



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA "DR. IGNACIO CHÁVEZ"

**EFFECTO DEL EDARAVONE EN INSUFICIENCIA RENAL AGUDA
EXPERIMENTAL POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN EN RATAS.**

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE ESPECIALIDAD EN

NEFROLOGIA

PRESENTA:

DR. ARMANDO VÁZQUEZ RANGEL

TUTOR DE TESIS:

DRA. MARTHA FRANCO GUEVARA

CO-TUTORES:

DRA. ROCIO DURÁN BAUTISTA

DR. FRANCISCO E. RODRÍGUEZ CASTELLANOS



México DF, Agosto del 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dr. Fernando Guadalajara Boo
Jefe del Departamento de Enseñanza
Instituto Nacional de Cardiología “Dr. Ignacio Chávez”

Dra. Martha Franco Guevara
Jefe del Departamento de Nefrología
Instituto Nacional de Cardiología “Dr. Ignacio Chávez”

Dra. Martha Franco Guevara
Tutor de Tesis de Especialidad en Nefrología
Instituto Nacional de Cardiología “Dr. Ignacio Chávez”

Dr. Armando Vázquez Rangel
Alumno de Especialidad en Nefrología
Instituto Nacional de Cardiología “Dr. Ignacio Chávez”

DEDICATORIA

A mi esposa Rebeca.

Haberte re-encontrado fue lo mejor que me pasado en la vida. Has hecho de cada minuto juntos un momento lleno de amor y ternura. Gracias por tu paciencia y comprensión. Eres tú lo más importante de mi existencia y por ello te dedico no solo mi trabajo, sino mi vida entera.

A mi hija Daniela.

Tu llegada me ha dado otra dimensión. Eres el resultado de un inmenso amor y por lo tanto te llenaré con él. Con el tiempo trataré de llevarte de la mano para facilitar el camino que apenas comienzas, dándote siempre lo mejor de mí. No dejaré de esforzarme para que puedas estar orgulloso de mí.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y a Jeanett, por toda su ayuda y tanto cariño durante todo este tiempo. Uno a uno, son el mejor padre, madre y hermana que podía desear.

A mis padrinos Ángel y Raquel, por todas esas sabias palabras y demostraciones de apoyo incondicional. Mis segundos padres en toda la extensión de la palabra.

A mis eternos amigos Pinedo, Félix y Juan Carlos, porque al pasar de los años un compañerismo se vuelve amistad y ahora hermandad. Y a la “Generación Espontánea” y a quien nos bautizó, el Dr. Moreno, por seguir siendo una influencia positiva en mi vida personal y no solo profesional.

A todos y cada uno de los residentes de Nefrología, han sido una demostración de compañerismo y lealtad, un estímulo para dar más y un impulso para crecer, además de sentirse cómodo en el proceso. En especial gracias a Fernando, por tantos años de compartir momentos que seguirán en mi memoria.

A mis maestros, Dra. Franco, Dra. Madero Dr. Pérez-Grovas, Dr. Rodríguez, Dr. Herrera y Dr. Hernández, por haber confiado en mí, dándome cada uno las mejores herramientas a su alcance para enriquecer mi formación. Es sorprendente como cada pequeña plática llevaba consigo una gran cantidad de experiencia y conocimiento. Gracias por esa disposición e interés por enseñar. Y en particular a la Dra. Martha Franco, Dra. Rocío Durán, Dr. Francisco Rodríguez y José Santamaría, sin los cuales esta tesis no habría sido posible.

ÍNDICE

DEDICATORIA	4
AGRADECIMIENTOS	5
RESUMEN	6
MARCO TEÓRICO	8
Impacto de la insuficiencia renal aguda isquémica en humanos	8
Fisiopatología de la insuficiencia renal aguda isquémica	9
Lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilo	14
Edaravone	16
JUSTIFICACIÓN	21
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
Pregunta de investigación	22
Hipótesis	22
Objetivo	22
MATERIAL Y MÉTODOS	23
Diseño del estudio	23
Modelo de isquemia y reperfusión	23
Variables	25
Análisis estadístico	25
RESULTADOS	26
DISCUSIÓN	33
CONCLUSIONES	38
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

RESUMEN

Marco teórico. La insuficiencia renal aguda isquémica es una causa de alta morbi-mortalidad intrahospitalaria, y para la cual existen limitadas estrategias de prevención y tratamiento de impacto clínico. La remoción de radicales libres ha sido estudiada en diversos órganos con potenciales beneficios. En este sentido, el edaravone ha sido probado en modelos animales en corazón, hígado e intestino con resultados favorables limitando el daño por isquemia-reperfusión. Su uso en pacientes está aprobado en Japón para pacientes con eventos isquémicos cerebrales. A nivel renal, existen pocos estudios que evalúen su beneficio. Estos incluyen estudios de nefrosis inducida por puromicina, nefrotoxicidad inducida por cisplatino, y preservación de injerto renal. En el modelo de isquemia-reperfusión en ratas, Matsuyama y cols emplearon edaravone antes de la isquemia y nuevamente después de la reperfusión, evaluando únicamente la supervivencia, y finalmente Doi y cols probaron su uso justo al final de la isquemia y 30 minutos después de la reperfusión. Todos ellos han probado efecto benéfico con su uso. Estos resultados en el modelo renal aún no han sido sometidos a prueba en pacientes. Más aún, existen reportes de casos de insuficiencia renal aguda con empleo de edaravone, sin que por el momento se establezca una asociación causal clara. S por esto que consideramos relevante el establecer el papel de edaravone aplicado en dosis única previo al insulto renal generado por isquemia-reperfusión.

Material y Métodos. Se realizó un estudio experimental con ratas Wistar macho (300-350 gr de peso), las cuales fueron sometidas a nefrectomía derecha y clipaje de arteria renal izquierda durante 60 minutos para posteriormente permitir la reperfusión espontánea. Se formaron 3 grupos de 12 ratas cada uno: Grupo A para administración de solución salina, Grupo B para edaravone 3 mg/kg, y Grupo C para edaravone 9 mg/kg, todas por vía intravenosa una hora antes de inducir isquemia. Se tomaron muestras de sangre al tiempo cero, 2 horas después de reperfusión, y a las 24 horas para determinación de creatinina, nitrógeno de urea y lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilo (NGAL). El análisis estadístico se llevó a cabo con análisis de varianzas de mediciones repetidas para comparación de medias entre los tres grupos.

Resultados. Los valores obtenidos para creatinina, nitrógeno de urea y NGAL no mostraron diferencia al tiempo 0. A las 2 hrs post-reperfusión los 3 marcadores mostraron elevación significativa con respecto al basal. No se pudo establecer una diferencia entre la elevación de creatinina y NGAL a las 2 hrs post-reperfusión. A las 24 hrs la creatinina y nitrógeno de urea continuó su elevación, mientras que NGAL descendió, aunque aún con niveles significativamente mayores que al tiempo 0. Cuando se compararon los valores entre cada grupo (control, edaravone 3 y edaravone 9), no se encontró diferencia estadística en ningún momento.

Conclusión. La administración intravenosa de edaravone no parece ser efectiva en limitar el daño inducido por isquemia-reperfusión al emplearlo en dosis única previo al evento de isquemia-reperfusión.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Tiene el removedor de radicales libres edaravone efecto protector a nivel renal en el modelo de daño por isquemia-reperfusión aplicado en dosis única previo al evento de isquemia?

MARCO TEÓRICO

IMPACTO DE LA INSUFICIENCIA RENAL AGUDA ISQUÉMICA EN HUMANOS

La frecuencia de insuficiencia renal aguda (IRA) isquémica se ha reportado entre un 5 - 10% de los pacientes hospitalizados, y entre un 30-40% de los pacientes en unidad de terapia intensiva. Dicha incidencia puede elevarse con el advenimiento de nuevos nefrotóxicos empleados en la práctica médica. Además, la IRA isquémica tiene una alta mortalidad cuando ésta requiere terapia dialítica, cifras que alcanzan el 40-50%, e inclusive los pacientes en unidades de terapia intensiva con IRA isquémica pueden tener una mortalidad hasta del 80%, sobre todo si tienen falla multiorgánica ⁽¹⁾. Si bien las definiciones varían en los estudios publicados, según la clasificación de RIFLE se considera “riesgo” como 1.5 veces la creatinina basal u oliguria (0.5 ml/kg/hr) durante 6 horas, “daño” como 2 veces la creatinina basal u oliguria por 12 horas, y “falla” como 3 veces la creatinina basal u oliguria por 24 horas. No obstante, se ha observado que inclusive incrementos menores en el valor de creatinina sérica tienen un impacto significativo en la mortalidad, la cual se eleva hasta 1.9 veces si se presenta un incremento de creatinina menor de 0.5 mg/dl ⁽²⁾.

Por otra parte, es importante mencionar que a pesar de los avances de la medicina actual, la mortalidad ha mejorado pobremente en los últimos 40 años ⁽¹⁾.

Existen múltiples evidencias de la importancia fundamental del componente funcional, ya que en los estudios histopatológicos de pacientes con IRA se observan glomérulos normales, ocasionalmente necrosis tubular, y algunos cilindros intraluminales, así como

edema intersticial moderado, pero realmente no existe la demostración de un daño irreversible, y los cambios observados son insuficientes para explicar una filtración glomerular menor de 10 ml/min ⁽³⁾. Además, la mayoría de los pacientes que se recuperan de IRA recobran la función renal hasta la normalidad, no observándose en la mayoría de los casos lesión residual, en contraste con lo que ocurre en otras alteraciones isquémicas como el infarto al miocardio ⁽⁴⁾.

