



ORIGINAL

Alteraciones morfológicas en riñones de ratas sometidos a isquemia reperusión

E. Padilla-Rodríguez^a, E. Vidor-Guerra^{b,*}, M. Betancourt-Valladares^c, M. Guerrero-Betancourt^d, D. Ramírez-Brizuela^e

^a Universidad de Ciencias Médicas Las Tunas, Cuba

^b Universidad de Ciencias Médicas de Camagüey "Carlos J. Finlay". Facultad de Medicina, Cuba

^c Universidad de Ciencias de Camagüey "Carlos J. Finlay". Facultad de Estomatología, Cuba

^d Universidad de Ciencias de Camagüey "Carlos J. Finlay". Facultad de Medicina, Cuba

^e Universidad de Ciencias. Camagüey, Cuba

*Autor para correspondencia: Especialista del primer grado en Fisiología normal y patológica. Máster en medicina natural y bioenergética. Profesora asistente. Universidad de Ciencias Médicas de Camagüey "Carlos Juan Finlay". Facultad de Medicina, Cuba. Correo electrónico: vidor@iscmc.cmw.sld.cu

Recibido: 17 de junio de 2016

Aceptado: 29 de septiembre de 2016

PALABRAS CLAVE

fracción de
área, fracción
de elemento,
glomérulos.

Resumen

Fundamento: La isquemia reperusión renal es un proceso en donde se involucra una serie de eventos que pueden conducir al daño y muerte celular. Objetivo: Determinar las modificaciones morfológicas que se producen en el riñón a medida que progresa el tiempo en el proceso de isquemia reperusión. Métodos: Se utilizó como muestra un grupo de 35 ratas Wistar, machos, que fueron divididos en cinco grupos de siete ratas cada uno. Al subgrupo que no se le provocó isquemia se le denominó control (C) y al resto se les nombró experimentales (E). El subgrupo experimental E- I fue sometido a 15 minutos de isquemia, el E-II a 30 minutos, el E-III a 45 minutos y el E-IV a una hora. Luego se tomaron muestras de tejido renal para estudio morfométrico. Resultados: Se produjo una reducción significativa del número de glomérulos y de la fracción de área ocupada por estos tras isquemia reperusión temporal de 15 minutos (E-I), la que parece ser reversible por la ligera mejoría observada tras 30 minutos (E-II) a partir del cual sigue recayendo hasta después de una hora de isquemia reperusión (E-IV). Conclusiones: La combinación de isquemia con reperusión supera el tiempo crítico para provocar lesión irreversible celular del tejido renal.

KEYWORDS

area fraction,
fraction of element
glomerulo.

Morphological changes in kidneys of rats subjected ischemia reperfusion

Abstract

Background: renal ischemia reperfusion is a process that involves a series of events that can lead to cell damage and death. **Objective:** To determine the morphological changes that occur in the kidney as time progresses in the process of ischemia reperfusion. **Methods:** Used as showing a group of 35 male Wistar rats. This group of animals was divided into five groups of seven rats each. The subgroup that will not cause ischemia it was called control (C) and the rest of the subgroups were called experimental (E). E- experimental subgroup I was subjected to 15 minutes of ischemia, the E-II to 30 minutes, the E-III to 45 minutes and the E-IV one hour. After renal tissue samples were taken for morphometric study. **Results:** There was a significant reduction in the number of glomerulo and the area fraction occupied by these temporary ischemia reperfusion after 15 minutes (EI), which seems to be reversible by the slight improvement observed after 30 minutes (IBD) from the which continues to fall until after an hour of ischemia reperfusion (EIV). **Conclusions:** The combination of ischemia and reperfusion exceeds the critical time to cause irreversible cell renal tissue injury.

Introducción

La isquemia reperfusion renal es un proceso clínicamente importante involucrado en varias enfermedades. La depresión energética que este proceso produce es el responsable de una cascada de eventos bioquímicos que conducen a la disfunción celular, al daño subletal y eventualmente a la muerte. Estudios realizados y publicados por Allen y Bayraktutan⁴ en la revista International Journal of Stroke sobre la fisiopatología del estrés oxidativo y el daño que produce en el cerebro, recopilaron las principales evidencias de los últimos años, que vinculan las especies reactivas del oxígeno con los mecanismos fisiopatológicos que se presentan como resultado del proceso isquemia reperfusion que ellos expresaron. Los niveles excesivos de especies reactivas son actores importantes en la lesión por isquemia reperfusion. La exposición de las células renales al estrés oxidativo influye en la progresión de las enfermedades renales, éste aparece en células y tejidos cuando se rompe el equilibrio que existe entre sustancias prooxidantes y antioxidantes a favor de las primeras¹⁻³.

