



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**EFFECTO DEL BLOQUEO A RECEPTORES DE MINERALOCORTICOIDES
EN LA EVOLUCIÓN DEL TRASPLANTE RENAL**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:

MAESTRIA EN CIENCIAS MEDICAS

P R E S E N T A:

DR. RAFAEL VALDEZ ORTIZ

TUTORES DE TESIS:

DRA. NORMA BOBADILLA SANDOVAL

DR. GERARDO GAMBA AYALA



MÉXICO, D.F.

DICIEMBRE 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

TITULO:

EFFECTO DEL BLOQUEO A RECEPTORES DE MINERALOCORTICOIDES EN LA EVOLUCIÓN DEL TRASPLANTE RENAL

DEPARTAMENTOS PARTICIPANTES:

- 1) UNIDAD DE FISIOLÓGÍA MOLECULAR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA GENÓMICA Y TOXICOLOGIA AMBIENTAL DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS DE LA UNAM.
- 2) DEPARTAMENTO DE NEFROLOGIA Y METABOLISMO MINERAL DEL INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION SALVADOR ZUBIRAN

AREA DE INVESTIGACION:

NEFROLOGIA Y FISIOLOGIA RENAL

LINEAS DE INVESTIGACION:

- 1) DAÑO RENAL POR ISQUEMIA FRIA REPERFUSION
- 2) TRASPLANTE RENAL

Dedicatoria

A Thalpa

Preciosa, este proyecto es mas tuyo que mío, fuiste para mí, el estímulo más grande para haberlo terminado. Perdóname por el tiempo que no recuperaremos de estar juntos. Por los sábados y los domingos que te robé. Por las muchas lágrimas de coraje e impotencia que tuvimos, pero sobre todo, gracias por darle alegría a mi corazón.

¡Lo logramos!

Agradecimientos

A Esther y a la Dra. Herrero-Fresneda, dos increíbles mujeres e investigadoras del Instituto de Investigaciones Biomédicas de Bellvitge en Barcelona, España. Iluminaron mi camino en el momento más oscuro y justo cuando más lo necesitaba.

A mis amigos, Katy Sánchez, Norma Vázquez, Diana Pacheco, Cesar Cortés, Carolina Ariza, Consuelo Plata, Lilia Granados, Edgar Dehesa y Luis Morales. Gracias por apoyarme, motivarme, orientarme, regañarme, escucharme, pero sobre todo gracias, porque nunca dejaron de creer en mí.

Al Instituto Científico Pfizer. Por el apoyo económico brindado, para concluir este proyecto.

A Leonardo Abarca y Bernardo Gabilondo, cirujanos y amigos, gracias por los consejos que me dieron y por brindarme lo más valioso que tienen, los secretos de un cirujano.

Al personal del Departamento de Cirugía Experimental, por todos los tips en el manejo del microscopio, el instrumental quirúrgico y por las muchas, muchas suturas que me regalaron y que me permitieron trabajar al inicio de este proyecto.

Al Dr. Ricardo Correa-Rotter, por su apoyo incondicional en todos estos años. Mi respeto y mi admiración como médico, como persona, pero sobre todo como padre de familia.

A mi familia, especialmente a mi hermano Gelo, por la infinidad de consejos que me diste y el tiempo que me regalaste para escucharme, sabes muy bien que eres mi mejor amigo y de quien aprendo muchas cosas todos los días. A mi hermana Leo, por enseñarme que en la vida siempre habrá que tener la nobleza de perdonar a las personas, la humildad para aprender de los errores y el coraje para levantarse cuantas veces sea necesario. A mi Madre, por enseñarme, no con palabras, si no con el ejemplo, que en la vida nunca se debe dejar de luchar y que

las armas más poderosas que tiene el hombre para alcanzar el éxito, son la paciencia y la perseverancia.

A la Dra. Norma Bobadilla, mujer de grandes virtudes y que tuve la fortuna de conocer, convivir y aprender de ella en estos casi tres años. Gracias por todos los consejos, la orientación, los regaños y el apoyo incondicional, aún en las situaciones más adversas. Por su motivación continua y el entusiasmo de que podríamos lograrlo, gracias. Mi respeto y admiración por siempre.

Al Dr. Gerardo Gamba, por los consejos, por sus palabras, por su vida dedicada a la Ciencia Mexicana. Gracias por enseñarme la realidad de la investigación básica en México.

Finalmente, este proyecto no hubiera sido posible de realizar sin las instalaciones y el apoyo completo del todo el personal que arduamente laboran en la Unidad de Fisiología Renal del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, a todos sus alumnos, técnicos e investigadores, gracias, muchas gracias.

Con profundo entusiasmo

Rafa Valdez O

ÍNDICE

I.- Marco teórico

I.1 Introducción	1
I.2 Fisiología de la aldosterona	2
I.2.1 Receptor de mineralocorticoides	3
I.2.2 Acciones genómica de la aldosterona	5
I.2.3 Acciones no genómicas de la aldosterona	7
I.3 Retardo en la función del injerto	7
I.3.1 Fisiopatología del retardo en la función del injerto	9
I.4 Espironolactona protege al riñón del daño agudo por isquemia/ reperfusión	11
I.5 Justificación	13

II.- Hipótesis

III.- Objetivos

III.1 General	15
III.2 Particulares	15

IV.- Metodología

IV.1 Diseño del estudio	16
IV.2 Lugar a realizar el estudio	16
IV.3 Animales de estudio y tamaño de la muestra	16
IV.4 Diseño experimental	17
IV.4.1 Nefrectomía y perfusión renal	17
IV.4.2 Trasplante renal	20
IV.4.3 Vigilancia postoperatoria	22
IV.5 Consideraciones éticas	23
IV.6 Variables	23

IV.6.1 Dependientes	23
IV.6.2 Independientes	23
IV.6.3 Definición operacional de variables	23
IV.6.4 Hoja de captura de variables	24
IV.7 Análisis estadístico	24
V.- Resultados	25
V.1 Estandarización de la nefrectomía y perfusión renal	25
V.2 Estandarización del trasplante renal experimental	26
V.3 Efecto de la espironolactona en la evolución del trasplante renal	32
V.4 Efecto de la isquemia fría/ reperfusión en la sobrevida	34
VI.- Discusión	38
VII.- Conclusiones	49
VIII.- Bibliografía	50
IX.- Anexos	61

I.- MARCO TEÓRICO

I.-1 Introducción:

La insuficiencia renal crónica terminal (IRCT) es un problema de salud pública mundial, que muestra un incremento continuo en su incidencia y prevalencia (1, 2). Expectativas en Estados Unidos de América para el año 2010, señalan que el costo de la terapia dialítica de pacientes con IRCT será de 28 mil millones de dólares por año (3). El trasplante renal es considerado el tratamiento de elección para pacientes con IRCT, que aunque parece conllevar el mismo costo que la terapia dialítica, presenta una clara ventaja sobre la calidad de vida y la reinstalación a la vida productiva del paciente (4, 5). Sin embargo, actualmente la pérdida del injerto renal debido al rechazo agudo o crónico constituye una de las principales causas de IRCT (6, 7, 8). Por lo tanto, cualquier maniobra que disminuya la tasa de rechazo renal tendrá como efecto benéfico, no solo preservar la función del injerto, sino también para reducir la prevalencia de IRCT.

Estudios experimentales han demostrado una asociación directamente proporcional del tiempo de isquemia fría con las tasas de rechazo del injerto (9, 10). Este fenómeno al parecer tiene relación, con el hecho que la isquemia fría/ reperusión induce una mayor expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), lo que a su vez se traduce en un incremento en la tasa de rechazo agudo y de nefropatía crónica del injerto (11). Se ha demostrado que el incremento en la expresión CMH se asocia con el grado de necrosis tubular aguda, que es un hallazgo histológico característico del daño renal por isquemia fría/ reperusión (12).