FISIOPATOLOGIA DE LA INSUFICIENCIA RENAL AGUDA ISQUÉMICA

En la mayoría de los factores que inducen IRA, la isquemia es un fenómeno frecuentemente observado, y un modelo experimental en el que se puede estudiar ampliamente es en isquemia-reperfusión inducida en animales. Este modelo consiste en inducir una reducción del flujo sanguíneo renal, que *in vivo* implica la coexistencia de hipoxia, acidosis e hipercapnia tisular, reducción de nutrientes, y acumulo de sustancias tóxicas derivadas del metabolismo celular. El segundo componente consiste en la perfusión del tejido, que incrementa la generación de productos derivados del estrés oxidativo e induce la respuesta inflamatoria ⁽⁵⁾.

La evolución del daño por IRA isquémica abarca en forma teórica 5 fases, que difícilmente se distinguen en la clínica: a) Fase Prerenal, en donde se presenta una respuesta vasomotora con reducción de flujo sanguíneo renal, reversible, y que no genera daño celular; b) Fase Inicial, que implica daño celular con depleción de ATP y por consiguiente lesión tanto epitelial tubular como endotelial, asociado a una caída más pronunciada en la filtración glomerular; c) Fase de Extensión, que se caracteriza por quimiotaxis de células inflamatorias y formación de cilindros que obstruyen la luz

tubular; d) Fase de Mantenimiento, caracterizada por la desdiferenciación y proliferación celular que depende de factores apoptóticos, factores de crecimiento y angiogénesis; y finalmente e) Fase de Reparación, cuando éstos últimos mecanismos logran la rediferenciación celular con la regeneración de epitelio normal, que se distingue por la repolarización celular ⁽⁵⁾.

En cuanto al componente prerrenal, cualquier evento que produzca disminución de la presión de perfusión renal, aumento de la resistencia vascular renal, o ambos, produce disminución de la filtración glomerular en un grado que impide la excreción de productos nitrogenados, por ejemplo la depleción de volumen, hipotensión arterial, choque, insuficiencia cardíaca, vasoconstricción renal, o la oclusión de la arteria renal. La elevación de azoados puede corregirse si la causa de hipoperfusión se revierte; así, la función renal mejora con el aumento del volumen extracelular, aumento del gasto cardíaco, o bien al corregir otras causas de vasodilatación sistémica como las inducidas por bacteremia, sobredosis de antihipertensivos, etc., así como tratar evitar la utilización de compuestos potencialmente nefrotóxicos.

Habitualmente las zonas con mayor demanda metabólica son las que sufren mayor hipoxia, como el segmento S3 del túbulo proximal, que desarrolla necrosis celular ante la isquemia persistente. Si los eventos continúan, se activarán las vías de apoptosis, que por sí solas pueden ocasionar daño a otros territorios vulnerables, como la porción gruesa ascendente del asa de Henle ⁽⁷⁾.

Una vez desencadenada la lesión celular, se observan alteraciones en la homeostasis que resultan de deprivación de adenosin trifosfato (ATP). La falta de oxígeno (O₂)

produce lesión mitocondrial, y esto inicia una cascada de cambios bioquímicos que llevan a disfunción celular ^(8,9). Se modifica el metabolismo de las purinas, lo que produce una elevación de adenosina, inosina e hipoxantina ⁽¹⁰⁾, por lo que se ha intentado la administración de adenina, glutamina y tiroxina para la repleción celular de ATP con fines terapéuticos sin haberse obtenido beneficio en la limitación del daño hasta el momento ⁽⁷⁾.

Por otra parte, la adenosina acumulada en el riñón produce vasoconstricción y disminuye la filtración glomerular, por lo que la administración de bloqueadores del receptor A1 de adenosina resulta prometedora para fomentar vasodilatación y por ende restablecer flujo medular ⁽¹¹⁾.

En el metabolismo de la adenosina, la xantina deshidrogenasa en presencia de hipoxia se transforma en xantina oxidasa, catalizando el paso de hipoxantina a xantina y generando radicales libres de O_2 así como peroxidación lipídica ⁽⁷⁾. A pesar de esto, el empleo del inhibidor de xantina oxidasa, alopurinol, no ha demostrado prevenir la lesión isquémica. Tanto la xantina oxidasa como la lipooxigenasa, involucrada esta última en el metabolismo del ácido araquidónico para la formación de mediadores pro-inflamatorios, ambas contribuyen a la producción de radicales superóxido (O_2^-), los cuales a su vez bajo el efecto de la superóxido dismutasa (SOD) forma peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y en presencia de hierro genera radicales hidroxilo (OH^\cdot). Por otra vía, el incremento en las concentraciones titulares de óxido nítrico (ON) producido por la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) fomenta la producción de peroxinitrito (NOO^-). Cada uno de éstos ha demostrado toxicidad intracelular e inducción de respuesta

inflamatoria, por lo que son parte fundamental en el desarrollo del daño agudo por isquemia-reperfusión.

Otra de las consecuencias de la depleción de ATP es la incapacidad para mantener la homeostasis del calcio (Ca^{2+}). El Ca^{2+} intracelular se acumula, lo que a su vez ocasiona lesión mitocondrial ⁽¹²⁾. Además las concentraciones elevadas de Ca^{2+} activan a fosfolipasas y proteasas que contribuyen a la lesión celular ⁽¹³⁾. La activación de fosfolipasas altera la composición de los lípidos de la membrana celular, lo que aumenta la permeabilidad y con ello mayor entrada de Ca^{2+} y otros iones a la célula. Bajo éstas condiciones, los bloqueadores de canales de Ca^{2+} no han demostrado la protección esperada en el daño por isquemia ⁽⁵⁾.

Una consecuencia de la lesión celular es la desorganización de la arquitectura celular. Así, se ha reconocido la importancia de las alteraciones del citoesqueleto en la IRA ⁽¹⁴⁾. La polarización de la célula es mantenida por las uniones intercelulares y uniones firmes; además, las integrinas, ponen en contacto a la célula con el medio intersticial, por lo que la alteración del citoesqueleto modifica la polaridad de la células ⁽¹⁵⁾. La importancia de mantener la polaridad en la célula la podemos ejemplificar con la bomba de sodio-potasio dependiente de ATP (Na^+/K^+ ATPasa). Ésta bomba normalmente se encuentra en la membrana basolateral, sin embargo en condiciones de isquemia se distribuye también en la superficie apical ⁽¹⁶⁾, ocasionando reabsorción de sodio deficiente y modificando la composición electrolítica de la célula. El Na^+ aumenta y el K^+ disminuye en forma importante; el cloro y el fósforo se elevan discretamente y el contenido de Ca^{2+} aumenta, después de varios minutos de isquemia ⁽¹⁷⁾.

La disminución en la reabsorción de Na^+ , junto con el acumulo de células epiteliales descamadas y la proteína de Tamm-Horsfall, produce la formación de cilindros intratubulares, con el riesgo de obstrucción y flujo retrógrado de líquido hacia intersticio ocasionando edema y compresión extrínseca de capilares peritubulares, lo que provoca aún menor perfusión ⁽⁷⁾. Cabe mencionar que las estrategias farmacológicas para incrementar el flujo tubular basadas en diuréticos han resultado incluso deletéreas para la función renal.

Tanto las modificaciones en la concentración tubular de Na^+ , como la adenosina producida por la isquemia, contribuyen a la sobre regulación del sistema de retroalimentación túbulo-glomerular, lo que implica un aumento en la actividad vasoconstrictora y profibrótica del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). No obstante, el bloqueo del SRAA en las etapas iniciales de isquemia se ha asociado a una mayor caída en la filtración glomerular ⁽¹⁸⁾.

Tal y como se mencionó para el caso de las células epiteliales tubulares, las células endoteliales presentan alteraciones estructurales y desprendimiento. Este daño endotelial se asocia con una disminución en la producción y liberación de agentes vasodilatadores como ON e incremento en factores vasoconstrictores como endotelina-1, lo cual contribuye a producir mayor hipoperfusión renal ⁽¹⁹⁾.

Tras el desprendimiento de células epiteliales y endoteliales, se promueve la quimiotaxis de células inflamatorias ya sea a través de integrinas en el túbulo, o por otras moléculas de adhesión en el vaso anguineo. Se ha propuesto que uno de las vías iniciales de la quimiotaxis podría ser a través de la activación de receptores Toll-like en

el tejido renal ⁽²⁰⁾. Cada uno de los componentes juega un papel relevante en el daño tisular, entre ellos la activación de complemento por la vía alterna, la infiltración de neutrófilos y macrófagos. la diferenciación de monocitos a células dendríticas productoras de factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), la presencia de células asesinas naturales (NK), la estimulación de linfocitos B, la liberación de citocinas pro-inflamatorias como interleucina 6 (IL-6), así como la activación de linfocitos Th1. Cada una de estos componentes ha sido susceptible de bloqueo farmacológico con resultados parciales en modelos animales ⁽²¹⁾.