Los parámetros morfométricos son una herramienta que permiten la mejor comprensión de procesos patológicos como son la inflamación-reparación, las atrofas, las hipertrofas y las hiperplasias, entre otros, evidenciando las relaciones entre los procesos de desarrollo-forma y estructura-función, motivos de estudio en el diagnóstico diario del anatomopatólogo.

Evaluar las modificaciones morfológicas que se producen a medida que progresa el tiempo en el proceso de isquemia reperfusion mediante novedosas técnicas morfométricas motivó la realización de esta investigación desarrollada en un modelo experimental de isquemia reperfusion renal en ratas. La evaluación de las alteraciones morfológicas del riñón sometida a isquemia reperfusion permitirá como objetivo: determinar el tiempo mínimo de lesión irreversible de las células renales que conlleva a una insuficiencia renal.

Método

Se realizó un estudio morfométrico donde se utilizó como muestra un grupo de 35 ratas Wistar, machos, supuestamente sanas procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) Habana, Cuba, con un peso de 180 +/- cinco gramos. Estos animales fueron mantenidos durante todo el estudio en condiciones de temperatura y humedad controlados según las normas éticas establecidas, incluyendo ciclos de luz-oscuridad, con alimentación y agua ad libitum. Las ratas se alimentaron diariamente con 25 g de pienso normal (dieta estándar CENPALAB).

Este grupo de animales fue dividido en cinco grupos de siete ratas cada uno. Al subgrupo que no se le provocó isquemia se le denominó control (C) y al resto se les nombró experimentales (E), los cuales fueron sometidos al mismo grado de isquemia utilizando un dispositivo de cierre en las arterias renales. La diferencia entre los cuatro subgrupos consistió en el tiempo de duración de la isquemia. El subgrupo experimental E- I fue sometido a 15 minutos de isquemia, el E-II a 30 minutos, el E-III a 45 minutos y el E-IV a una hora, inmediatamente después de transcurrido el periodo de isquemia se retiró el clan para provocar reperfusion, a cada animal se le realizó aclaramiento plasmático de inulina para medir intensidad de filtrado glomerular a través del método multicompartmental. La inulina se utiliza para medir intensidad de filtrado glomerular porque es una sustancia que se filtra, no se secreta, ni se reabsorbe por lo que su aclaramiento dará el valor exacto del filtrado glomerular. Luego se tomaron muestras de tejido renal para estudio morfométrico, se utilizaron 70 muestras de riñones derechos e izquierdos, 14 de las cuales pertenecieron al grupo control, el resto fueron divididas en grupos de 14 pertenecientes a cada grupo experimental (EI, EII, EIII, EIV) que fue sometido a isquemia reperfusion. Para realizar las mediciones se utilizó un sistema de testaje (la retícula) compuesto por 88 puntos que representa 17 248 μm^2 . Las imágenes se obtuvieron a través de un microscopio estereoscópico Mbc-10 con cámara digital DCM500 adosada con una resolución de 5 megapíxeles⁴⁻⁷. Se realizó la superposición del testaje en cuatro campos de la imagen calculada por riñón de los 7 animales por grupos, lo que representa 28 campos por grupos de estudio, se tomaron en consideración los puntos que se superpusieron sobre los glomérulos renales, los que fueron contados sirviendo de base para el cálculo de la fracción de elemento y la fracción de área, las cuales se definen de la siguiente forma:

• Fracción de elemento (fe): total de elementos que se observan en un campo de estudio. En esta investigación el elemento lo constituyen los glomérulos y se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$Fe = TPe / TPc$$

Donde: TPe es total de puntos contados en los elementos, TPc es total de puntos de la cuadrícula (88puntos)