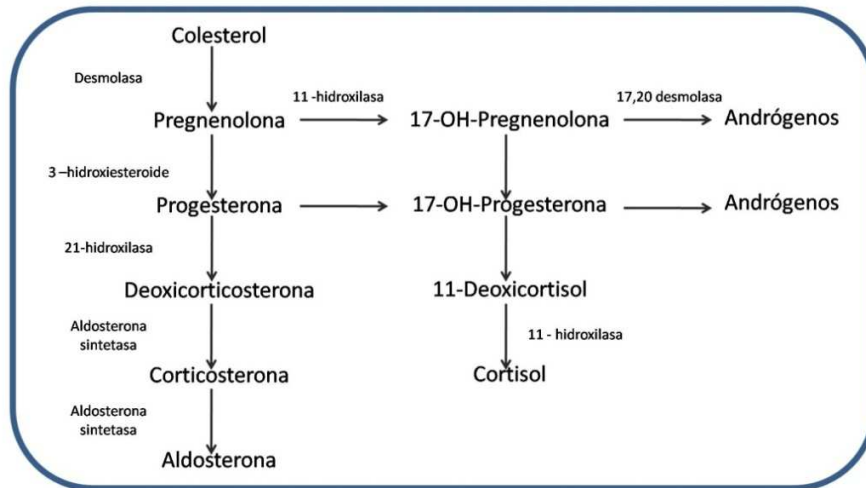
Datos previos de nuestro laboratorio, demostraron que la espironolactona previene la caída del flujo sanguíneo y la función renal en la toxicidad aguda por ciclosporina, ambos efectos mediados por la vasoconstricción sostenida de la arteriola renal aferente (13, 14). Estas observaciones sugirieron que el bloqueo de los receptores de mineralocorticoides podría tener efecto benéfico en el modelo renal de isquemia/ reperfusión. Para analizar esta posibilidad, se estudió el efecto de la administración de espironolactona durante 24, 48 y 72 horas previas a la isquemia renal en un modelo de isquemia caliente/reperfusión en la rata (15). Los resultados mostraron que el grupo de ratas con isquemia caliente/ reperfusión presentaron una caída significativa de la función renal, acompañada de caída del flujo sanguíneo renal; estas observaciones funcionales, se acompañaron de un alto grado de necrosis tubular aguda. Por otro lado, ni los cambios funcionales, ni los estructurales se presentaron en las ratas pretratadas con espironolactona. La conclusión principal de este trabajo es que el bloqueo de los receptores de mineralocorticoides con espironolactona previno el daño renal por isquemia caliente/ reperfusión.

1.2 Fisiología de la aldosterona:

La aldosterona es una hormona esteroidea de la familia de los mineralocorticoides (16). Es sintetizada en la zona glomerular de la glándula suprarrenal, sus dos principales funciones son la conservación del sodio sérico y la secreción de potasio por la orina (16, 17). La aldosterona fue aislada por vez primera por *Simpson y Tait* en 1953, a partir de extractos cristalizados de glándulas suprarrenales (18). Los esteroides son sintetizados a partir del colesterol dentro de la corteza suprarrenal, mediante diferentes reacciones enzimáticas que suceden a nivel microsomal; modificando la estructura inicial del

colesterol, la aldosterona es sintetizada desde la desoxicorticosterona por acción de la enzima mitocondrial P450 de aldosterona sintasa (Figura I.1).

Figura I.1. Esquema de reacciones enzimáticas en la síntesis de aldosterona



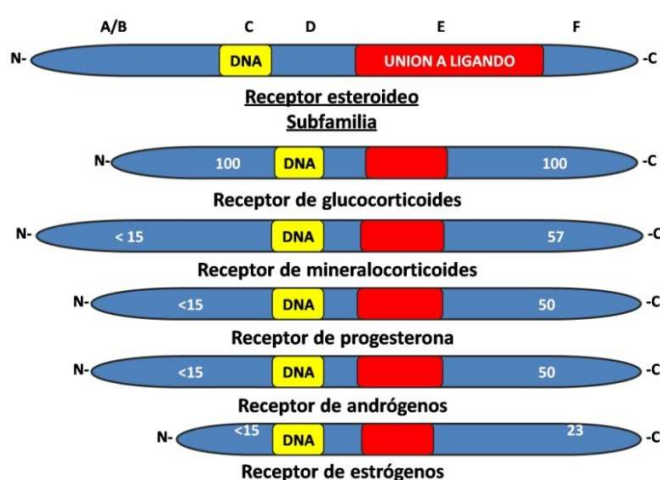
La regulación de la síntesis y de la secreción de la aldosterona, depende directamente de factores que regulan la secreción de renina y la producción de angiotensina II, principalmente, la depleción de sodio, del líquido extracelular y la hiperkalemia, sin embargo, aunque en menor medida, el sistema β -adrenérgico y ciertas prostaglandinas también participan (16, 17).

1.2.1 Receptor de mineralocorticoides:

La función de la aldosterona depende de la interacción directa con los receptores de mineralocorticoides (MR), localizados a nivel del citoplasma (19). En 1987 se logró la clonación del MR (20). Dicho receptor pertenece a la superfamilia de receptores nucleares de la que forman parte los receptores del ácido retinoico, las hormonas tiroideas, la

vitamina D y los receptores esteroideos (21-23). Estos últimos a su vez, forman una subfamilia conformada por receptores para mineralocorticoides, glucocorticoides, progesterona, andrógenos y estrógenos. Se ha descrito la existencia de regiones muy conservadas dentro de esta subfamilia de receptores (Figura I.2).

Figura I.2 Subfamilia de receptores esteroideos



La región A/B, contiene un dominio para la transactivación; el dominio C, corresponde a la región de unión al DNA y que además confiere la capacidad de dimerización de estos receptores; la región D da la capacidad de torsión actuando a modo de bisagra; y la región E corresponde al dominio de unión y reconocimiento del ligando así como a diferentes proteínas capaces de modular la actividad del receptor, entre las que destacan las proteínas de choque térmico HSP 70 y HSP 90 (24-25).

La similitud estructural entre la subfamilia de receptores esteroideos se hace patente al comparar los receptores de mineralocorticoides (MR) con los receptores de glucocorticoides (GR), ya que presentan una homología del 94% a nivel de la región C.

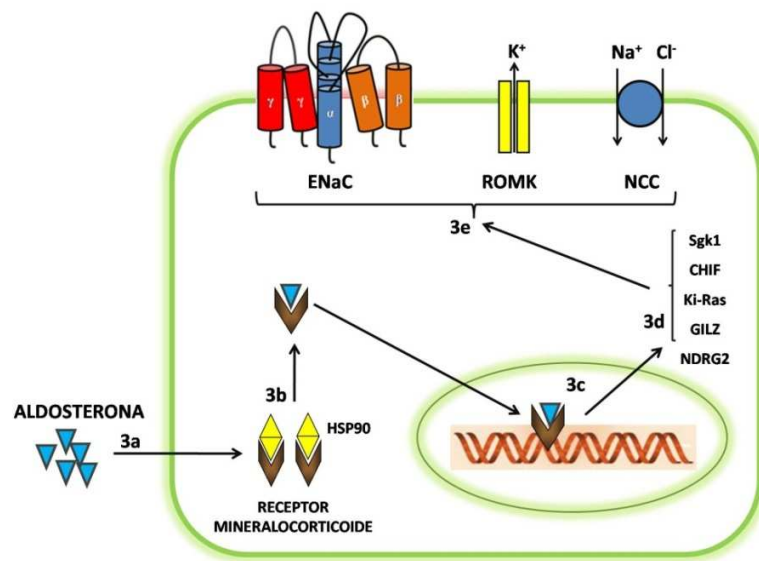
Por ello, la interacción del MR y del GR con el DNA tiene lugar a nivel de los mismos elementos de respuesta específica, GRE (por sus siglas en inglés, Glucocorticoid Response Element), esto es, que son capaces de reconocer la misma secuencia nucleotídica en las regiones promotoras de los genes (21). Esta elevada similitud estructural entre MR y GR explicaría además la capacidad de unión cruzada entre el cortisol (principal glucocorticoide) y el MR. Ahora bien ¿Cómo puede ser selectivo el receptor MR si presenta la misma afinidad por los glucocorticoides que por la aldosterona? Más aún, ¿cómo la aldosterona puede ocupar su receptor si el cortisol presenta unas concentraciones plasmáticas de 100 a 1.000 veces superiores? Dado que los niveles circulantes de cortisol son muy superiores a los de aldosterona, se hace necesaria la existencia de elementos adicionales que aseguren la capacidad de unión de la aldosterona al MR. Entre estos mecanismos encontramos la enzima 11 β -hidroxiesteroide dehidrogenasa tipo II (11HSD2) capaz de convertir el cortisol en cortisona, hormona mucho menos afín por el receptor MR, favoreciendo de esta manera la especificidad de la aldosterona por el receptor (16, 21). De este modo algunos de los tejidos sensibles a la aldosterona expresan el enzima 11HSD2 que les permite liberar el receptor MR de la presencia de cortisol (16, 21).