LIPOCALINA ASOCIADA A GELATINASA DE NEUTRÓFILO

Dentro de la investigación sobre la IRA isquémica, se han implementado métodos de detección temprana de lesión tubular, en donde a lo largo del tiempo sustancias como creatinina, nitrógeno de urea, molécula de daño renal 1 (KIM-1), beta-2-microglobulina, cistatina C, etc, han sido evaluadas en su papel. Recientemente se ha aceptado a la lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilo (NGAL) como un marcador temprano de mayor beneficio. La NGAL es una proteína de 21 kDa que forma parte de la superfamilia de lipocalinas. Su acción primaria fue descrita como prevención del crecimiento bacteriano a través de fijar el hierro requerido por éstas. Además, NGAL fomenta la expresión de factores de crecimiento, contribuyendo a la proliferación y rediferenciación del epitelio tubular dañado, inclusive con potenciales aplicaciones terapéuticas. La aplicación de NGAL en modelos animales antes de inducir isquemia renal ha mostrado prevenir considerablemente el daño, posiblemente a través de inducir la expresión de factores de crecimiento o de hemo-oxigenasa 1 ⁽²²⁾.

Tras un insulto renal, los niveles séricos en humanos incrementan entre 7 y 16 veces, y los urinarios entre 25 y 100 veces, mientras que la expresión del RNAm alcanza 1000 veces el valor basal ⁽²²⁾. El estudio en pacientes sometidos a coronariografía percutánea demostró que los niveles séricos de NGAL incrementaban entre las 2 y las 4 hrs, y los urinarios entre las 4 y las 8 hrs, en comparación con cistatina C que incrementó hasta las 24 hrs o creatinina que no incrementó en ningún momento dentro de las 48 hrs del estudio ⁽²³⁾. Dent y cols estimaron una sensibilidad de 84% y especificidad de 94% para NGAL medido a las 2 hrs en el estudio de insuficiencia renal aguda posterior a cirugía cardíaca en niños, tomando como referencia el valor de creatinina a las 72hrs para definir el evento. También encontraron correlación significativa con la duración de la insuficiencia renal aguda, tiempo de estancia hospitalaria y mortalidad ⁽²⁴⁾. Inclusive la medición única a la llegada al servicio de urgencias logró distinguir en más del 90% a aquellos pacientes entre insuficiencia renal crónica, estado prerrenal e insuficiencia renal aguda por necrosis tubular ⁽²⁵⁾.

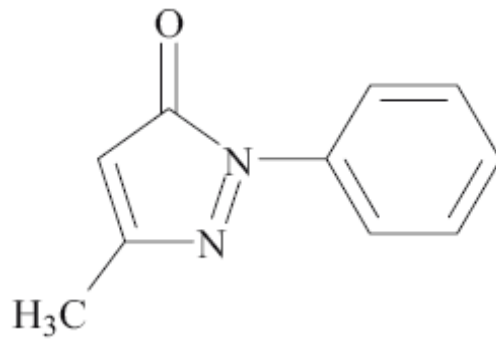
La utilidad de NGAL ha sido probada no solo en isquemia, también en nefrotoxicidad por fármacos, sepsis, nefropatía diabética, algunas glomerulopatías primarias, nefropatía lúpica, y rechazos de injertos renales. Las comparaciones han incluido otros marcadores como beta-2-microglobulina y N-acetil-glucosaminidasa en orina, mostrando un menor tiempo de elevación para NGAL ⁽²⁶⁾.

EDARAVONE

El reconocimiento de la fisiopatología ha llevado a enfocar estudios experimentales sobre vías particulares de daño renal. En los últimos años ha habido una gran cantidad de publicaciones a cerca de potenciales agentes que incidan sobre estrés oxidativo. La investigación sobre remoción de radicales libres ha ido desde la identificación de sustancias endógenas, el empleo de suplementos vitamínicos y extractos naturales, hasta el desarrollo de sustancias en la industria farmacéutica cada vez de mayor potencia.

En particular el edaravone (3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-ona) es un compuesto fenólico con un peso molecular de 174.2 kDa, capaz de remover radicales libres solubles ya sea en medio acuoso o lipídico, por lo que agrupa las ventajas de las vitaminas C y E. Alcanza concentraciones estables tras 30 minutos de su aplicación intravenosa ⁽²⁷⁾, y gracias a ser lipofílico logra niveles tisulares e intracelulares adecuados. Bajo condiciones fisiológicas el 50% está presente en forma aniónica, lo que genera la donación de electrones para remoción de radicales libres, quedando en el proceso la forma radical de edaravone, la cual se une a O_2 generando radicales peroxilo de edaravone, y finalmente ácido butanoico 2-oxo-3-fenilhidrazona ⁽²⁸⁾.

Aunque tiene diversas propiedades, se le ha atribuido una mayor potencia para remover radicales OH^\cdot , no así para radicales O_2^\cdot . Cuando los radicales OH^\cdot actúan sobre lípidos de membrana generan radicales lipídicos, y posteriormente radicales peroxilipídicos (LOO^\cdot) ante la exposición a O_2 , siendo éste proceso de peroxidación lipídica bloqueado por edaravone ⁽²⁸⁾.



Estructura de edaravone

Dentro de los mecanismos de acción de edaravone encontrados en modelos animales experimentales se incluyen: estimula la actividad de la catalasa y la SOD ⁽²⁹⁾ fomentando así la eliminación de radicales libres; estimula glutatión peroxidasa e inhibe a la proteína cinasa mitógeno-activada (MAPK) p38 desde dosis de 1.5 mg/kg ⁽³⁰⁾; en trauma craneo-encefálico la inhibición de la peroxidación lipídica y de la vía de cinasa de c-Jun NH₂-terminal (JNK) con dosis de 3 mg/kg IV reduce la formación de edema cerebral ⁽³¹⁾, además de inhibir a fosfolipasa A₂ contribuyendo de igual manera a menor edema y menor extravasación de neutrófilos ⁽³²⁾; atenúa la respuesta contráctil a la angiotensina II en el modelo de diabetes inducida por estreptozotocina con dosis de 3 mg/kg dos veces al día por 2 semanas ⁽²⁹⁾; en cultivos celulares de hipocampo de rata reduce las concentraciones intracelulares de Ca²⁺, incrementa el potencial de membrana mitocondrial; y disminuye apoptosis como parte de los mecanismos de protección de daño por hipoxia e hipoglicemia ⁽³³⁾; administrado a ratas a dosis de 1 y 6 mg/kg 5 minutos antes y 60 minutos después de la inducción de hepatotoxicidad por D-galactosamina y liposacáridos redujo el daño histopatológico y disminuyó los niveles de RNAm para TNF- α e IL-6, además de reducir la actividad de mieloperoxidasa ⁽³⁴⁾; en

cultivos de células tumorales de colon, su adición inhibió al factor nuclear kappa-B y estimuló a caspasa 3, fomentando apoptosis y reduciendo proliferación tumoral ⁽³⁵⁾; en cultivos de células T asociadas a leucemia, el edaravone disminuyó citotoxicidad inducida por radiación al inhibir p53 ⁽³⁶⁾; aplicado a dosis de 3 mg/kg 3 veces por semana por 2 semanas redujo la miocardiotoxicidad de la daunorrubicina sin bloquear su efecto anti-tumoral ⁽³⁷⁾; igualmente en corazón la administración de 10 mg/kg demostró reducir la permeabilidad del poro de transición mitocondrial evitando la liberación de citocromo c, y por consiguiente la apoptosis, además de elevar Bcl-2 ⁽³⁸⁾; suprime la progresión de aterosclerosis a dosis de 10 mg/kg cada 48 hrs por 4 semanas en ratones deficientes de apolipoproteína E ⁽³⁹⁾; cuando se indujo daño endotelial por láser, la infusión de 10.5 mg/kg/hr estimuló la producción de óxido nítrico endotelial y redujo en un 56% el volumen del trombo generado, todo esto dentro de los primeros 30 minutos ⁽⁴⁰⁾; y reduce factor de crecimiento de fibroblastos y la actividad de las sintasas de óxido nítrico inducible y neural ⁽⁴¹⁾.

Con respecto a isquemia-reperfusión, los estudios más avanzados se encuentran en el ámbito neurológico, en donde ya está aprobado su uso clínico en Japón para pacientes con eventos cerebrales isquémicos a dosis de 30 mg cada 12 hrs durante 14 días. La dosis propuesta se sustenta bajo el hallazgo de que en humanos el tratamiento con edaravone por más de 13 días produjo una mejoría del 69% contra solo el 24% con tratamiento menor a 13 días ⁽⁴²⁾, aunque por otro lado Inatomi y cols clasificaron a los pacientes con embolismo cerebral por escala de severidad encontrando que solo aquellos categorizados como evento leve fueron los beneficiados con el tratamiento de edaravone. En médula espinal, la infusión de edaravone 3 mg/kg iniciando 30 minutos

antes y concluyendo 180 min después del evento de isquemia aumentó la cantidad de neuronas viables en conejo ⁽⁴³⁾.

Existen diversos estudios animales en corazón que apuntan hacia un futuro prometedor del edaravone, inclusive en trasplante, en donde la administración 3 mg/kg en cerdos sacrificados por asfixia y tomando en paro dicho órgano para trasplante, mejoró sus parámetros funcionales miocárdicos una vez injertado en comparación de aquellos que recibieron placebo ⁽⁴⁴⁾. Inclusive ya estudios en humanos muestran beneficios. La aplicación de 30 mg intravenosos de edaravone en pacientes con evento coronario agudo dentro de las primeras 6 horas y justo antes de someterse a reperfusión mostró valores superiores de fracción de eyección del ventrículo izquierdo, una menor elevación de enzimas cardíacas y una tasa de arritmias menor que el grupo control ⁽⁴⁵⁾. Cuando los mismos autores reportaron el seguimiento a 415 días en promedio, encontraron que el grupo que recibió edaravone tuvo un tiempo libre de eventos cardiovasculares significativamente mayor ⁽⁴⁶⁾.