• Fracción de área (Af): la proporción de área que ocupa un elemento en un área predeterminada de estudio. Su fórmula es:

$$Af = Fe \times Ac$$

Donde: Ac es el área asignada al punto (96 μm^2)

Análisis estadístico: Los procedimientos se realizaron según lo aprobado por los comités internacionales para el cuidado de los animales, de acuerdo con las normas éticas establecidas para la experimentación animal (ICILAS, 2000). Después de realizado el estudio en los laboratorios de Ciencias Fisiológicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Ciencias Médicas de Camagüey y en el laboratorio del Policlínico Centro, y obtenido los resultados de cada una de las variables, se llenó la base de datos creada en el programa estadístico Microsoft Office Excel 2007, de lo cual resultaron las tablas plasmadas en la investigación, para resumir la información de las variables se utilizaron medidas de resumen y dispersión como la media y la desviación estándar. Se utilizó para el análisis el paquete estadístico SPSS para Windows. La información fue procesada utilizando el MedCalc versión 4.16g-Windows 95. Se realizó prueba de hipótesis donde se utilizó test de student y probabilidad.

Resultados

La tabla 1 expresa el valor promedio y la desviación estándar de la fracción de elemento (glomérulos) y de fracción de área que éstos ocupan en los riñones derechos de cada grupo, observándose una clara disminución del elemento y del área del glomérulo, que no es muy apreciable entre los grupos de estudio, pero sí significativo entre el grupo control y los grupos de 15 y 60 minutos con una aparente recuperación del grupo de 30 minutos.

Tabla 1. Fracción de glomérulo y fracción de área de glomérulo en riñones derechos sometidos a isquemia reperfusion.

Grupos	Fracción de elemento		Fracción de área	
	Promedio	Desv. stand	Promedio	Desv. stand
Control	0,0832	0,0207	0,0163	0,0041
15 minutos	0,0349	0,0113	0,0069	0,0022
30 minutos	0,0410	0,0080	0,0080	0,0027
45 minutos	0,0316	0,0062	0,0127	0,0025
60 minutos	0,0345	0,0068	0,0083	0,0016

Fuente: experimento N=35 fracción de elemento: (μm^2) fracción de área: (μm^2) fracción de elemento: (μm^2), fracción de área: (μm^2).

La tabla 2 corresponde a la prueba de hipótesis para los riñones derechos donde se utiliza el test de student y la probabilidad, entre el grupo control y cada uno de los grupos experimentales resultando estadísticamente significativa mostrando que existe mayor fracción de elemento y de área en el grupo control que en los experimentales.

Tabla 2. Prueba de hipótesis riñones derechos.

Grupos	Control			
	Fracción elemento		Fracción área	
	T	P	T	P
15 minutos	5,419	0,0002	5,345	0,0002
30 minutos	5,013	0,0003	4,473	0,0008
45 minutos	6,318	0,0001	1,98	0,05
60 minutos	5,914	0,0001	4,809	0,0004

Fuente: experimento N=35 t: Test de student P: Probabilidad

La tabla 3 corresponde al análisis del valor promedio y la desviación estándar de la fracción de elemento (glomérulo) y de área que estos ocupan en los riñones izquierdos de cada grupo experimental presentando un comportamiento muy similar al de los riñones derechos, mostrando la reducción de la fracción de glomérulos y del área que estos ocupan, muy significativos entre el grupo control y el de los 15 y 60 minutos, con ligera recuperación morfológica en este caso de los grupos de 30 y 45 minutos.

Tabla 3. Fracción de glomérulos y fracción de área de glomérulos en riñones izquierdos sometidos a isquemia reperfusion.

Grupos	Fracción de elemento		Fracción de área	
	Promedio	Desv. stand	Promedio	Desv. stand
Control	0,0836	0,0164	0,0213	0,0042
15 minutos	0,0304	0,0027	0,0060	0,0005
30 minutos	0,0406	0,0080	0,0080	0,0041
45 minutos	0,0406	0,0080	0,0092	0,0018
60 minutos	0,0313	0,0061	0,0088	0,0017

Fuente: experimento N=35 fracción de elemento: (μm^2) fracción de área: (μm^2)

La tabla 4 corresponde a la prueba de hipótesis para los riñones izquierdos donde se utiliza el test de Student y la probabilidad, entre el grupo control y los demás grupos experimentales resultando estadísticamente significativa al mostrar que existe mayor fracción de elemento y de área en el grupo control que en los grupos experimentales.