1.2.2 Acciones genómica de la aldosterona:

La aldosterona posee una marcada naturaleza liposoluble, de manera que es capaz por sí sola de difundir a través de la membrana plasmática de las células diana (Figura I.3a). En ausencia de la hormona, el MR se encuentra localizado mayoritariamente en el citoplasma celular, formando un complejo principalmente con las proteínas de choque térmico HSP90 y HSP70 (Figura I.3b). Dicha interacción es indispensable para mantener el receptor en una conformación inactiva en el citoplasma celular. La interacción del MR

con el ligando produce un cambio conformacional que lo libera de estas proteínas asociadas. El complejo hormona /receptor es translocado entonces hacia el núcleo celular donde podrá actuar a modo de factor de transcripción (Figura I.3c).

Figura I.3. Acciones genómicas de la aldosterona



Las diferentes etapas que tienen lugar en el proceso de translocación nuclear de los MR activados no han sido aún elucidadas en su totalidad (21-24). Una vez en el núcleo, los receptores MR (acoplados al ligando) dimerizan entre sí reconociendo las secuencias nucleotídicas GRE presentes en las regiones promotoras de los genes dianas. Dicha interacción podría actuar a modo cooperativo, esto es, favoreciendo la posterior unión de otros factores transcripcionales moduladores y produciendo de esta manera la activación o la represión de la expresión de diferentes genes: Sgk-1, serum and glucocorticoid regulated kinase, CHIF, Channel Inducing factor, GILZ, Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper y NDRG2, N-Myc Downstream Regulated Gene (Figura I.3d). Estos genes son capaces de

modular el flujo de Na^+ y K^+ en los segmentos tubulares distales, especialmente la bomba Na^+/K^+ ATPasa, el cotransportador Na^+/Cl^- sensible a tiazidas (NCC), el canal de potasio (ROMK) y el canal epitelial de sodio (ENaC), permitiendo de esta manera el efecto fisiológico de la aldosterona: la reabsorción renal de sodio y la secreción de potasio (Figura I.3e).

1.2.3 Acciones no genómicas de la aldosterona:

Recientemente *Arima y colaboradores*, demostraron acciones vasculares no genómicas de la aldosterona, al inducir vasoconstricción en arteriolas de conejo luego de la administración de aldosterona, vía la fosfolipasa C y la activación de canales calcio dependientes (26). Las acciones no genómicas de la aldosterona han sido ampliamente documentadas utilizando segundos mensajeros (JNK, PLC, AMPc, IP3, calcio, PKA y PKC) desde finales de los años noventa en distintos tejidos celulares regulando acciones tales como el volumen celular, el transporte de iones o el equilibrio ácido base (27, 28).

1.3 Función retardada del injerto

El trasplante renal puede llevarse a cabo de donador vivo relacionado o de donador cadavérico (29). En el primer caso se trata generalmente de familiares en primer grado con los que el enfermo comparte antígenos de histocompatibilidad. Esta modalidad es la ideal porque, además del beneficio de la compatibilidad inmunológica entre familiares, la cirugía para la obtención del riñón donado, se lleva a cabo simultáneamente al trasplante en las mejores condiciones posibles. Por eso, este tipo de trasplante conlleva usualmente un alto nivel de éxito a corto y largo plazo. Sin embargo, la mayor parte de los enfermos con IRCT no tienen acceso a esta opción por diversas razones. En estos pacientes, la siguiente opción

podría ser el trasplante renal de donador cadavérico, término mal empleado ya que en realidad se trata de la donación de órganos de pacientes que se encuentran con muerte cerebral. En estos casos, la cirugía de procuración de órganos se lleva a cabo usualmente varias horas antes del trasplante y en ocasiones en una ciudad diferente en la que se encuentra el receptor. Esto significa que luego de la nefrectomía, el riñón permanecerá durante varias horas (12 a 24 h) en lo que denominamos “isquemia fría”, es decir, fuera del cuerpo, en hielo y en solución de preservación (29). En consecuencia, los injertos de este tipo de trasplante, muestran con frecuencia lo que denominamos retardo en el funcionamiento del injerto (RFI) (30, 31).

El concepto de RFI no es aun completamente consensado ya que el espectro de presentación clínica es amplio. Las manifestaciones de RFI pueden ser desde un cuadro clínico leve caracterizado por la tardanza de algunas horas en la producción de orina y/o en la disminución de los azoados posterior al trasplante, hasta el desarrollo de una insuficiencia renal aguda, caracterizada por necrosis tubular aguda y que en ocasiones requiere de apoyo dialítico durante varios días después del trasplante (30, 32). En diversas series (según las definiciones utilizadas), este fenómeno ocurre con prevalencias que van del 2 al 50 % de los casos, sin embargo podríamos decir que un número razonable es alrededor de 35 % (30, 32). Existen múltiples estudios que han analizado los factores de riesgo para el desarrollo de RFI (33, 34). De estos, sobresale el tiempo de isquemia fría, la edad del donador y el antecedente de haber tenido injerto renal previo (33-35). Así mismo, se han intentado diversas maniobras terapéuticas con el objeto de disminuir la tasa de RFI. De estas, las que han resultado ser útiles son la perfusión del riñón con soluciones de preservación (36) y la reducción al máximo del tiempo transcurrido entre la procuración del

órgano y el trasplante (37). El problema con el RFI no es solamente la insuficiencia renal aguda que sigue al trasplante, sino que existen múltiples evidencias básicas y clínicas que muestran que el RFI se acompaña de necrosis celular, con liberación de antígenos, que aceleran los procesos de rechazo agudo y crónico (12, 33, 38, 39). Por lo tanto, los injertos que desarrollan RFI se han asociado con tasas más altas de nefropatía crónica del injerto y por ende pérdida del injerto renal (11, 40, 41, 42). Por otro lado, un estudio de Medicare en Estados Unidos, mostró un incremento estadísticamente significativo en los costos de la terapia de mantenimiento de pacientes sometidos a trasplante renal, de forma directamente proporcional al tiempo de isquemia fría y a la presencia o ausencia de RFI (43). Este hallazgo también ha sido demostrado por otros grupos de trabajo (44, 45).

1.3.1 Fisiopatología del retardo en la función del injerto:

La fisiopatología del RFI está directamente relacionada con el daño secundario a isquemia fría/reperfusión, la cual se ha demostrado que origina la activación y expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales y los leucocitos (Figura I.4 y I.5). Una vez activados, los leucocitos se adhieren a las células endoteliales y transmigran al tejido intersticial (46). Los leucocitos liberan oxidantes como el superóxido, el radical hidróxilo, el peroxinitrito y el ácido hipocloroso, que lesionan las células endoteliales y epiteliales (47, 48). La lesión endotelial incrementa la producción de endotelina tipo 1 (ET-1) y reduce la liberación de óxido nítrico (ON) derivado del endotelio, de tal forma que ambas circunstancias estimulan la vasoconstricción, la agregación plaquetaria y exacerbaban la respuesta inflamatoria (49, 50). Esta serie de eventos fisiopatológicos iniciados por la isquemia/reperfusión son similares a los que ocurren durante el desarrollo de necrosis tubular aguda en enfermos con estado de choque o en sepsis (51).