En otros territorios, los estudios aún se limitan a modelos animales, aunque casi todos con resultados favorables. En isquemia-reperfusión pulmonar, edaravone 3 mg/kg en un lapso de 1 hora (desde 30 minutos antes de reperfusión hasta 30 minutos después de reperfusión) redujo significativamente el daño histológico y mejoró los parámetros de intercambio gaseoso en perros ⁽⁴⁷⁾. En isquemia hepática, edaravone 3 mg/kg inmediato post-reperfusión y una hora después redujo marcadores inflamatorios, limitó la elevación de enzimas hepáticas, y disminuyó el infiltrado de polimorfonucleares ⁽⁴⁸⁾.

En general en riñón existen menos estudios que evalúen el desempeño del edaravone. En toxicidad renal por cisplatino, la aplicación en dosis única de 1 o 5 mg/kg redujo el daño histológico y los marcadores séricos de daño renal en ratas ⁽⁴⁹⁾. En nefrosis inducida por puromicina, Someya y cols, y Matsumura y cols, ambos mostraron reducción de la proteinuria administrando edaravone inclusive tardíamente con respecto a la aplicación del aminoglucósido ^(50,51).

Específicamente en isquemia-reperfusión renal, Matsuyama y cols probaron en ratas una dosis de 10 mg/kg antes de la isquemia y nuevamente la misma dosis después de la perfusión, sin embargo los resultados son reportados con respecto a mortalidad, obteniendo sobrevivencia de 5/5 vs 3/5 a los 2 días, y 1/5 vs 0/5 a los 4 días con edaravone y placebo respectivamente ⁽⁵²⁾. En el estudio de Tahara y cols sobre autotrasplante renal en perros se administraron 3 mg/kg de edaravone tanto durante la extracción del injerto y su procuración, como durante la reimplantación al inicio de la perfusión sanguínea, lo que llevó a diferencias significativas con respecto a filtración glomerular, función tubular y volumen urinario ⁽⁵³⁾. Doi y cols mostraron que la administración de 5 y 10 mg/kg al final de la isquemia y nuevamente 30 minutos después de la perfusión limitaba el daño renal, no así para la dosis de 1 mg/kg ⁽⁵⁴⁾.

Es importante hacer notar que si bien durante los ensayos clínicos controlados de pacientes con eventos cerebrales isquémicos solo pareció haber efectos secundarios ocasionales consistentes en erupción cutánea y alteración de pruebas hepáticas, pero sin diferencia significativa con respecto a placebo ⁽⁵⁵⁾, a partir de su salida al mercado en los países orientales se han reportado múltiples casos de insuficiencia renal aguda. Dichos eventos generalmente desarrollados en el transcurso de las 2 semanas de

tratamiento según el esquema aprobado que ya se comentó, e inclusive con requerimientos de terapia de sustitución renal en forma transitoria ⁽⁵⁶⁾. Hishida publicó en diciembre del 2007 un revisión de 207 casos de insuficiencia renal aguda durante el uso de edaravone, concluyendo que en el 91.8% de los casos otro factor, y no éste fármaco, parecía ser la causa más probable del desarrollo de trastorno renal. De lo más frecuente fue la presencia de infección severa o hipotensión, que correspondían al 65% de los pacientes. Solo en el 8.2% no se encontró otro factor predisponente adicional al empleo de edaravone ⁽⁵⁷⁾. Si bien no existe hasta el momento evidencia de causalidad, ni estudios que ayuden a dilucidar posibles mecanismos de nefrotoxicidad, se han hecho recomendaciones precautorias para pacientes con relación BUN/Cr >15 o BUN >25 mg/dl previo al inicio del tratamiento. Inclusive cabe mencionar que en el estudio previamente mencionado de pacientes con evento coronario agudo, se excluyeron aquellos con creatinina sérica mayor de 1.2 mg/dl ⁽⁴⁵⁾.

JUSTIFICACIÓN

Debido a los limitados avances en la prevención y tratamiento de la IRA isquémica en pacientes, es necesario explorar nuevas estrategias para intervenir sobre mecanismos fisiopatológicos reconocidos. Si bien el edaravone ha probado su beneficio ante isquemia en otros territorios, y en la actualidad se emplea en humanos, consideramos indispensable probar su potencial efecto protector en el modelo de isquemia renal in vivo al emplearse en dosis única antes del evento de isquemia renal, tratando de limitar su exposición una vez desarrollada la falla renal.

HIPOTESIS

HIPÓTESIS NULA: El edaravone no disminuye el daño renal provocado por isquemia y reperfusión al aplicarse en dosis única previo al evento de isquemia

HIPÓTESIS ALTERNA: El edaravone disminuye el daño renal provocado por isquemia y reperfusión al aplicarse en dosis única previo al evento de isquemia

OBJETIVOS

PRIMARIO: Evaluar la contribución de edaravone profiláctico en la disminución de la severidad de la IRA isquémica.

SECUNDARIO: Evaluar la contribución de NGAL como marcador temprano en insuficiencia renal aguda isquémica

MATERIAL Y MÉTODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio Experimental, Prospectivo, Longitudinal, abierto.

Se estudiarán tres grupos, cada uno con 12 ratas.

Grupo 1: Ratas con IRA isquémica + Vehículo

Grupo 2: Ratas con IRA isquémica + edaravone 3 mg/kg

Grupo 3: Ratas con IRA isquémica + edaravone 9 mg/kg

MODELO DE ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN:

Se utilizaron ratas Wistar macho con un peso de 250-300 gr. Bajo anestesia general con pentobarbital intraperitoneal, Se utilizaron ratas Wistar macho con un peso de 250-300 gr. Bajo anestesia general con pentobarbital intraperitoneal, se administró una dosis intravenosa de 10 U de heparina sódica intravenosa para mejorar la reperfusión renal. A continuación se efectuó una incisión en la línea media abdominal, se expuso el riñón derecho y el pedículo renal, se separó de la grasa perirrenal, incluyendo la glándula suprarrenal, se ligó el pedículo renal y se efectuó nefrectomía. En seguida, se expuso el riñón izquierdo y el pedículo renal, se disecó la arteria renal izquierda y con instrumentos romos para evitar la lesión se colocó un clamp vascular no traumático y se cerró la cavidad peritoneal con puntos temporales. Después de 60 minutos (fase isquémica) se expuso nuevamente el riñón izquierdo,

liberando el clamp vascular y permitiendo el restablecimiento del flujo renal (fase de reperfusión). Solamente los riñones que se reperfundieron totalmente en un periodo de 15 minutos fueron incluidos.

El edaravone se administró por vía intravenosa a través de vena yugular una hora antes de inducir isquemia. La solubilidad del edaravone se logró bajo la mezcla con NaOH al 0.5M, agua destilada, y corrección de pH hasta 8.0 con HCl al 2.0M. En el grupo control se administró solución salina 1.5 ml en el mismo momento.

Se tomaron muestras de sangre en condiciones basales a las 2 hrs y 24 hrs posterior a la reperfusión para determinación de creatinina, nitrógeno de urea y NGAL. Al final del experimento se obtuvo el riñón, se seccionó en corteza y médula y se congeló a -80°C para determinaciones posteriores. Para la medición de NGAL por Western Blot se utilizaron 100 μg de proteína y se resuspendieron en el amortiguador para muestra (1:1 v/v) (0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol y 10% mercaptoetanol). Las muestras se colocaron en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 10%. La electroforesis se corrió en presencia del amortiguador de corrida (0.025 M Tris, pH 8.3, 0.192 M glicina, 0.1% SDS) a 100 volt. La transferencia se llevó a cabo en un sistema Trans-Blot SD a 10 volts por 30 minutos. La membrana se incubó con el anticuerpo primario contra NGAL así como para actina (Santa Cruz).

VARIABLES

Variable dependiente

- Niveles de creatinina, nitrógeno de urea y NGAL
 - Creatinina y nitrógeno de urea son expresadas en mg/dl y corresponden a variables cuantitativas continuas y de razón
 - NGAL es expresada en unidades arbitrarias como variable cuantitativa continua y de razón

Variables independientes

- Inducción de isquemia y reperfusión (variable cualitativa nominal)
- Administración de edaravone (variable cualitativa ordinal)

ANALISIS ESTADISTICO:

Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar. Se analizaron los datos con método de mediciones repetidas, se probó la homogeneidad de varianzas con prueba de Levene, y posteriormente se hicieron contrastes simples tomando como referencia al tiempo 0, empleando la prueba de Bonferroni. El análisis multivariado incluyó la variable “tiempo” definida por 0 hrs, 2 hrs o 24 hrs, y la variable “grupo” definida por control, edaravone 3 o edaravone 9. Se acepto un nivel de significancia de $p < 0.05$

RESULTADOS

En la siguiente tabla se muestran las medidas de tendencia central y de dispersión para las determinaciones de creatinina, nitrógeno de urea y NGAL para cada subdivisión del universo de ratas.

