | | | | | | |
| Resolución de comité de tesis | | | | | | | | | | |
| Modificaciones protocolo. | | | | | | | | | | |
| Prueba piloto | | | | | | | | | | |
| Actividades de gestión de insumos | | | | | | | | | | |
| Actividades de adquisición de insumos | | | | | | | | | | |
| Realización experimentos | | | | | | | | | | |
| Obtención de resultados | | | | | | | | | | |
| Tabulación de resultados | | | | | | | | | | |
| Análisis de resultados | | | | | | | | | | |
| Redacción de tesis | | | | | | | | | | |
| Entrega de Tesis | | | | | | | | | | |
| Defensa de tesis | | | | | | | | | | |

11. PRESUPUESTO.

❖ Animales de experimentación.

Características: Conejos machos de raza Nueva Zelanda.

Costo por unidad: \$2.20 por kg de peso de conejo.

Número de unidades: 31 conejos de 2.5 +/- 1 Kg

Costo: \$150.00

Jaulas y alimentos para el mantenimiento de los conejos: \$50.00

❖ Medicamentos:

Ketamina.

Características: Presentación de 50mg/1ml, frasco de 35ml

Costo por unidad: \$15.00

Número de unidades: 20 frascos.

Costo: \$300.00

Acepromacina.

Características: Presentación de 2mg/10ml, frasco de 100ml

Costo por unidad: \$25.00

Número de unidades: 2 frascos.

Costo: \$50.00

Dimetilsulfóxido (DMSO).

Características: Ampolla de 10 mL al 99.9%

Costo por unidad: \$5.00

Número de unidades: 12

Costo: \$60.00

Solución Salina Normal (SSN).

Características: 0.9%, 500ml

Costo por unidad: \$2.50

Número de unidades: 10

Costo: \$25.00

- ❖ Insumos médicos: \$200.00
- ❖ Pruebas de laboratorio: \$150.00

- ❖ Patólogo: \$400.00

- ❖ Gastos de alimentación y transporte: \$400.00

- ❖ Imprevistos: \$800.00

Resumen de presupuesto.

| | |
|-------------------------------------|----------------|
| Animales de experimentación | \$153 |
| Medicamentos | \$435 |
| Pruebas de laboratorio | \$150 |
| Insumos médicos | \$200 |
| Patólogo | \$400 |
| Gastos de alimentación y transporte | \$400 |
| Improvistos | \$800 |
| TOTAL | \$2,538 |

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1 Legrand M, Mik E, Johannes T, Payen D, Ince C. Renal Hypoxia and Dysoxia After Reperfusion of the Ischemic Kidney. *Mol Med.* Jul–Aug 2008; 14(7-8): 502–16. (Consultado en: Febrero 2009). Disponible en la World Wide Web en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2386087>.

2 Kellum J MD, FCCM. Acute kidney injury. *Crit Care Med.* Abril 2008; Vol. 36(4) (Suppl.) (Consultado en: Febrero 2009). Disponible en la World Wide Web en: http://hinari-gw.who.int/whalecomovidsp.tx.ovid.com/whalecom0/spb/ovidweb.cgi?&S=FLOMFPMOIJDDGCHNCFLECKFGMIAA00&Link+Set=S.sh.15.16.21.48|1|sl_10

3 Mejía-Vilet J, Ramírez V, Cruz C, Uribe N, Gamba G, Bobadilla N. Bobadilla J. Renal ischemia-reperfusion injury is prevented by the mineralocorticoid receptor blocker spironolactone. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007; 293:78-86. (Consultado en: Febrero 2009). Disponible en la World Wide Web en: <http://ajprenal.physiology.org/cgi/reprint/293/1/F78.pdf>

4 Hourmant M. Renal Isquemia Reperfusion Syndrome. *Nephrologie.* 1999; 20(7): 371-5. (Consultado en: Febrero 2009). Disponible en la World Wide Web en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10642985>

5 Rodríguez Iturbe B, Fernández L. Apoptosis en enfermedades renales. *Nefrología.* 1997; 17 (6). (Consultado en: Febrero 2009). Disponible en la World Wide Web en: <http://www.revistanefrologia.com/mostrarrevista.asp?id=145>

6 Hoyos W, Lopez R, Medina I, Ramos J, Garcia Z, Lopez S. Dimethyl Sulphoxide administration decreases renal ischemic-reperfusion injury. *J Critical Care.* Marzo 2009; 13 (1): 366 doi: 10.1186/cc7530 (Consultado en: Abril 2009).