Figura I.4. Cascada de eventos fisiopatológicos asociados con la isquemia renal fría

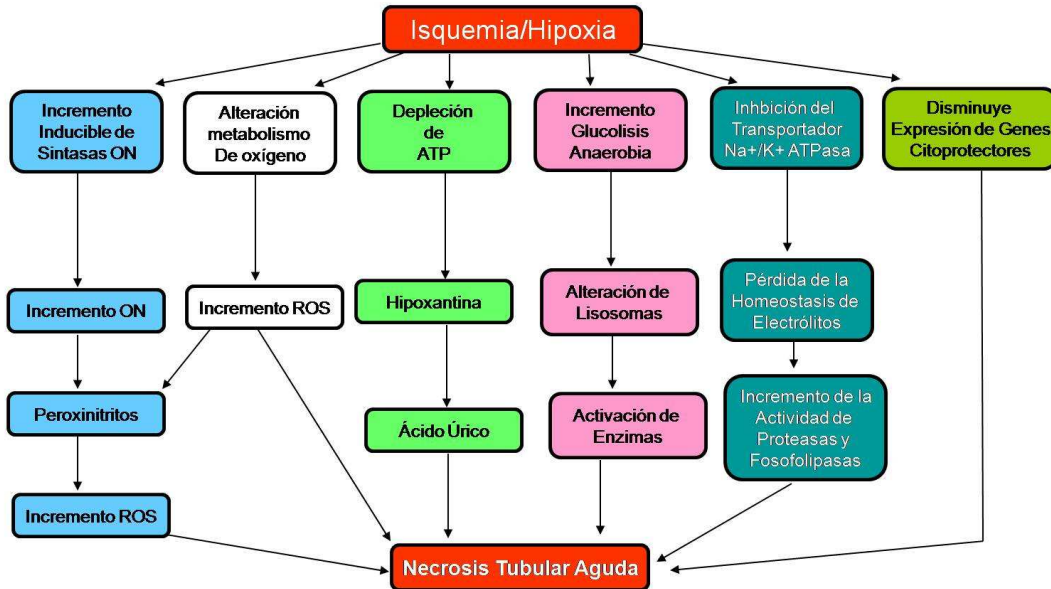
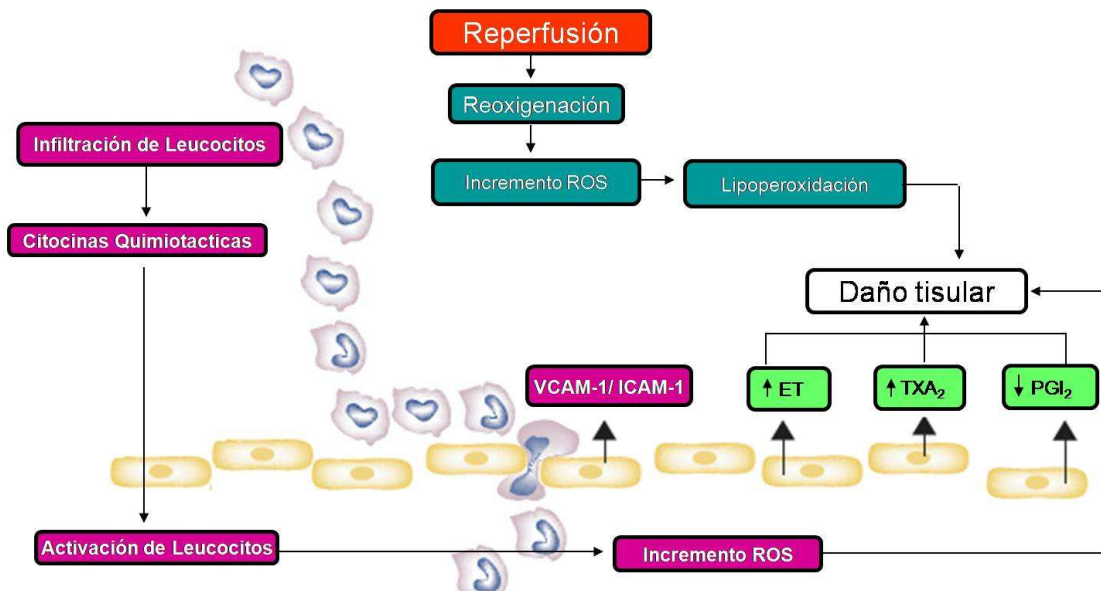


Figura I.5. Cambios celulares y bioquímicos relacionados con la reperfusión renal



1.4 Espironolactona protege al riñón del daño agudo por isquemia/reperfusión:

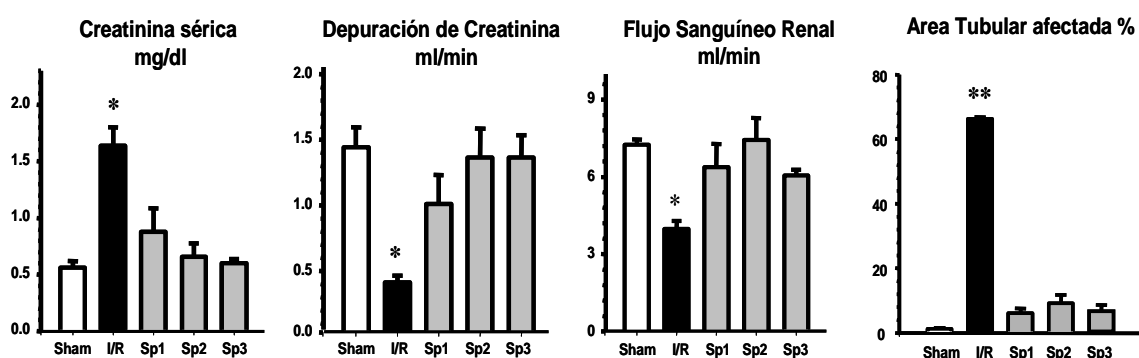
En años recientes ha habido un incremento progresivo en las evidencias que muestran que la aldosterona tiene efectos profibróticos y que juegan un papel importante en el desarrollo de varias cardiopatías y nefropatías (52). De hecho, estudios clínicos controlados han mostrado que el bloqueo de los receptores de mineralocorticoides con espironolactona o con eplerenona mejora la supervivencia de pacientes con insuficiencia cardíaca y reducen la proteinuria y la tasa de progresión hacia IRCT en pacientes con diabetes mellitus (53-56).

A mediados de los noventa, *Hostetter y cols*, en la Universidad de Minnesota, mostraron por vez primera, el papel fisiopatológico de la aldosterona en el daño renal en un modelo experimental de insuficiencia renal crónica (57). En nuestro laboratorio se ha estudiado el papel de la aldosterona en la nefropatía aguda y crónica por ciclosporina en la rata. En estos modelos hemos demostrado que la espironolactona previene por completo la toxicidad por este inmunosupresor (13, 14). Durante estos estudios, nos llamó poderosamente la atención que la espironolactona previno la caída del flujo sanguíneo y la función renal en la toxicidad aguda por ciclosporina, ambos efectos mediados por vasoconstricción aferente renal. Estas observaciones sugirieron que el bloqueo de los receptores de mineralocorticoides podría tener efecto benéfico en el modelo de isquemia/reperfusión (15)

Para analizar esta posibilidad se estudió el efecto de la administración de espironolactona 24, 48 y 72 horas antes de inducir isquemia renal bilateral en la rata (15). Este modelo se induce mediante cirugía en la cual se pinzan ambas arterias renales durante

20 minutos para inducir isquemia bilateral. Posteriormente se retiran los clamps de las arterias para permitir la reperfusión, se termina la cirugía y 24 horas después se determina el estado de la función y el daño histológico. Un resumen de este trabajo se encuentra en la Figura 6. En ésta se muestra la creatinina sérica, depuración de creatinina, el flujo sanguíneo renal y el grado de necrosis tubular. Las barras blancas representan el grupo de ratas control con operación simulada. Las barras negras muestran el grupo de ratas con isquemia/reperfusión. Las barras grises muestran los grupos de ratas con isquemia/reperfusión que fueron pretratadas con espironolactona por 24, 48 y 72 horas, respectivamente. Como muestran las gráficas, la isquemia/reperfusión resultó en una caída significativa de la función renal acompañada de caída del flujo sanguíneo renal. Estas observaciones funcionales se acompañaron de alto grado de necrosis tubular aguda. Ni los cambios funcionales, ni los estructurales se presentaron en las ratas pretratadas con espironolactona. La conclusión principal de este trabajo es que el bloqueo de los receptores de mineralocorticoides previene el daño renal por isquemia/reperfusión.

Figura 6 Efecto del bloqueo a receptores de mineralocorticoides durante el fenómeno de isquemia renal caliente/ reperfusión



El efecto renoprotector de la espironolactona por acción directa con el receptor de mineralocorticoides se ha confirmado en un estudio reciente publicado por nuestro laboratorio utilizando un modelo de ratas adrenalectomizadas (58). Todos estos resultados, han permitido establecer que el mecanismo por el cual la aldosterona induce el daño renal por isquemia reperusión está directamente relacionado con la reducción del tono vascular. Una publicación posterior de *Leopold y cols* (59), confirmó nuestros hallazgos y demostró que la asociación en la reducción del tono vascular por la aldosterona era mediante la reducción de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa enzima clave en la síntesis de NADPH (Nicotinamida-Adenina Dinucleotido Fosfato), coenzima de la glutatión reductasa, enzima que participa en la conversión del glutatión oxidado en reducido.