	1	Media	Desv. típ.
Cr0	Control	.6700	.02449
	Edaravone 3	.7033	.05203
	Edaravone 9	.6633	.03933
	Total	.6789	.04185
Cr2	Control	1.6883	.18082
	Edaravone 3	1.8767	.97983
	Edaravone 9	1.3400	.35922
	Total	1.6350	.61828
Cr24	Control	5.0450	.29153
	Edaravone 3	4.8867	.34010
	Edaravone 9	4.0533	1.65750
	Total	4.6617	1.03315
BUN0	Control	22.6667	1.96638
	Edaravone 3	23.5000	2.07364
	Edaravone 9	21.5000	4.41588
	Total	22.5556	2.97484
BUN2	Control	37.3333	5.92171
	Edaravone 3	44.6667	26.15084
	Edaravone 9	29.6667	5.04645
	Total	37.2222	16.08271
BUN24	Control	124.5000	10.09455
	Edaravone 3	121.8333	7.54763
	Edaravone 9	97.0000	41.64613
	Total	114.4444	26.81795
NGAL0	Control	13.6667	1.21106
	Edaravone 3	14.5000	.54772
	Edaravone 9	14.0000	2.00000
	Total	14.0556	1.34917
NGAL2	Control	25.5000	3.39116
	Edaravone 3	24.0000	2.75681
	Edaravone 9	24.5000	1.64317
	Total	24.6667	2.61219
NGAL24	Control	18.6667	2.65832
	Edaravone 3	17.3333	3.50238
	Edaravone 9	17.6667	2.73252
	Total	17.8889	2.86744

En los contrastes multivariados, se encontró diferencias significativas para las mediciones generales en el total de las ratas (análisis de intersección entre sujetos), sin embargo no se encontró diferencia cuando se analizaron dentro de cada grupo de tratamiento sin importar el tiempo (análisis de grupo entre sujetos). Cuando se agregó el efecto de tiempo, pero sin importar el tratamiento recibido, se encontraron diferencias significativas (análisis de tiempo intra-sujetos), no obstante al evaluar simultáneamente el tiempo y los grupos de tratamiento, nuevamente no existió diferencia estadísticamente significativa (análisis tiempo-grupo intra-sujetos).

Contrastes multivariados

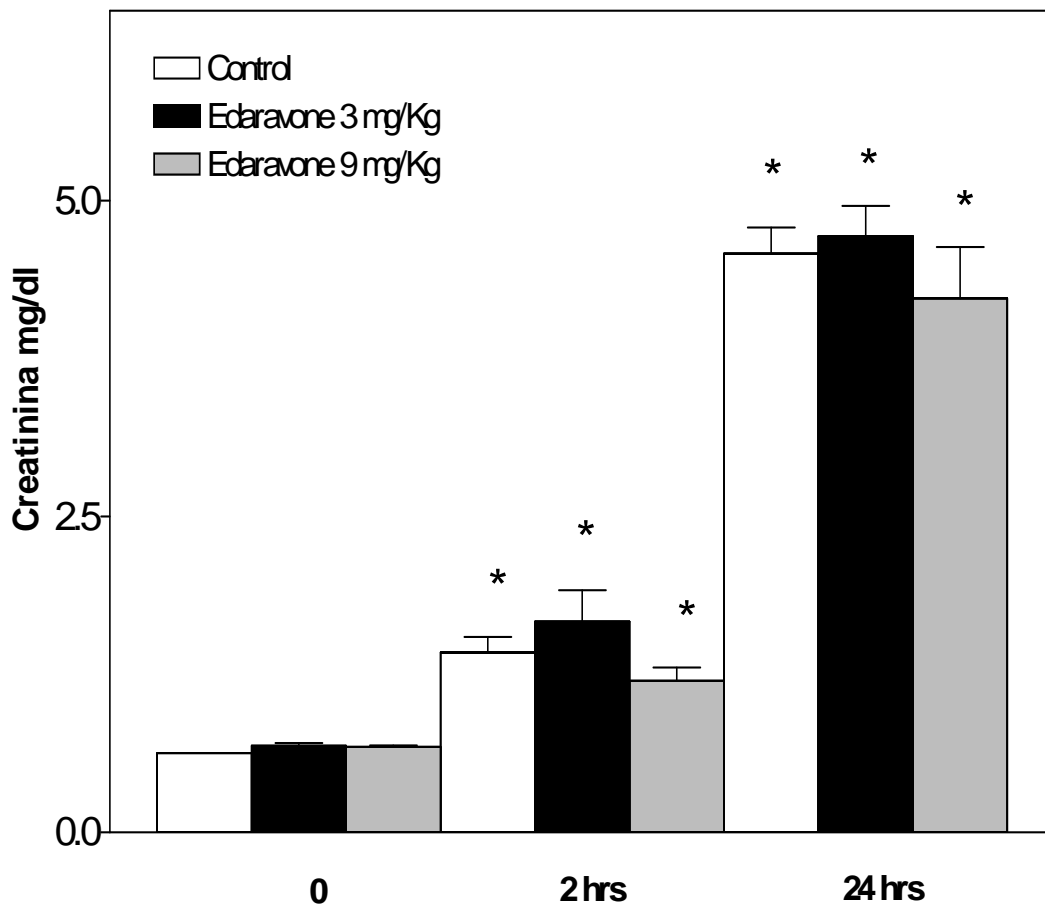
Efecto			Valor	F	p
Entre sujetos	Intersección	Traza de Pillai	.997	1578.07(a)	.000
		Lambda de Wilks	.003	1578.07(a)	.000
		Traza de Hotelling	364.170	1578.07(a)	.000
		Raíz mayor de Roy	364.170	1578.07(a)	.000
	Grupo	Traza de Pillai	.456	1.378	.258
		Lambda de Wilks	.561	1.454(a)	.233
		Traza de Hotelling	.754	1.507	.218
		Raíz mayor de Roy	.712	3.321(b)	.051
Intra-sujetos	Tiempo	Traza de Pillai	.989	153.546(a)	.000
		Lambda de Wilks	.011	153.546(a)	.000
		Traza de Hotelling	92.127	153.546(a)	.000
		Raíz mayor de Roy	92.127	153.546(a)	.000
	tiempo*grupo	Traza de Pillai	.722	1.036	.453
		Lambda de Wilks	.358	1.117(a)	.399
		Traza de Hotelling	1.565	1.174	.369
		Raíz mayor de Roy	1.405	2.576(b)	.083

(a) Estadístico exacto

(b) El estadístico es un límite superior para la F el cual ofrece un límite inferior para el nivel de significación.

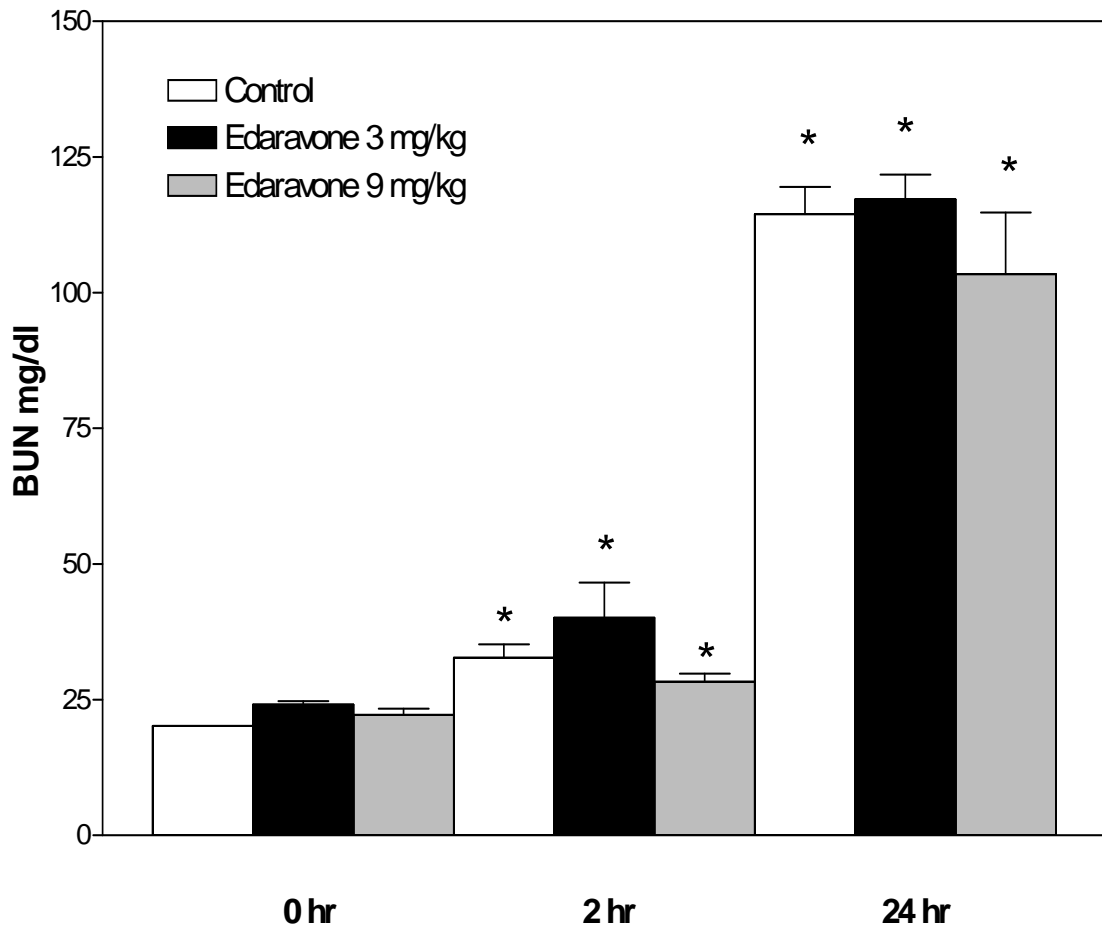
En los siguientes gráficos se muestra el comportamiento individual de la creatinina, nitrógeno de urea y NGAL para cada grupo de tratamiento a lo largo del tiempo.