Tabla 4. Prueba de hipótesis riñones izquierdos.

Grupos	Control			
	Fracción de elemento		Fracción de área	
	T	P	P	P
15 minutos	8,469	0,0001	0,0001	0,0001
30 minutos	6,235	0,0001	0,0001	0,0001
45 minutos	6,235	0,0001	0,0001	0,0001
60 minutos	7,908	0,0001	0,0001	0,0001

Fuente: experimento N=35 t: Test de student P: Probabilidad

Discusión

En la investigación que se presenta existen variaciones morfológicas en los riñones derechos a los 15 minutos de provocada la isquemia y al comienzo de la reperfusion, en los cuales disminuyen la cantidad de glomérulos y el área que estos ocupan en el campo de estudio. Si bien, no existen variaciones significativas entre los grupos experimentales en el tiempo sí es apreciable con respecto al control corroborándose en el análisis estadístico. Las consecuencias morfológicas de la lesión por isquemia reperfusion fueron similares en los riñones izquierdos.

Autores como Cotran, Kumar, Collins y Robbins¹ plantean que la pérdida de la fosforilación oxidativa que se produce en el proceso de isquemia, inmediatamente torna más lenta o detiene la generación de ATP. La falta de fuentes de energía provoca trastornos de la conservación de las membranas celulares y se

dificulta la actividad de las enzimas relacionadas, de la índole de la ATPasa, lo cual origina aumento de la permeabilidad de la membrana. Los balances intracelulares de iones y líquidos dependen de manera exquisita de un suministro ininterrumpido de energía, cuando ésta experimenta agotamiento, la bomba de sodio se enteltea o deja de actuar, ingresando el sodio continuamente a la célula, no pudiendo ser bombeado al exterior adecuadamente; de ésta manera la célula sufre tumefacción desplazando y destruyendo muchos de los glomérulos⁹. Curtis¹⁴ explica que el lesión renal asociada a isquemia-reperusión es un proceso dinámico que implica daño en la vasculatura y los túbulos alterándose el oxígeno y los nutrientes a la célula epitelial, y la célula epitelial lesionada responderá mediante la producción de factores autocrinos que afectan su propia supervivencia se acumulan leucocitos y se produce descomposición del citoesqueleto, necrosis, descamación de las células viables, obstrucción tubular corroborando lo encontrado en esta investigación, incluso sólo a 15 minutos de isquemia ya se evidencia pérdida de glómerulos. Los cambios morfológicos en ambos riñones a los 30 minutos de isquemia no resultan tan evidentes como a los 15 minutos, lo que sugiere cierta recuperación o reversión del daño tisular observado inicialmente; lo que pudiera deberse al aporte del ATP procedente de la glucólisis anaerobia. En circunstancias de isquemia algunas células pueden volver a la glucólisis anaerobia, lo que en parte sostiene la concentración de ATP aunque no durante mucho tiempo corroborado por Vidor en su estudio² Investigaciones realizadas por González et al¹¹⁻¹³ plantean que el proceso de isquemia reperusión en los riñones produce daño a nivel de los túbulos renales. Hernández Iglesias et al⁸ en su estudio histopatológico describe que el proceso de isquemia reperusión produce pérdida del ribete en cepillo, dilatación tubular, necrosis de las células epiteliales, la formación de cilindros en la luz tubular constituyendo marcadores morfológicos de daño renal, Serviddio et al¹⁰ describe que la isquemia transitoria conduce a un patrón heterogéneo de daño a los tejidos en el riñón que un corto periodo de isquemia (<45 min) produce daños irreversibles en los segmentos distales de los túbulos proximales, mientras que los segmentos más proximales sufren lesiones reversibles. Aunque el presente estudio no consistió en el análisis de los organitos celulares y tampoco describe los cambios a nivel tubular, sí constata que después de los 30 minutos de isquemia con reperusión sobreañadida comienza a existir daño sin recuperación evidente en las células de los glomérulos, destruyéndolos y disminuyendo así el número y la fracción de área que ocupan estos en cada uno de los campos estudiados; sugiriendo que la combinación de isquemia con reperusión ha superado el tiempo crítico para provocar lesión irreversible.