1.5 Justificación:

Debido a que el daño por isquemia fría/reperusión en el trasplante renal se asocia con el desarrollo de RFI, que a su vez incrementa la probabilidad de rechazo renal, cualquier maniobra que reduzca el RFI podría mejorar la función del injerto a corto y largo plazo, con lo que se disminuiría eventualmente la tasa de insuficiencia renal crónica terminal y el impacto económico que esto representa.

II.- HIPÓTESIS

Si el binomio aldosterona-receptor juega un papel importante en el daño renal por isquemia fría/ reperfusión, entonces el bloqueo farmacológico del receptor a mineralocorticoides con espironolactona, tendrá un efecto preventivo en el desarrollo de retardo en la función del injerto.

III OBJETIVOS

III.1 Principal

Determinar si el bloqueo de los receptores de mineralocorticoides tiene un efecto benéfico en el daño renal por isquemia fría/ reperfusión.

III.2 Particulares:

1. Estandarizar la técnica del trasplante renal en ratas, como modelo de isquemia fría/ reperfusión.
2. Determinar si la administración de espironolactona tiene un efecto protector sobre el desarrollo de daño renal por isquemia fría/ reperfusión.

IV.- METODOLOGIA

IV.1.- Diseño del estudio:

Experimental y básico.

IV.2 Lugar a realizar el estudio:

Unidad de Fisiología Molecular, Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán y del Instituto de Investigaciones Biomédicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

IV.3 Animales de estudio y tamaño de la muestra:

Se estudiaron cinco grupos de ratas de la cepa Wistar, especie *Ratus norvergicus*. El tamaño de la muestra se determinó de acuerdo al mínimo requerido para obtener resultados estadísticamente significativos. Todos los animales fueron machos de 280 a 350g de peso, distribuidos de la siguiente forma:

- **Grupo 1:** Ratas con cirugía simulada.
- **Grupo 2:** Ratas con cirugía simulada y tratadas durante 72 horas previas a la cirugía con espironolactona a 20 mg/kg por sonda orogástrica.
- **Grupo 3:** Ratas con nefrectomía bilateral, sometidas a trasplante de un riñón de rata normal expuesto a isquemia fría de 120 minutos y sin administración de espironolactona.
- **Grupo 4:** Ratas con nefrectomía bilateral tratadas con espironolactona 20 mg/kg, durante 72 horas previas a la cirugía , sometidas a trasplante de un riñón expuesto a

isquemia fría de 120 minutos y obtenido de ratas tratadas con espironolactona a 20 mg/kg, durante 72 horas previas a la cirugía de donación.

- **Grupo 5:** Ratas con nefrectomía bilateral, sometidas a trasplante renal de un riñón de rata normal expuesto a menos de 60 minutos de isquemia fría y sin administración de espironolactona.

IV.4 Diseño experimental:

Se dividió en tres fases: pretrasplante, trasplante y postrasplante. En la *primera fase* las ratas fueron alojadas en cajas de policarbonato de piso sólido y viruta (4 por caja) con acceso a agua y comida a libre demanda por al menos 48 horas previas al trasplante. Dependiendo del grupo de estudio, se administró vía sonda orogástrica, espironolactona 20 mg/kg/ día, desde 72 horas previas a la cirugía. La *segunda fase* consistió en realizar la nefrectomía izquierda en la rata donadora y el trasplante renal en la rata receptora, de acuerdo a lo descrito más adelante. Finalmente la *tercera fase* consistió en la vigilancia postrasplante, con sangrías de 500 microlitros de la cola de la rata, para análisis de muestras a las 24, 72 y 120 horas. Al cuarto día de la cirugía, la rata se colocaba en una jaula metabólica para recolección de orina de 24 horas y determinación de la depuración de creatinina con cuantificación del volumen urinario al quinto día postrasplante.

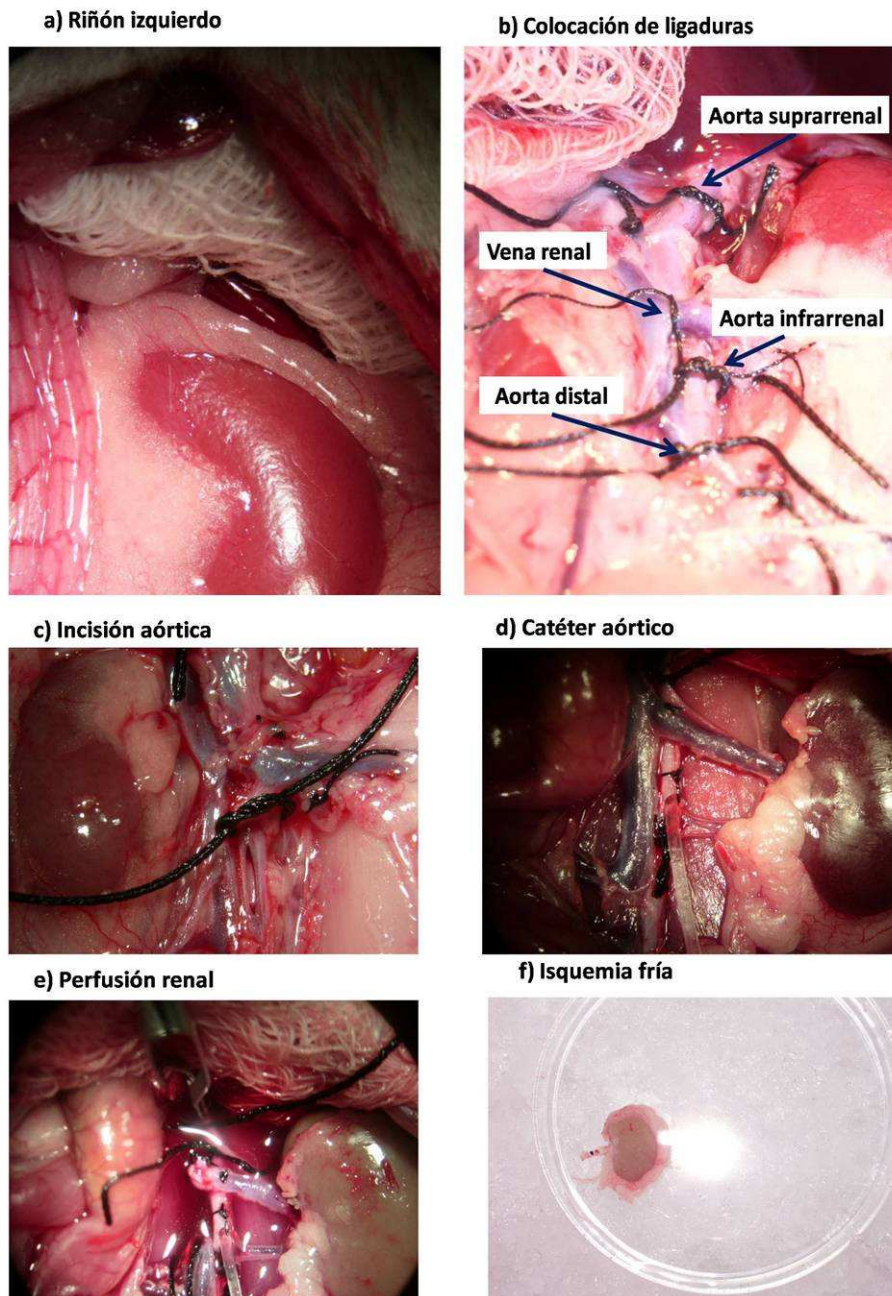
IV.4.1 Nefrectomía y perfusión:

Para la nefrectomía, la rata donadora se anestesia con pentobarbital sódico intraperitoneal (Anestosal ®), a dosis de 30 mg/Kg, administrando dosis suplementarias cada hora, según fuera necesario. La región xifopúbica es rasurada y sometida a asepsia y antisepsia con solución de iodopovidona. Posteriormente, la rata es colocada en posición

dorsal sobre una mesa de corcho con tabla térmica y sujeta con cinta adhesiva de sus cuatro extremidades. También se coloca una sonda rectal conectada a un controlador térmico, para mantener un registro continuo de la temperatura corporal a 37°C. Empleando pinzas de disección y tijeras se lleva a cabo una incisión media xifopúbica, iniciando con la piel y siguiendo con el plano musculoaponeurótico y peritoneal, extendiéndose de forma bilateral a los flancos. De esta manera son expuestos los órganos intraabdominales. Empleando una gasa húmeda en solución salina, las asas intestinales son retraídas hacia afuera y hacia el lado derecho del animal, de esta manera queda expuesto el riñón izquierdo (Figura IV.1a). Posteriormente se identifican cinco estructuras claves para realizar la nefrectomía: 1) *vena suprarrenal*, 2) *vena gonadal*, 3) *aorta suprarrenal*, 4) *aorta infrarrenal*, 5) *aorta distal* y 6) *vena renal*. La *vena suprarrenal* y la *vena gonadal* se disecan y cortan, previa colocación de nudos dobles con sutura nylon 6-0 (Ethylon, Ethicon, NJ, USA). Con excepción del uréter, el resto de las estructuras claves se disecan y aíslan mediante la colocación de nudos simples utilizando suturas nylon 3-0 (Ethylon, Ethicon, NJ, USA), (Figura IV.1b). A continuación, se realiza una incisión en la cara anterior de la *aorta infrarrenal* (Figura IV.1c), por donde un catéter de polietileno PE-50 se coloca y se fija mediante un nudo simple con sutura nylon 3-0 (Figura IV.1d). A través del catéter el riñón se perfunde con solución salina al 0.9% más 2000 U de heparina no fraccionada. Posteriormente, el *uréter izquierdo* se disecciona hasta el hueco pélvico y junto con la *vejiga* se separa de su lecho anatómico; inmediatamente debe identificarse el uréter derecho y la uretra, las cuales se disecan y cortan, previa colocación de nudos dobles con sutura nylon 6-0. En este momento, a través del catéter aórtico se administra la solución de preservación (Custodiol ®, HTK Solution, Metapharm, Canadá) hasta completar la perfusión del riñón izquierdo (Figura IV.1e). Una vez que el riñón ha sido perfundido, la

vena renal es cortada de forma transversal y próxima a la cava; de igual forma, la *arteria renal* es cortada obteniendo a su vez un *parche aórtico* de la rata donadora. Finalmente, el riñón era extraído y colocado en solución de preservación a 4°C (Figura IV.1f).

Figura IV.1 Nefrectomía y perfusión en la rata donadora

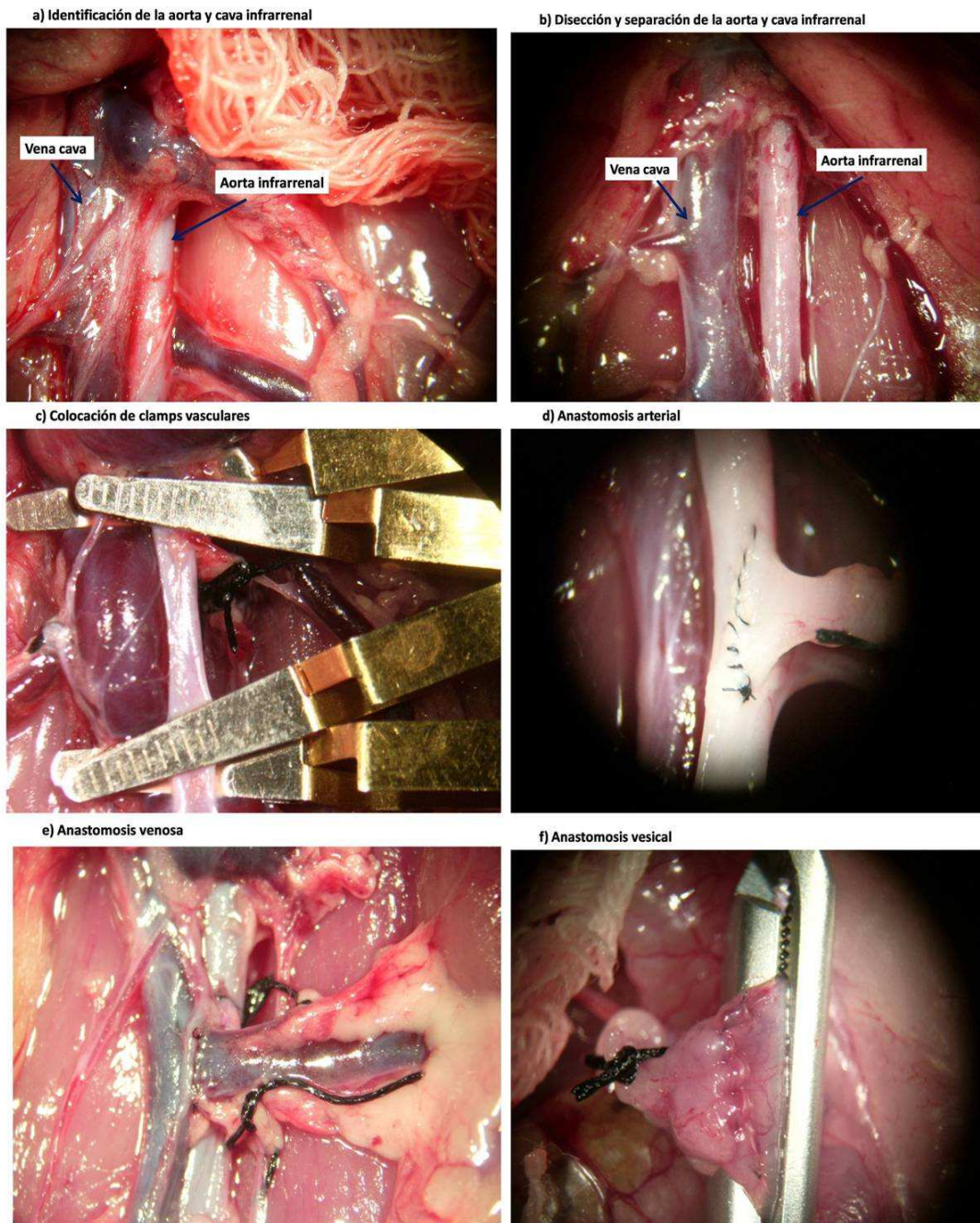


IV.4.2 Trasplante renal:

Las ratas receptoras se anestesia con pentobarbital sódico intraperitoneal (Anestosal®), a dosis de 30 mg/Kg, administrando dosis suplementarias cada hora, según fuera necesario. La región xifopúbica es rasurada y sometida a asepsia y antisepsia con solución de iodopovidona. Posteriormente, la rata es colocada en posición dorsal sobre una mesa de corcho con tabla térmica y sujeta con cinta adhesiva de sus cuatro extremidades. También se coloca una sonda rectal conectada a un controlador térmico, para mantener un registro continuo de la temperatura corporal a 37°C. Empleando pinzas de disección y tijeras se lleva a cabo una incisión media xifopúbica, iniciando con la piel y siguiendo con el plano musculoaponeurótico y peritoneal. Inmediatamente se colocan de ambos lados retractores de pared que se fijan con cinta adhesiva a la mesa de corcho. De esta manera quedan expuestos los órganos intraabdominales. Empleando una gasa húmeda en solución salina, las asas intestinales son retraídas hacia fuera y hacia el lado derecho del animal. Utilizando pinzas de disección y ligaduras nylon 3-0 se llevaba a cabo la nefrectomía izquierda, previa ligadura de los vasos y el uréter ipsilateral. La aorta y la cava son ahora identificadas y mediante pinzas de disección separadas (Figuras IV.2a, IV.2b). Posteriormente, sobre la aorta y cava son colocados los clamps vasculares (Braun, Biemer, Germany) de forma próximal y distal a los vasos renales (Figura IV.2c). Colocados los clamps, se realiza una arteriostomía en la cara anterior de la aorta con posterior anastomosis de la arteria renal mediante súrgete continuo con sutura nylon 9-0 (Ethylon, Ethicon, NJ, USA) (Figura IV.2d); luego de lo anterior, a nivel de la vena cava se realiza una venotomía seguida de anastomosis de la vena renal de forma similar a la arteria renal (Figura IV.2e). Terminadas las anastomosis vasculares, se realiza la anastomosis del