Niveles de Creatinina Graficados por Grupo y Tiempo



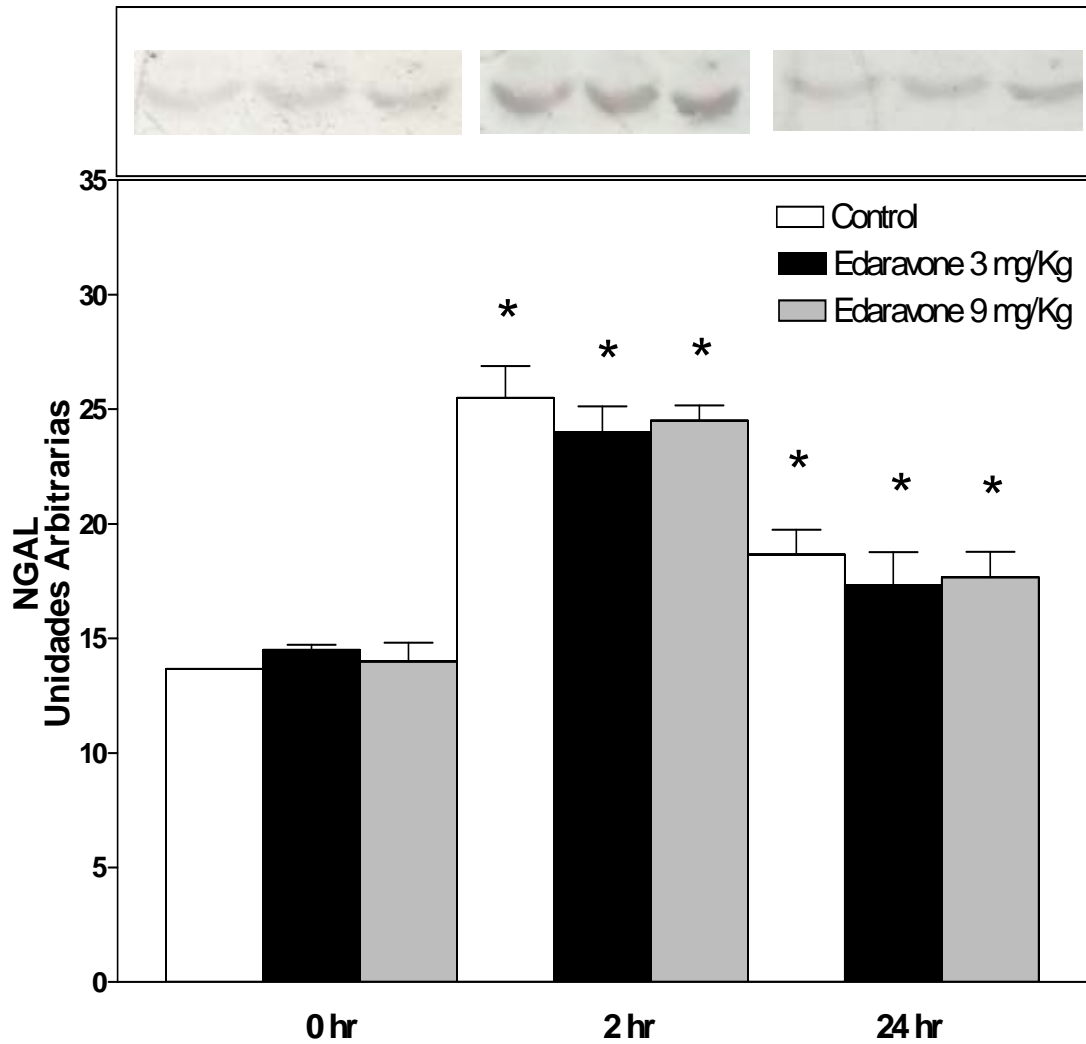
* $p < 0.001$ vs 0.

Niveles de Nitrógeno de Urea Graficados por Grupo y Tiempo



* $p < 0.001$ vs 0

Niveles de NGAL Graficados por Grupo y Tiempo



* = $p < 0.001$ vs. 0

La prueba de Levene arrojó que las varianzas de los grupos fueron homogéneas, lo que permitió el análisis de comparaciones por el método de Bonferroni.

Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas

	F	gl1	gl2	p
Cr0	1.446	2	15	.267
Cr2	2.921	2	15	.085
Cr24	3.442	2	15	.059
BUN0	2.331	2	15	.131
BUN2	3.445	2	15	.059
BUN24	2.166	2	15	.149
NGAL0	1.484	2	15	.258
NGAL2	1.263	2	15	.311
NGAL24	.029	2	15	.971

Las pruebas de contraste inter-sujetos e intra-sujetos confirmaron las observaciones anteriores. Los niveles para creatinina, nitrógeno de urea y NGAL mostraban diferencias significativas, lo que correspondía a los cambios a través del tiempo. Dicha significancia en comparaciones individuales se observaba no solo entre tiempo 0 y 24 hrs, sino inclusive entre tiempo 0 y 2 hrs para los 3 marcadores. Cuando la variable “grupo” era introducida haciendo referencia a la distinción entre los diferentes tratamientos utilizados, no se encontraba diferencia estadística en ninguno de los marcadores.

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Fuente	Medida	Suma de cuadrados tipo III	Media cuadrática	F	p
Intersección	creatinina	97.317	97.317	750.369	.000
	Bun	60706.765	60706.765	636.768	.000
	Ngal	6409.636	6409.636	2918.38	.000
Grupo	creatinina	.846	.423	3.260	.067
	Bun	688.975	344.488	3.613	.052
	Ngal	1.531	.765	.349	.711

Variable transformada: Promedio

Pruebas de contrastes intra-sujetos

Fuente	Medida	tiempo	Suma de cuadrados tipo III	Media cuadrática	F	P
Tiempo	Cr	2hrs vs 0hrs	16.45	16.45	45.23	.000
		24hrs vs 0hrs	285.52	285.52	293.11	.000
	Bun	2hrs vs 0hrs	3872.00	3872.00	16.31	.001
		24hrs vs 0hrs	151984.22	151984.22	258.42	.000
	Ngal	2hrs vs 0hrs	2026.72	2026.72	167.19	.000
		24hrs vs 0hrs	264.50	264.50	18.70	.001
tiempo*grupo	Cr	2hrs vs 0hrs	.77	.38	1.06	.369
		24hrs vs 0hrs	3.27	1.63	1.68	.220
	Bun	2hrs vs 0hrs	507.00	253.50	1.06	.368
		24hrs vs 0hrs	2454.11	1227.05	2.08	.159
	Ngal	2hrs vs 0hrs	16.44	8.22	.67	.522
		24hrs vs 0hrs	14.33	7.16	.50	.612

DISCUSION

Los resultados corroboran la validez del modelo de isquemia-reperfusión en nuestras ratas, obteniendo evidencia tanto macroscópica por la visualización al momento de los cambios en coloración del tejido al inducir isquemia y tras permitir la perfusión, como sérica a través de los marcadores de daño renal empleados.

A pesar de lo reportado en estudios clínicos en donde NGAL ha mostrado ser superior como marcador temprano de daño tubular renal comparado contra creatinina, en este modelo experimental los 3 marcadores (creatinina, nitrógeno de urea y NGAL) mostraron una elevación significativa desde las 2 hrs. En términos generales, ambos, creatinina y NGAL, duplicaron sus valores a las 2 hrs post-reperfusión.

La procedencia de NGAL es un factor relevante a considerar. Las concentraciones séricas elevadas justo después del insulto isquémico parecen provenir del túbulo proximal, que tiene la capacidad de reabsorberla por endocitosis y almacenarla en lisosomas, por lo que su origen podría ser sistémico. Sin embargo, su producción posterior al evento de isquemia es principalmente en asa de Henle y túbulo colector, es decir, sitios tubulares primariamente menos dañados. Esto explica en parte como la concentración urinaria se eleva considerablemente más que la concentración sérica posterior a la isquemia ⁽²²⁾.

En nuestro estudio, factores como la severidad del daño provocado por isquemia-reperfusión, las mediciones exclusivamente séricas y no urinarias, y el método empleado por Western Blot a diferencia del método por ELISA en la mayor parte de los estudios, podrían tratar de explicar en parte la diferencia en los resultados obtenidos para NGAL con respecto al comportamiento de creatinina y nitrógeno de urea.

Por otro lado, cabe resaltar que a las 24 hrs post-reperfusión, la creatinina y nitrógeno de urea parecen ser mejores indicadores de daño, debido al decremento en los valores de NGAL a ese tiempo. Estos hallazgos ya habían sido encontrados por un estudio donde se evidenció el descenso de los niveles séricos de NGAL después de las 8 hrs del evento ⁽²³⁾.

La administración de edaravone en el modelo de isquemia-reperfusión ha sido probada a diferentes dosis y en diferentes tiempos. Ante estudios que consistentemente muestran un efecto favorable dosis-dependiente, son el momento de inicio y la duración del tratamiento las variables que podrían inclinar la balanza hacia riesgo o beneficio renal. Se acepta hasta ahora como posible ventaja de su uso el ampliar el tiempo de ventana para perfusión en eventos isquémicos cerebrales. Suzuki y cols administraron a perros con infarto cerebral inducido 4 semanas antes 1.5 mg/kg intravenosa previo al procedimiento de perfusión cerebral, mostrando reducción en la cascada de estrés oxidativo ⁽⁵⁸⁾. Por su parte Zhang y cols probaron en ratón administrar 3 mg/kg justo después de la perfusión cerebral contra retrasar el inicio del tratamiento 3, 6 o 12 hrs después de la perfusión, encontrando que

inclusive hasta un periodo de ventana de 6 horas era aceptable para lograr efecto benéfico ⁽⁵⁹⁾. No obstante con un retraso mayor en el tiempo parecería ya no estar indicado su uso. Otani y cols emplearon dosis única de edaravone 3 mg/kg o 10 mg/kg en diferentes tiempos tras isquemia-reperfusión cerebral en ratas, con análisis de potenciales sinápticos en hipocampo, encontrando que la administración justo después de la perfusión mostraba una mejoría significativa, no así para la administración 24 hrs o 96 horas tras perfusión ⁽⁴¹⁾.