7 Clarkson M, Friedewald J, Eustace J, Rabb H. Acute Kidney Injury. En Brenner B, Levine S. Brenner and Rector's: The Kidney. 8 ed. China: Elsevier, 2008. P. 943-75 Mexico: Interamericana; 1994. p.179-184.

8 Agraharkar M MD, MBBS, FACP. Acute Renal Failure. *EMEDICINE WebMD.* Sept 2007. (Consultado en: Febrero 2009). Disponible en la World Wide Web en: <http://emedicine.medscape.com/article/243492-overview>

9 Ricci Z, Cruz D, Ronc C. The RIFLE Criteria and Mortality in Acute Kidney Injury: A systematic review. *Kidney Int.* Marzo 2008; 73 (5): 538–46. (Consultado en: Febrero 2009). Disponible en la World Wide Web en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18160961?dopt=AbstractPlus>

10 Bellomo R, Ronco C, Kellum J, Mehta R, 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. (Consultado en: Febrero 2009). Disponible en la World Wide Web en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=522841>

11 D'Agati V MD, Jannette J MD, Silva F MD. Atlas of Nontumor Pathology: Non-Neoplastic Kidney Diseases. Primera edición. ARP Press, Washington DC, USA. 2005. Capítulo 19: 517-46. (Consultado en: Febrero 2009).

12 Bagshaw S MD MSc, FRCPC, Gibney R MB, FRCP(C). Conventional markers of kidney function. *Crit Care Med.* Abril 2008; 36 (4): S152-58. (Consultado en: Febrero 2009). Disponible en la World Wide Web en:

http://journals.lww.com/ccmjournal/Abstract/2008/04001/Conventional_markers_of_kidney_function.3.aspx

13 Coca S, Yalavarthy R, Concato J, Parikh C. Biomarkers for the diagnosis and risk stratification of acute kidney injury: A systematic review. *Kidney International*. 2008; 73: 1008-16. (Consultado en: Febrero 2009). Disponible en la World Wide Web en: <http://www.nature.com/ki/journal/v73/n9/abs/5002729a.html>

14 Kosieradzki M, Rowinski W. Ischemia/Reperfusion injury in Kidney Transplantation: Mechanisms and Prevention. *Transplant Proc*. Diciembre 2008; 40 (10): 3279-88. (Consultado en: Febrero 2009). Disponible en la World International Web en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19100373>

15 Ramírez P, Marín J, Piñero A, Chávez-Cartaya R, Parrilla P. Investigación experimental aplicada a la clínica: isquemia-reperusión hepática. *Cirugía Española*. 2000; 67 (3): 281-91. (Consultado en: Febrero 2009). Disponible en la World International Web en: http://www.doyma.es/revistas/ctl_servlet?_f=7064&ip=190.87.212.51&articuloid=10017&revistaid=36

16 Welbourn C, Golman G, Paterson I, Valeri C, Shepron D, Hechtman H. Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: Central role of the neutrophil. *Br J Surg*; Junio 1991, Vol. 7 (6): 651-55. (Consultado en: Febrero 2009). Disponible en la World Wide Web en: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/112199945/abstract>

17 Romanique U, Uribe M, Videla L. Mecanismos moleculares en el Daño por Isquemia-Reperusión Hepática y el Precondicionamiento Isquémico. *Revista Médica de Chile*. Abril 2005; 133 (4): 469-76. (Consultada en: Febrero 2009). Disponible en la World Wide Web en: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/112199945/abstract>

18 Turrens J. Mitochondrial Formation of Reactive Oxygen Species. *Journal Physiol*. Octubre 2003; 552: 335-344. (Consultada en: Febrero 2009). Disponible en la World Wide Web en: <http://jp.physoc.org/content/552/2/335.short?rss=1&ssource=mfc>

19 Araujo M, Welch W. Oxidative Stress and Nitric Oxide in Kidney Function. *Current Opinion Nephrology and Hypertension*. Enero 2006; 15 (1): 72-77. (Consultado en: Febrero 2009). Disponible en la World Wide Web en: http://journals.lww.com/co-nephrolhypertens/Abstract/2006/01000/Oxidative_stress_and_nitric_oxide_in_kidney.13.aspx