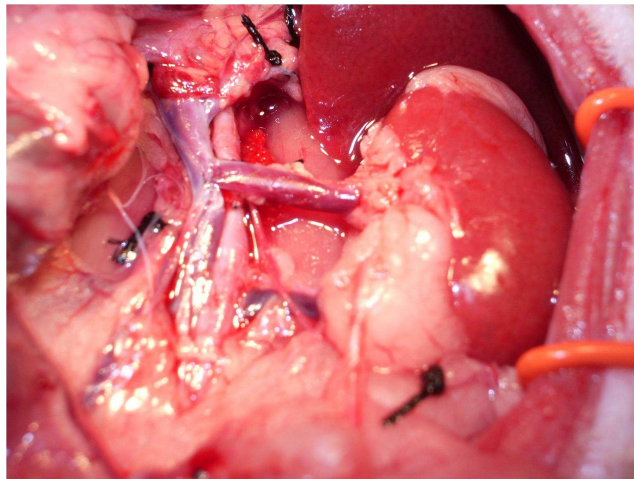
parche vesical sobre la vejiga nativa de la rata receptora, empleando para esto sutura nylon 6-0 (Ethylon, Ethicon, NJ, USA) (Figura IV.2f).

Figura IV.2 Secuencia en el trasplante renal en rata con anastomosis latero-terminal



A continuación, con apoyo de pinzas de disección y sutura nylon 3-0, se realiza la nefrectomía derecha, de esta manera la rata receptora sólo queda con el injerto renal. Antes del cierre de la cavidad abdominal, se evalúa la adecuada reperfusión renal y se descarta hemorragias o trombosis vasculares (Figura IV.3) y se administra ceftriaxona genérica 30 mg/kg intraperitoneal. Finalmente, la cavidad abdominal se cierra en dos planos, el primero musculoaponeurótico y el segundo la piel con suturas nylon 3-0.

Figura IV.3 Trasplante renal experimental



IV.4.3 Vigilancia postoperatoria:

Luego de la cirugía, los animales son colocados en cajas de poliuretano y viruta con acceso a agua a libre demanda de durante tres días. Todas las ratas reciben paracetamol genérico como analgésico, a dosis de 100 mg/ kg, diluido en solución glucosada al 5% durante las primeras 72 horas del posoperatorio. A partir del tercer día las ratas reciben agua y alimento a libre demanda.

IV.5 Consideraciones éticas:

Todos los animales fueron manejados de acuerdo a la norma mexicana NOM-062-ZOO-1999 de manejo y uso de animales de experimentación. El estudio se considera con nivel I de bioseguridad para el personal que maneja los animales. En tanto la afectación de los animales fue de categoría D. Los animales donadores renales, luego de la nefrectomía y los animales receptores del injerto al término del estudio, fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital intraperitoneal (120 mg/Kg). Confirmada la muerte del animal, el cadáver era eliminado de acuerdo a lo dispuesto en la NOM-087-ECOL-1995, capítulo 6.

IV.6 Variables

IV.6.1 Dependientes:

Retardo de la función del injerto

IV.6.2 Independientes:

Tiempo quirúrgico en la nefrectomía, tiempo de isquemia renal fría/reperfusión, tiempo quirúrgico en el trasplante, tiempo de anastomosis arterial, tiempo de anastomosis venosa, tiempo de anastomosis vesical, trombosis vascular, dehiscencia de anastomosis vascular, dehiscencia de anastomosis vesical y temperatura corporal.

IV.6.3 Definición operacional de variables (Anexo I)

IV.6.4 Hoja de captura de variables (Anexo II)

IV.7 Análisis estadístico

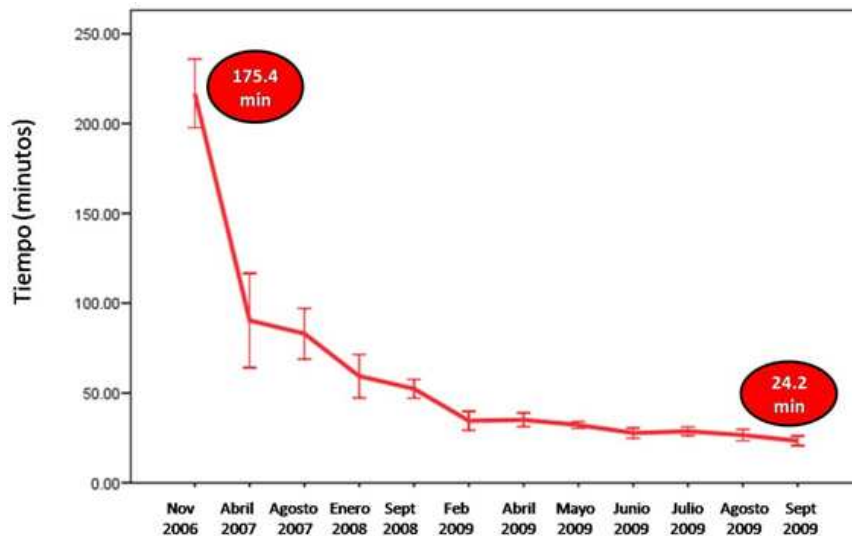
Se utilizó estadística descriptiva paramétrica y no paramétrica, dependiendo de la distribución de variables. Para las variables continuas, se utilizó media y error estándar de la media. Para las variables nominales u ordinales dicotómicas se empleó número de casos (n) y porcentajes (%). La comparación de medias se realizó con la prueba T de Student no pareada y la comparación de medias de más de dos grupos se realizó con ANOVA de dos colas. El nivel de significancia fue establecido con un valor de P menor a 0.05.

V.- RESULTADOS

V.1 Estandarización de la nefrectomía y perfusión renal:

De acuerdo con nuestro primer objetivo, se inició la estandarización de la técnica de trasplante renal. De forma inicial, se llevo a cabo la técnica quirúrgica para la extracción del riñón izquierdo. Se realizaron un total de 225 nefrectomías. La curva de aprendizaje en la estandarización de esta técnica se observa en la Figura V.1. La comparación del tiempo quirúrgico inicial 175.4 ± 45.1 min (noviembre-06) *versus* el final 24.2 ± 3.8 min (septiembre-09) fue estadísticamente significativo ($P < 0.001$).

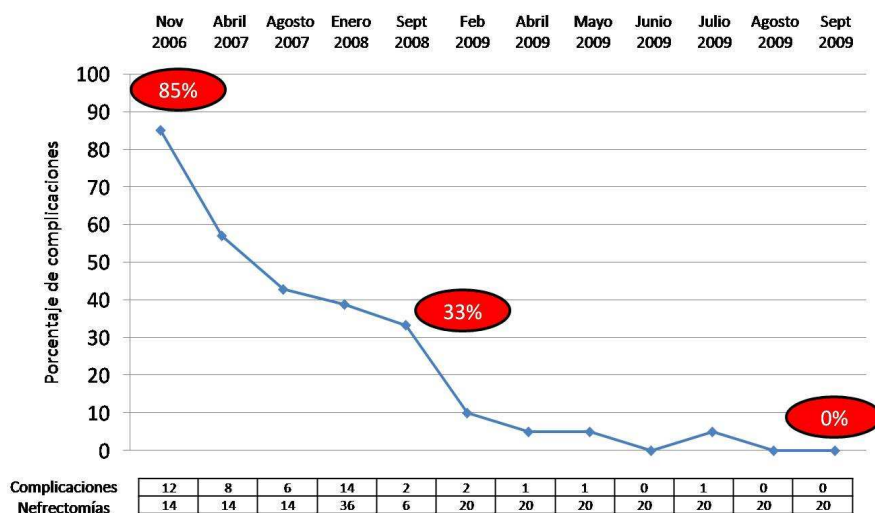
Figura V.1 Evolución del tiempo quirúrgico en la estandarización de la técnica de nefrectomía en ratas.