Es claro el efecto durante y posterior a la perfusión en diversos órganos, sin embargo es de meditar su uso con fines de protección renal una vez que ya se ha inducido un daño por isquemia-reperfusión, más aún con los reportes de casos comentados sobre IRA. Es por esto que poner a prueba su efecto administrado previo al insulto renal nos resultó necesario. Sin embargo, en nuestro estudio no encontramos beneficio con 3 o 9 mg/kg en una sola dosis una hora previa a la inducción de isquemia, a pesar de la adecuada biodisponibilidad teórica a partir de los 30 min de su aplicación intravenosa.

En cuanto a la duración del tratamiento, Noor y cols sometieron a ratas de 7 días de edad a insulto hipóxico-isquémico cerebral, y las asignaron posteriormente a 2, 5 o 10 días de tratamiento con edaravone 9 mg/kg. A través de pruebas de comportamiento y análisis histológico concluyeron que el tratamiento corto por 2 días resultaba superior al tratamiento por 5 o 10 días ⁽⁶⁰⁾. Los autores sugieren que durante la fase aguda la remoción de radicales libres es benéfica, sin embargo podría ser contraproducente en la fase regenerativa, ya que podría fomentar a su vez

la producción de radicales libres al acumularse la dosis. Además, habría que sumarle en la clínica los múltiples factores de riesgo que pueden agregarse durante el curso de un padecimiento, sobre todo en aquellos que requieren manejo intrahospitalario. Por otro lado, existen circunstancias en que el estímulo agresor se perpetúa, que en teoría podría retrasar la reperfusión adecuada o inclusive fomentar un ciclo continuo de isquemia-reperfusión-isquemia, en donde las dosis requeridas de agentes removedores de radicales libres podrían multiplicarse. Es en éste ámbito donde quizá el monitoreo sérico con estimadores de estrés oxidativo tendrían un papel, como la determinación de lipoproteínas de baja densidad oxidadas (oxLDL) y actividad de SOD⁽⁶¹⁾.

Ésta última podría constituir una hipótesis para explicar porqué la aplicación de edaravone previo a isquemia-reperfusión no resultó efectiva, es decir, a pesar de la disponibilidad teórica del fármaco en plasma y tejidos es factible que ante concentraciones bajas de radicales libres la presencia del fármaco no genere un impacto, mientras que el metabolismo del mismo fomente la producción de radicales edaravone y edaravone glucoronizado o sulfatado que sean fácilmente excretados por un riñón todavía sano. Una vez que se concrete la reperfusión, las concentraciones de radicales libres se elevarán considerablemente, lo que demandaría una mayor cantidad de fármaco requerido para su remoción, y quizá el administrado previamente se encuentre ya metabolizado e inactivo, por lo que dosis posteriores a éste momento serían necesarias. En cuanto al daño renal inducido por isquemia-reperfusión, es factible que los mecanismos de excreción del edaravone se

vean afectados, fomentado una elevación en las concentraciones plasmáticas y quizá mayor disponibilidad, no así cuando se aplica previo al daño renal.

La disociación entre estudios experimentales en animales, y los reportes clínicos, principalmente a nivel hepático y renal ya ha sido discutida en algunas publicaciones, sin obtenerse aún una idea clara del origen de ésta.

En la búsqueda de mecanismos tentativos de nefrotoxicidad, Mizuno y cols exploraron el transporte de edaravone a nivel tubular una vez que éste ha sido glucoronizado o sulfatado, demostrando que su excreción está acoplada a los transportadores de aniones orgánicos OAT1 y OAT3 en la membrana basolateral del túbulo proximal. No obstante, el incremento de las concentraciones o disponibilidad a nivel tubular no parece conferir citotoxicidad a ese nivel en los experimentos in Vitro⁽⁶²⁾. Otro factor a considerar es el efecto que tiene edaravone sobre piridoxal, lo que a largo plazo podría generar depleción de sus concentraciones y potencialmente efectos secundarios debido a deficiencia de piridoxina. Específicamente a nivel renal, el piridoxal y piridoxina bloquean receptores purinérgicos, por lo que sus concentraciones bajas podrían contribuir a vasoconstricción, además de que como parte de la familia de la vitamina B, son considerados inhibidores de la peroxidación lipídica⁽⁶³⁾.

El futuro de los antioxidantes en la reducción del daño renal por isquemia-reperfusión parece prometedor. Desde el empleo de sustancias como N-acetil cisteína, que aunque con resultados controversiales tiene un bajo perfil de toxicidad que permite

su uso cotidiano en humanos para prevención de nefropatía por medio de contraste, pasando por líneas de investigación aún en proceso sobre extractos naturales como los bioflavonoides, que en modelos animales han mostrado beneficios en isquemia-reperfusión en diversos tejidos, hasta finalmente el desarrollo de fármacos modificados como el TM2002, derivado de edaravone con un mayor poder removedor de radicales libres y la diferencia de no fijar piridoxal, lo que le ofrecería ventajas teóricas ⁽⁶⁴⁾.

El esquema aplicado por Doi y cols con dos dosis, la primera después de isquemia y la segunda después de perfusión parece hasta el momento la mejor opción ⁽⁴⁹⁾, sin embargo se requieren de más estudios que ayuden a aclarar los reportes de asociación con IRA.

CONCLUSIONES

1. El modelo de isquemia–reperfusión resultó válido, con la elevación de los valores de creatinina, nitrógeno de urea y NGAL post-reperfusión.
2. En este trabajo, los 3 marcadores mostraron elevación significativa a partir de las 2 hrs. Si bien NGAL no mostró diferencia contra creatinina, de cualquier forma seguiría siendo un marcador temprano de daño renal, no así un marcador tardío, ya que sus valores descienden a las 24 hrs.
3. La administración de edaravone en dosis única previo al evento de isquemia-reperfusión no parece tener efecto benéfico sobre prevención de daño renal. Este resultado se presentó independiente de la dosis empleada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Edelstein CH, Schier RW. Pathophysiology of Ischemic Acute Renal Injury. Disease of the kidney & urinary tract. 8th edition Lippincott Williams & Wilkins; 2007, pp 930.
2. Palevsky P. Off-pump cardiac surgery and acute kidney injury. Crit Care Med 2006; 34(12):3052-3.
3. Hou SH, Bushinsky DA, Wish JB, Cohen JJ, Harrington JT. Hospital acquired renal insufficiency. A prospective study. Am J Med 1983; 74:243-248.
4. Lohr JW, McFarlane MJ, Grantham JJ. A clinical index to predict survival in acute renal failure patients requiring dialysis. Am J Kidney Dis 1988; 11:254-259.
5. Russ AL, Haberstroh KM, Rundell AE. Experimental strategies to improve in vitro models of renal ischemia. Exp Mol Pathol 2007; 83:143-159.
6. Li L, Okusa MK. Blocking the immune response in ischemic acute kidney injury: the role of adenosine 2A agonists. Nature Clin Prac Nephrol 2006; 2(8):432-444.
7. Devarajan P. Update on Mechanisms of Ischemic Acute Kidney Injury. J Am Soc Nephrol 2006; 17:1503-1520.
8. Bonventre JV. Mechanisms of ischemic acute renal failure. Kidney Int 1993; 43:1160-1178.
9. Honda N, Hishida A. Pathophysiology of experimental nonoliguric acute renal failure. Kidney Int 1993; 43:513-521.
10. Osswald H, Schmitz HJ, Kemper R. Tissue content of adenosine, inosine, hypoxanthine in the rat kidney after ischemia and post ischemic recirculation. Pflueger Arch 1977; 371:45-49.

11. Osswald H. The role of adenosine in the regulation of glomerular filtration rate and renin secretion. *Trends Pharm Science* 1984; 5:94-97.
12. Cheung JY, Bonaventre JV, Malis CD, Leaf A. Calcium and ischemic injury. *NEJM* 1986; 314:1670-1672.
13. Humes HD. Role of calcium in the pathogenesis of acute renal failure. *Am J Physiol* 1986; 250:F579-F589.
14. Nurko S, Sogabe K, Davis JA, Roeser NF, Defrain M, Chien A, Hinshaw D, Athey B, Meixner W, Venkatachalam MA, Weindberg JM. Contribution of actin cytoskeletal alterations to ATP depletion and calcium-induced proximal tubule cell injury. *Am J Physiol* 1996; 270:F39-F52.
15. Spiegel DM, Wilson PD, Molitoris BA. Epithelial polarity following ischemia: a requirement for normal cell function. *Am J Physiol* 1989; 256:F430-F437.
16. Molitoris BA, Dahl R, Geerdes A. Cytoskeleton disruption and apical redistribution of proximal tubule Na-K-ATPase during ischemia. *Am J Physiol* 1992; 263:F488-F495.
17. Masson J, Beck F, Dorge A, Rick R, Thrurau K. Intracellular electrolyte composition following renal ischemia. *Kidney Int* 1981; 20:61-70.
18. Schusterman N, Storm BL, Murray TG, Morrison G, West SL, Maislin G. Risk factors and outcome of hospital-acquired acute renal failure: clinical epidemiologic study. *Am J Med* 1987; 83:63-71.
19. Basile DP. The endothelial cell in ischemic acute kidney injury: implications for acute and chronic function. *Kidney Int* 2007; 72:151–156.
20. Lu CY, Hartono J, Senitko M, Chen J. The inflammatory response to ischemic acute kidney injury: a result of the 'right stuff' in the 'wrong place'? *Curr Opin Nephrol Hypert* 2007; 16:83-89.