20 Lopez-Neblina F, Toledo AH, Toledo-Pereyra LH. Trauma, Surgery Research, and Molecular Biology, Borgess Research Institute, Kalamazoo, Michigan 49048, USA. *J Invest Surg*. 2005 Nov-Dec;18(6):335-50. (Consultado en: Febrero 2009). Disponible en la World Wide Web en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16319055>

21 Stevens A, Lowe J. *Anatomía Patológica*. Segunda edición. Ediciones Harcourt (Edición en español), Madrid España. 2001. Capítulo 2: 7-22. (Consultado en: Febrero 2009).

22 G Majno and I Joris. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*. 1995 Jan;146(1):3-15. (Consultado en: Febrero 2009). Disponible en la World Wide Web en: <http://hinari-gw.who.int/whalecomajp.amjpathol.org/whalecom0/cgi/content/abstract/146/1/3>

23 Suzuki K.; Kostin S.; Person V.; Elsässer A.; Schaper J. Time Course of the Apoptotic Cascade and Effects of Caspase Inhibitors in Adult Rat Ventricular Cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, Volume 33, Number 5, May 2001 , pp. 983-994(12) (Consultado en: Febrero 2009). Disponible en la World Wide Web en: http://hinari-gw.who.int/whalecomwww.sciencedirect.com/whalecom0/science?_ob=PublicationURL&tokey=%23TOC%236898%232001%23999669994%23286650%23FLP%23&_cdi=6898&_pubType=J&_auth=y&_acct=C000049744&_version=1&_urlVersion=0&_userid=2778716&md5=533b49b0e2054f956939c6f2293129db

24 Saraste A. Morphologic criteria and detection of apoptosis. *Herz*. 1999 May;24(3):189-95. (Consultado en: Febrero 2009). Disponible en la World Wide Web en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10412642>

25 Henery S, George T, Hall B, Basiji D, Ortyrn W, Morrissey P. Quantitative image based apoptotic index measurement using multispectral imaging flow cytometry: A comparison with standard photometric methods. *Apoptosis*. 2008 Aug;13(8):1054-63. (Consultado en: Febrero 2009). Disponible en la World Wide Web en: <http://hinari-gw.who.int/whalecomwww.springerlink.com/whalecom0/content/h024177581150t35/fulltext.html>

26 Kirschner RE, Fantini GA. Role of iron and oxygen-derived free radicals in ischemia-reperfusion injury. *J Am Coll Surg*. 1994 Jul;179(1):103-17. (Consultado en: Febrero 2009). Disponible en la World Wide Web en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8019714>

27 Schiller, Henry J. MD; Reilly, Patrick M. MD; Bulkley, Gregory B. MD, FACS. Antioxidant therapy. *Crit Care Med* 1993; 21: S92-S102. (Consultado en: Febrero 2009). Disponible en la World Wide Web en: <http://journals.lww.com/ccmjjournal/pages/articleviewer.aspx?year=1993&issue=02001&article=00016&type=abstract>

28 Grace, P.A. Ischaemia-reperfusion injury. *J Surg* 1994; 81: 637-647. (Consultado en: Febrero 2009). Disponible en la World Wide Web en: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/112190315/abstract>

29 Stanley W. Jacob and Robert Herschler. Pharmacology of DMSO. Departemt of Surgery. Oregon Health Science University. Portland, Oregon 97201. (Consultado en: Febrero 2009). Disponible en la World Wide Web en: <http://www.dmsu.org/articles/information/herschler.htm>

30 Nuno C. Santos, J. Figueira-Coelho, J. Martins-Silva, Carlota Saldanha. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: Pharmacological, celular and molecular aspects. *Bioch. Pharm.* 65 (2003) 1035-1041 (Consultado en: Febrero 2009). Disponible en la World Wide Web en: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T4P-47T1YNM-4&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_searchStrId=998934213&_rerunOrigin=scholar.google&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=67ee679533dc372ee9071cd9828a729f

31 Natural Standard Monograph. Serie online (Consultado en: Febrero 2009). Disponible en el World Wide Web en: <http://www.naturalstandard.com/index-abstract.asp?create-abstract=/monographs/foreignlanguage/herbssupplements/patient-dimethylsulfoxide-sp.asp>

32 Gaylord Chemical Company, LLC, "Dimethyl Sulfoxide (DMSO) Health and Safety Information", Bulletin 106, Oct 2007. (Consultado el 5 de Febrero del 2009) Disponible en la World Wide Web en: <http://www.gaylordchemical.com/bulletins/bulletin106b/Bulletin106B.pdf>.