Transcurridos los periodos isquémicos de 45 minutos y una hora, superado el tiempo crítico para la aparición de lesiones hipóxicas irreversibles a nivel renal se produjo una reducción notable de glomérulos además del daño que sobre éstos produce la reperusión, lo que se corresponde con lo descrito en investigaciones clínicas realizadas por Bağcık E et al¹⁵ referidas a enfermedades renales de naturaleza isquémica. Los cambios moleculares y morfológicos descritos son imprescindibles para comprender las lesiones por isquemia, durante la cual el ATP se degrada en las células endoteliales y parenquimatosas a adenosín difosfato (ADP) y adenosín monofosfato (AMP). Las células epiteliales son relativamente impermeables a estos nucleótidos. Si la falta de oxígeno se prolonga el AMP se metaboliza a nucleósidos e hipoxantina. Estas purinas sí pueden difundir al exterior de las células renales isquémicas. Lo que provoca una pérdida de metabolitos de reserva para la resíntesis de ATP. Se han detectado altas concentraciones de hipoxantina tanto en la sangre venosa como en tejido renal. Además se produce una redistribución del hierro almacenado hacia formas de

mayor disponibilidad.¹ La reducción significativa que se produjo del número de glomérulos y de la fracción de área ocupada por estos tras isquemia temporal de 15 minutos y comienzo de la reperusión, la que parece ser reversible por la ligera mejoría observada tras 30 minutos a partir del cual sigue recayendo hasta después de una hora de isquemia renal y la existencia de una mayor fracción de glomérulos y del área que éstos ocupan en el grupo control que en los grupos experimentales pueden responder a la reperusión que se produjo antes de la extracción de los riñones durante el tiempo en el que transcurrió el aclaramiento plasmático. La misma no produce una protección frente a la falta de oxígeno, sino que conlleva a una lesión adicional en parte por la acumulación masiva de calcio en las mitocondrias, lo cual induce la apertura de un poro inespecífico transmembranal que lleva al desacoplamiento de la fosforilación oxidativa¹⁶. Por otro lado, en el riñón isquémico hay producción de hipoxantina, sustrato que cuando se restablece la oxigenación contribuye a la formación de ERO que provocan mayor daño hístico a nivel renal. Otro mediador proinflamatorio con acción directa a nivel del riñón, liberado durante el fenómeno de isquemia-reperusión es la endotelina-1, potente vasoconstrictor capaz de producir importante disminución del filtrado glomerular y alteraciones en la función tubular¹⁷⁻²⁰.

Conclusiones Se produjo una reducción significativa del número de glomérulos y de la fracción de área ocupada por estos tras isquemia reperusión temporal de 15 minutos (EI), la que parece ser reversible por la ligera mejoría observada tras 30 minutos (EII) a partir del cual sigue recayendo hasta después de una hora de isquemia reperusión (EIV). Existió una mayor fracción de elemento y de área en el grupo control que en los grupos experimentales. La función renal decreció a partir de los 30 minutos de isquemia reperusión de forma progresiva.

Bibliografía

1. Cotran, Kumar, Collins, Robbins. Patología estructural y funcional. 5 ed., Madrid, España: Editorial McGraw-HILL. Interamericana; 1999 p. tomo I. 12-15
2. Vidor Guerra E, García López V, Betancourt Valladares M, Barrera López OL, y del Risco Turiño C. Consecuencias funcionales en riñones de ratas sometidos a isquemia. Rev Cubana Invest Bioméd. 2006; 25(4).
3. Regueira T, Andresen M, Mercado M, Downey P. Fisiopatología de la insuficiencia renal aguda durante la sepsis. Med Intensiva. 2011; 35(7): 424-32.
4. Allen CL, Bayraktutan U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. International Journal of Stroke. 2009; 4:461-70.
5. Puchades Montesa MJ, González Rico MA, Solís Salguero MA, Torregrosa Maicas I., Tormos Muñoz M.C., Sáez Tormo G. Estudio del estrés oxidativo en enfermedad renal avanzada. Nefrología. 2009; 29(5):464-473 | doi:10.3265/Nefrología.2009.29.5.5493. en.full
6. Resco Zequeira M, Rodríguez Rodríguez M, Sánchez Rodríguez IO, Vega González MS, Caracterización morfoestereológica de la citología del Fibroadenoma de mama. Primer congreso virtual de Ciencias Morfológicas. Noviembre 2012
7. Sanz Pupo NJ, Ríos Hidalgo N, Seguí Sánchez M, Díaz Rojas PA, Fernández Sarabia PA. La digitalización de imágenes aplicadas a la anatomía patológica. Experiencias en la provincia Holguín, Cuba Rev Cubana Invest Biomed. 2006, 25(4). Disponible en http://bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol25_4_06/ibi01406.htm/. Consultado el 1 de diciembre de 2015.
8. Fernández Iglesias A, González Nuñez L, Calunga Fernández JL, Rodríguez Salgueiro S, Santos Febles E. Poscondicionamiento con ozono en un modelo de isquemia-reperusión renal. Pruebas