21. Thurman JM. Triggers of inflammation after renal ischemia/reperfusion. *Clin Immunol* 2007; 123:7-13.
22. Schmidt-Ott KM, Mori K, Li JY, et al. Dual Action of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18:407-13
23. Bachorzewska-Gajewska H, Malyszko J, Sitniewska E, Malyszko JS, Dobrzycki S. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) correlations with cystatin C, serum creatinine and eGFR in patients with normal serum creatinina undergoing coronary angiography. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22:295-6
24. Dent CL, Ma Q, Dastrala S, et al. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin predicts acute kidney injury, morbidity and mortality after pediatric cardiac surgery: a prospective uncontrolled cohort study. *Critical Care* 2007; 11(6):127-35
25. Nickolas TL, O'Rourke MJ, Yang J, et al. Sensitivity and specificity of a single emergency department measurement of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin for diagnosing acute kidney injury. *Ann Intern Med* 2008; 148(11):810-9
26. Mori K, Nakao K. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as the real-time indicator of active kidney damage. *Kidney Int* 2007; 71:967-70
27. Takamatsu Y, Watanabe T. Studies on the concentrations of 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one (MCI-186) in dog plasma and cerebral spinal fluid. *Jpn Pharmacol Ther* 1997; 25(suppl):S1785-91
28. Yoshida H, Yanai H, Namiki Y, et al. Neuroprotective effects of edaravone: a novel free radical scavenger in cerebrovascular injury. *CNS Drug Reviews* 2006; 12(1):9-20

29. Kumar A, Patel RJ, Sharma SS, et al. Edaravone attenuates hydroxyl radical stress and augmented angiotensin II response in diabetic rats. *Pharm Research* 2006; 54:6-10
30. Watanabe K, Ma M, Wen J, et al. Effects of edaravone in heart of aged rats after cerebral ischemia-reperfusion injury. *Biol Pharm Bull* 2007; 30(3):460-4
31. Dohi K, Satoh K, Nakamachi T, et al. Does edaravone (MCI-186) acts as an antioxidant and a neuroprotector in experimental traumatic brain injury? *Antioxid Redox Signal* 2007; 9(2):281-7
32. Bellido YA, Shimoyama T, Akamatsu H, Sunamori M. MCI-186 (edaravone), a free radical scavenger, attenuates ischemia-reperfusion injury and activation of phospholipase A2 in an isolated rat lung model after 18 h of cold preservation. *Eur J Cardio-thoracic Surg* 2006; 29:304-11
33. Wu T, Ding XS, Wang W, Wu J. MCI-186 (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one) attenuated simulated ischemia/reperfusion injury in cultured rat hippocampal cells. *Biol Pharm Bull* 2006; 29(8):1613-7
34. Ito K, Ozasa H, Noda Y, et al. Effects of free radical scavenger on acute liver injury induced by D-galactosamine and lipopolysaccharide in rats. *Hepatology Research* 2008; 38:194-201
35. Kokura S, Yoshida N, Sakamoto N, et al. The radical scavenger edaravone enhances the anti-tumor effects of CPT-11 in murine colon cancer by increasing apoptosis via inhibition of NF- κ B. *Cancer Letters* 2005; 229:223-33
36. Sasano N, Enomoto A, Hosoi Y, et al. Free radical scavenger edaravone suppresses X-ray-induced apoptosis through p53 inhibition in MOLT-4 cells. *J Radiat Res* 2007; 48:495-503

37. Ikegami E, Fukazawa R, Kanbe M, et al. Edaravone, a potent free radical scavenger, prevents anthracycline-induced myocardial cell death. *Circ J* 2007; 71:1815-20
38. Rajesh KG, Sasaguri S, Suzuki R, Maeda H. Antioxidant MCI-186 inhibits mitochondrial permeability transition pore and upregulates Bcl-2 expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285:H2171-8
39. Okabe T, Kishimoto C, Shimada K, et al. Effects of MCI-186 (edaravone), a novel free radical scavenger, upon experimental atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circ J* 2006; 70:1216-9
40. Yamashita T, Shoge M, Oda E, et al. The free-radical scavenger, edaravone, augments NO release from vascular cells and platelets after laser-induced, acute endothelial injury in vivo. *Platelets* 2006; 17(3):201-6
41. Otania H, Togashia H, Jesminb S, et al. Temporal effects of edaravone, a free radical scavenger, on transient ischemia-induced neuronal dysfunction in the rat hippocampus. *Eur J Pharm* 2005; 512:129-37
42. Japan Pharmacist Education Center. Edaravone (Radicut infusion 30 mg). New Drug Approval Package, No. 11 2001; 398-403
43. Suzuki K, Kazui T, Terada H, et al. Experimental study on the protective effects of edaravone against ischemic spinal cord injury. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005; 130:1586-92
44. Kotani Y, Ishino K, Osaki S, et al. Efficacy of MCI-186, a free-radical scavenger and antioxidant, for resuscitation of nonbeating donor hearts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007; 133:1626-32
45. Tsujita K, Shimomura H, Kawano H, et al. Effects of edaravone on reperfusion injury in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2004; 94:481-4

46. Tsujita K, Shimomura H, Kaikita K, et al. Long-term efficacy of edaravone in patients with acute myocardial infarction. *Circ J* 2006; 70:832-7
47. Akao T, Takeyoshi I, Totsuka O, et al. Effect of the free radical scavenger MCI-186 on pulmonary ischemia–reperfusion injury in dogs. *J Heart Lung Transplant* 2006; 25:965-71
48. Taniguchi M, Uchinami M, Doi K, et al. Edaravone reduces ischemia-reperfusion injury mediators in rat liver. *J Surg Res* 2007; 137:69-74
49. Satoh M, Kashihara N, Fujimoto S, et al. A novel free radical scavenger, edaravone, protects against cisplatin-induced acute renal damage in vitro and in vivo. *JPET* 2003; 305:1183-90
50. Someya T, Kaneko K, Yamada T, Yamashiro Y. Effect of a novel free radical scavenger, edaravone, on puromycin aminonucleoside induced nephrosis in rats. *Pediatr Nephrol* 2005; 20(10):1430-4
51. Matsumura H, Ashida A, Hirano K, Nakakura H, Tamai H. Protective effect of radical scavenger edaravone against puromycin nephrosis. *Clin Nephrol* 2006; 66(6):405-10
52. Matsuyama M, Hayama T, Funao K, et al. Treatment with edaravone improves the survival rate in renal warm ischemia-reperfusion injury using rat model. *Transpl Proceedings* 2006; 38:2199-200
53. Tahara M, Nakayama M, Jin MB, et al. A radical scavenger, edaravone, protects canine kidneys from ischemia-reperfusion injury after 72 hours of cold preservation and autotransplantation. *Transplantation* 2005; 80: 213-21
54. 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):1714-23

55. The Edoxone Acute Infarction Study Group. Effect of a novel free radical scavenger, edoxone (MCI-186), on acute brain infarction. Randomized, placebo-controlled, double-blind study at multicenters. *Cerebrovasc Dis* 2003; 15:222–9
56. Abe M, Kaizu K, Matsumoto K. A case report of acute renal failure and fulminant hepatitis associated with edoxone administration in a cerebral infarction patient. *Ther Apher Dial* 2007; 11(3):235-40
57. Hishida A. Clinical analysis of 207 patients who developed renal disorders during or after treatment with edoxone reported during post-marketing surveillance. *Clin Exp Nephrol* 2007; 11(4):292-6
58. Suzuki T, Kazui T, Yamamoto S, et al. Effect of prophylactically administered edoxone during antegrade cerebral perfusion in a canine model of old cerebral infarction. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007; 133:710-6
59. Zhang N, Komine-Kobayashi M, Tanaka R, et al. Edoxone reduces early accumulation of oxidative products and sequential inflammatory responses after transient focal ischemia in mice brain. *Stroke* 2005; 36:2220-5
60. Noor JI, Ikeda T, Mishima K, et al. Short term administration of a new free radical scavenger, edoxone, is more effective than its long-term administration for the treatment of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Stroke* 2005; 36:2468-74
61. Uno M, Kitazato KT, Suzue A, et al. Inhibition of brain damage by edoxone, a free radical scavenger, can be monitored by plasma biomarkers that detect oxidative and astrocyte damage in patients with acute cerebral infarction. *Free Rad Biol & Med* 2005; 39:1109-16

62. Mizuno N, Takahashi T, Iwase Y, et al. Human organic anion transporters 1 (hOAT1/SLC22A6) and 3 (hOAT3/SLC22A8) transport edaravone (MCI-186; 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one) and its sulfate conjugate. *Drug Metab Dispos* 2007; 35(8):1429-34
63. Izuhara Y, Nangaku M, Takizawa S, et al. A novel class of advanced glycation inhibitors ameliorates renal and cardiovascular damage in experimental rat models. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23:497-509
64. Izuhara Y, Nangaku M, Takizawa S, et al. A novel class of advanced glycation inhibitors ameliorates renal and cardiovascular damage in experimental rat models. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23:497-509