33 Kedar I, Jacob E, Bar-Natan N, Ravid M. Dimethyl Sulfoxide in acute ischemia of the kidney. *Ann. NY Am. Scien.* 1983; 411: 131-134. (Consultado en Febrero 2009). Disponible en la World Wide Web:

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6576689?ordinalpos=&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.SmartSearch&log\\$citationsensor](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6576689?ordinalpos=&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.SmartSearch&log$citationsensor)

34 Linas S, Whittenburg D, Repine J. O₂ metabolites cause reperfusion injury after short but not prolonged renal ischemia. *Am J Physiol.* Oct 1987; 253 (4 Pt 2): F685-91. (Consultado en: Febrero 2009). Disponible en la World Wide Web: <http://ajprenal.physiology.org/cgi/content/abstract/253/4/F685>

35 Kojima M, Iwakiri R, Wu B, Fujise T, Watanabe K, Lin T, et. al. Effects of antioxidative agents on apoptosis induced by ischaemia-reperfusion in rat intestinal mucosa. *Aliment. Pharmacol Ther.* Jul 2003; 18 (1): 139-45. (Consultado en: Febrero 2009). Disponible en la World Wide Web en: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/118880550/abstract>

36 García-Aguirre J, Quiroz M, Rodríguez R, Larriva S. Análisis histopatológico del efecto del dimetil-sulfóxido (DMSO) en un modelo experimental de isquemia retiniana. *Rev Mex. Oftalmol.* 2008; 82 (1): 1-4. (Consultado en: Febrero 2009). Consultado en la World Wide Web en: <http://new.medigraphic.com/cgi-bin/resumenMain.cgi?IDARTICULO=17480&IDPUBLICACION=1786&IDREVISTA=87>

37 Sahin M, Avsar F, Ozel H, Topaloglu S, Yilmaz B, Pasaoglu H, et al. The efectos of dimethyl Sulfoxide on liver damage caused by ischemia-reperfusion. *Transplant Proc.* Nov 2004; 36 (9): 2590-2. (Consultado en: Febrero 2009). Disponible en la World Wide Web en: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6VJ0-4F3NCH1-N&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=30ae00835ffca331644098c9e19f82f2

38 Nagel S, Genius J, Heiland S, Horstmann S, Gardner H, Wagner S. Diphenyleniodonium and dimethylsulfoxide for treatment of reperfusion injury in cerebral ischemia of the rat. *Brain Res.* Feb 2007; 1132 (1): 210-7. (Consultado en: Febrero 2009). Disponible en la World Wide Web en: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17184751?ordinalpos=&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.SmartSearch&log\\$citationsensor](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17184751?ordinalpos=&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.SmartSearch&log$citationsensor)

39 Carpenter R, Angel M, Morgan R. DMSO (Dimethyl Sulfoxide). Dimethyl Sulfoxide Increases the Survival of Primarily Ischemic Island Skin Flaps. (Consultado en: Febrero 2009). Disponible en la World Wide Web: <http://www.dmsol.org/articles/skin/ischem.htm>

40 Koksall C, Bozkurt A, Cangel U, Ustundag N, Konukoglu D, Musellim B et al. Attenuation of ischemia/reperfusion injury by N-acetylcysteine in a rat hind limb model. *J Surg Res.* Mayo 2003; 111(2): 236-9. (Consultada en: Febrero 2009). Disponible en la World Wide Web en: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12850468?ordinalpos=&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.SmartSearch&log\\$citationsensor](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12850468?ordinalpos=&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.SmartSearch&log$citationsensor)

41 Kim M, Akera T. O₂ free radicals: Cause of ischemia-reperfusion injury to cardiac Na⁺-K⁺-ATPase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Feb 1987; 252 (2 Pt 2): H252-7. (Consultada en: Febrero 2009) Disponible en la World Wide Web en: <http://ajpheart.physiology.org/cgi/content/abstract/252/2/H252>