funcionales y morfológicas. *Nefrología*. 2011; 31:464-70, doi: 10.3265/Nefrologia.pre2011.May.10873.

9. Guyton y Hall. *Tratado de Fisiología Médica*. 10 ed. 2011 Elsevier España, SL. Insuficiencia renal aguda y crónica. Unidad V. Capítulo 31: 399-410.

10. Serviddio G, Dawide RA, Gesvaldo L, Tamburra R, Di Palma AM, Rollo T. Postconditioning is an effective strategy to reduce renal ischaemia- reperfusion injury. *Rev Neph Dial Trnaspl*. 2008, 23:504-512.

11. González Núñez L, Rodríguez Salgueiro S, Fernández Iglesias A, Santos Febles E. Effects of ozone oxidative postconditioning on renal tubular epithelial cells against ischemia reperfusion injury in rats. *Acta microscópica*. 2010, 19:264-70.

12. Linfert D, Chowdhry T, Rabb H. Lymphocytes A and ischemia reperfusion injury. *Rev Transplant*. 2009, 23(1):1-10.

13. González Nuñez L, Leiva Pantoja E, Rodríguez Salgueiro S, Calunga Fernández JL, Valdés Prieto T, Fernández Iglesias A et al. El preconditionamiento oxidativo con ozono protege los túbulos proximales de la corteza renal del daño por isquemia reperfusion. X Congreso Virtual Hispanoamericano de anatomía patológica 2009.

14. Curtis FG, Galbao Vianna PT, Viero RM, Fiorio PM, Muniz da Silva L, Cerqueira Braz JR et al. Dexmedetomidine and S(+). Ketamine in ischemia and reperfusion injury in the rat kidneys. *Acta Cir. Bras*. 2011; 26 (3).

15. Bagcik E, Ozkardesler S, Boztas N, Ugier B, Akan M, Guneli M, et al. Efectos de la Dexmedetomidina en conjunto con el preconditionamiento isquémico remoto en la lesión de isquemia-reperfusion renal en ratones. *Rev. Bras. Anestesiol*. 2014; 64(6): 382-390.

16. Sumbria RK, Klein J, Bickel U. Acute Depression of Energy Metabolism after Microdialysis Probe Implantation is Distinct from Ischemia-Induced Changes in Mouse Brain. *Neurochem Res*. 2011 Jan; 36(1):109-116.

17. Jin R, Yang GJ, Li GH. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *J Leukoc Biol*. 2010 May; 87(5):779-789.

18. Costa-Hong V, Aparecido Bortolotto L, Jorgetti V, Consolim-Colombo F, Krieger E M, Galvão de Lima JJ. Estrés Oxidativo y Disfunción Endotelial en la Enfermedad Renal Crónica. *Arq Bras Cardiol*. 2009; 92(5):398-403.

19. Calunga Fernández JL. Precondicionamiento oxidativo con ozono en el daño renal por isquemia-reperfusion. [Tesis presentada en opción del título de Doctor en Ciencias Médicas]. Ciudad de la Habana, Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas Victoria de Girón; enero, 2009.

20. Salvadori M, Rosso G, Bertoni E. Update on ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation: Pathogenesis and treatment. *World J Transplant*. 2015 Jun 24; 5(2): 52-67.