42 De La Torre J. Spinal Cord Injury: Review of Basic and Applied Research. *Spine.* July/August 1981; 6(4): 315-35. (Consultado en: Febrero 2009). Disponible en la World Wide Web en: http://journals.lww.com/spinejournal/Abstract/1981/07000/Spinal_Cord_Injury_Review_of_Basic_and_Applied.1.aspx

43 Rao C. Differential effects of detergents and dimethyl sulfoxide on membrane prostaglandin E, and F, receptors. *Life Sci.* 1997; 20: 2013-2022. (Consultado en: Febrero 2009). Disponible en la World Wide Web en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/196146>

44 Baar fM, Sally C, Delaney K, Kilborn S, Kingman J, Ripley J, et al, CCAC Guidelines on: procurement of animals used in science, 2007; (Consultado en febrero 2009). Disponible en la World Wide Web en: http://www.ccac.ca/en/CCAC_Programs/Guidelines_Policies/PDFs/Procurement_Guidelines_EN.pdf

45 Consejo canadiense de Proteccion de Animales, Manual sobre el cuidado y el uso de animales de experimentación Vol.1, 1998. (Consultado en Febrero de 2009). Disponible en la World Wide Web en http://www.ccac.ca/en/CCAC_Programs/Guidelines_Policies/GUIDES/SPANISH/toc_v1.htm

46 Martínez M. A. Anestesia Inhalatoria en Conejos. Argos. Portal Veterinario. Mayo 2009. (Consultado en: Junio del 2009). Disponible en la World Wide Web: <http://argos.portalveterinaria.com/noticia.asp?ref=2428>

47 Nishiitsutsuji-Uwo J. M., Ross B. D. and Krebs H. A. Metabolic activities of the isolated perfused rat kidney. *Biochem J.* 1967; 103(3): 852-62. (Consultado en: Febrero del 2009). Disponible en la World Wide Web en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1270491>

48 Wagner M, Cadetg P, Ruf R, Mazzucchelli L, Ferrari P and A Redaelliet C. Heme oxygenase-1 attenuates ischemia/reperfusion-induced apoptosis and improves survival in rat renal allografts. *Kidney International.* 2003; 63:1564-73. (Consultado en: Febrero 2009). Disponible en la World Wide Web en: <http://www.nature.com/ki/journal/v63/n4/full/4493589a.html>

49 American Veterinary Medical Association Guidelines on Euthanasia. Junio 2007 (Consultado en: Abril de 2009) Disponible en la World Wide web en: http://www.avma.org/issues/animal_welfare/euthanasia.pdf

50 Gobé G, Willgoss D, Hogg N, Schoch E, Endre Z. Cell survival or death in renal tubular epithelium after ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int* 1999; 56(4):1299-304. (Consultado en: Febrero del 2010). Disponible en la World Wide Web en: <http://www.nature.com/ki/journal/v56/n4/full/4491040a.html>

51 Rana A, Sathyanarayana P, and Lieberthal W. Role of apoptosis of renal tubular cells in acute renal failure: Therapeutic implications. *Apoptosis* 2001 6(1-2): 83-102(Consultado en: Febrero del 2010). Disponible en la World Wide Web en: <http://www.springerlink.com/content/x083206pq5511145/>

52 Doi K, Suzuki Y, Nakao A, Fujita T, Noiri E. Radical scavenger edaravone developed for clinical use ameliorates ischemia//reperfusion injury in rat kidney. *Kidney Int.* 2004;65(5):1714-1723. (Consultado en: Febrero del 2010). Disponible en la World Wide Web en: <http://www.nature.com/ki/journal/v65/n5/abs/4494458a.html>

53 O'Donnell MP, Burne M, Daniels F, Rabb H. Utility and limitations of serum creatinine as a measure of renal function in experimental renal ischemia-reperfusion injury. *Transplantation.* 2002 Jun 15;73(11):1841-1844. Consultado en: Febrero 2010). Disponible en la World Wide Web en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12085012>

54 Kocoglu H, Ozturk H, Ozturk H, Yilmaz F, Gulcu N. Effect of Dexmedetomidine on Ischemia-Reperfusion Injury in Rat Kidney: A Histopathologic Study. *Renal Failure.* 2009;31(1):70(Consultado en: Febrero del 2010). Disponible en la World Wide Web en: <http://www.informaworld.com/smpp/content~content=a907768103&db=all>