Durante la estandarización de la técnica, se presentaron un total de 97 complicaciones (43.1%) asociadas con el procedimiento quirúrgico: 1) hemorragias 47 (20.8%), 2) lesiones vasculares 14 (5.3%), 3) desgarro de la capsula de Gerota 12 (5.3%), 4) sobredosis de anestesia 8 (3.5%), 5) lesiones del uretero 8 (3.5%), 6) hipotermia 6

(2.6%) y 7) lesión vesical 2 (0.8%). Con una reducción en el porcentaje de complicaciones de 85% en Noviembre-06, hasta prácticamente ninguna en Junio-09 (Figura V.2).

Figura V.2 Complicaciones a través del tiempo en la estandarización de un modelo quirúrgico de nefrectomía en ratas.

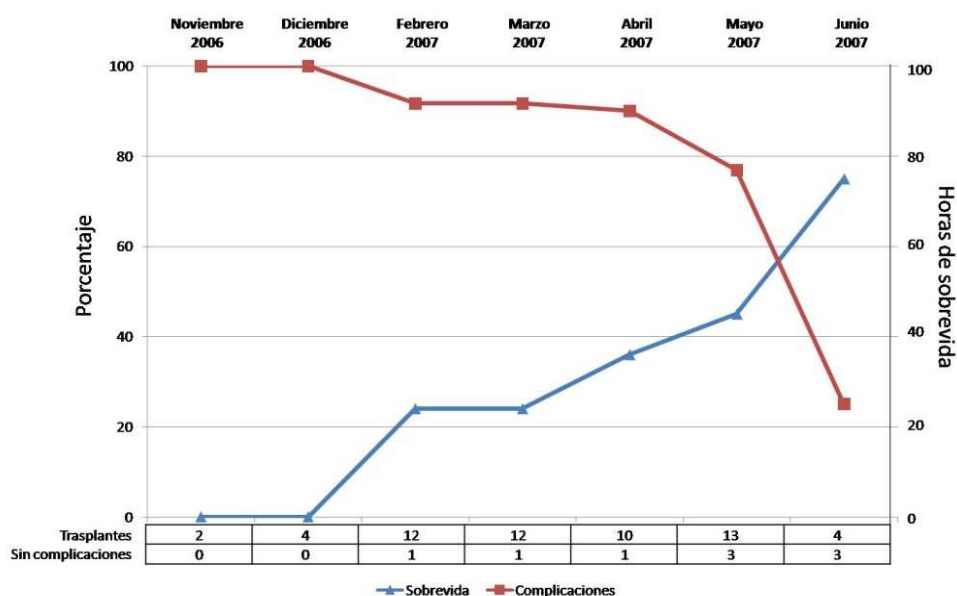


V.2 Estandarización del trasplante renal experimental:

De forma paralela a la nefrectomía, se inició el proceso de estandarización de la técnica de trasplante renal. En una *primera fase* se realizaron 57 trasplantes utilizando la técnica de anastomosis vascular termino-terminal y anastomosis vesical con parche de vejiga. Se registraron 48 complicaciones (84.2%) asociadas con la cirugía: 1) trombosis arterial 16 (33.3%), 2) hemorragia arterial 9 (18.8%), 3) trombosis venosa 8 (16.6%), 4) hemorragia venosa 6 (12.5%) 5) hipotermia 6 (12.5%) y 6) sobredosis de anestesia 3 (6.3%). La curva en la estandarización de la técnica se observa en la Figura V.3. Se demostró un incremento en la supervivencia inversamente proporcional con la reducción en la frecuencia de complicaciones asociadas al procedimiento quirúrgico. Al final del

seguimiento se registró una sobrevida del 75% y solo un 25% de complicaciones asociadas con la cirugía. Del total de trasplantes realizados, solo 9 ratas no presentaron complicaciones, de las cuales únicamente 3 ratas (33.3%) lograron sobrevivir al quinto día postrasplante. El resto de los animales fallecieron en las primeras 72 horas del postrasplante, las autopsias revelaron, 4 ratas con trombosis de la anastomosis arterial y 2 ratas con trombosis de la anastomosis venosa.

Figura V.3 Curvas de sobrevida del injerto renal y de complicaciones asociadas con el trasplante renal utilizando la técnica de anastomosis termino-terminal.



Con base en estos resultados, se inició una *segunda fase* en la estandarización del trasplante renal en ratas modificando el tipo de anastomosis vascular. Se realizaron 23 trasplantes con anastomosis latero-terminal y 30 trasplantes con anastomosis termino-terminal. La comparación de ambas técnicas se muestra en la Tabla V.1. Se demostró un menor tiempo quirúrgico total y un menor tiempo de anastomosis arterial, con la técnica de anastomosis latero-terminal, de forma estadística significativa.

Tabla V.1. Comparación de dos técnicas anastomosis vasculares en un modelo experimental de trasplante renal.

Variables	General n= 55	Anastomosis termino- terminal n= 32	Anastomosis latero-terminal n= 23	P
Peso donadora	292.8±35.3	303.8±36.9	277.6±26.9	0.320
Peso receptora	287.7±31.3	297.4±32.2	274.4±24.0	0.265
Tiempo de isquemia caliente	9.3±11	8.4±5.1	10.5±16.2	0.485
Tiempo de isquemia fría	315.0±104.4	305.2±103.6	296.1±107.7	0.752
Tiempo anastomosis arterial	41.6±16.8	47.3±18.5	33.7±9.9	0.004
Tiempo anastomosis venosa	43.6±12.2	44.9±11.6	41.7±13.1	0.349
Tiempo anastomosis vesical	18.9±8.4	18.2±9.1	20.1±7.5	0.414
Tiempo quirúrgico total	204.5±92.5	233.9±106.8	163.6±44.1	<0.001

Por otro lado, la comparación de las complicaciones asociadas con las técnicas se muestra en la Tabla V.2. Se demostró una frecuencia menor de complicaciones quirúrgicas, con la técnica de anastomosis vascular termino-terminal ($P < 0.001$). Sin embargo, con ambas técnicas la sobrevida del injerto renal al quinto día del trasplante fue baja ($P = NS$).

Con base en los resultados anteriores, se continuó con una *tercera fase* con el objetivo de alcanzar la estandarización de la técnica de trasplante renal. Ésta consistió en una estancia de investigación para recibir capacitación en la técnica quirúrgica en la Unidad de Nefrología Experimental del Hospital Universitario de Bellvitge, en Barcelona España. La Tabla V.3, muestra las principales diferencias encontradas al comparar nuestra técnica con la técnica del grupo español.

Tabla V.2 Comparación de complicaciones de dos técnicas anastomosis vasculares en un modelo experimental de trasplante renal.

Complicaciones	Anastomosis	Anastomosis	P
	termino-terminal n= 32	latero-terminal n= 23	
Sin complicaciones (%)	13 (40.7)	0 (0)	< 0.001
Tipos de complicaciones			
Hemorragia (%)	5 (15.6)	8 (34.8)	0.184
Trombosis venosa (%)	4 (12.5)	1 (4.4)	0.574
Trombosis arterial (%)	5 (15.6)	1 (4.4)	0.376
Broncoaspiración (%)	3 (9.4)	1 (4.4)	0.856
Estenosis venosa (%)	1 (3.1)	2 (8.6)	0.768
Sobredosis de anestesia (%)	0 (0)	3 (13)	0.167
Estenosis aórtica (%)	0 (0)	4 (17.2)	0.072
Estenosis cava (%)	0 (0)	1 (4.4)	0.818
Torsión venosa (%)	0 (0)	1 (4.4)	0.818
Necrosis intestinal (%)	1 (3.1)	0 (0)	0.818
Desprendimiento de uréter (%)	0 (0)	1 (4.4)	0.818
Sobrevida del injerto renal	1 (3.1)	0 (0)	0.818

La capacitación consistió en tres fases, la *primera* fue la observación de videos de cirugías previas; la *segunda* fue la observación de cirugías *in vivo* y la *tercera* fue la realización de cirugías bajo supervisión continua. Al finalizar la capacitación y de regreso en México, se continuó con el desarrollo de habilidades técnico quirúrgicas durante un periodo aproximado de 6 meses. Durante el periodo de capacitación se demostró una diferencia estadística significativa entre el tiempo quirúrgico inicial (154 ± 21.7 min) *versus* tiempo quirúrgico realizado al final de la curva de aprendizaje (72.2 ± 2.06 min (Figura V.4).

Tabla V.3 Comparación de las principales variables relacionadas con el trasplante renal experimental.

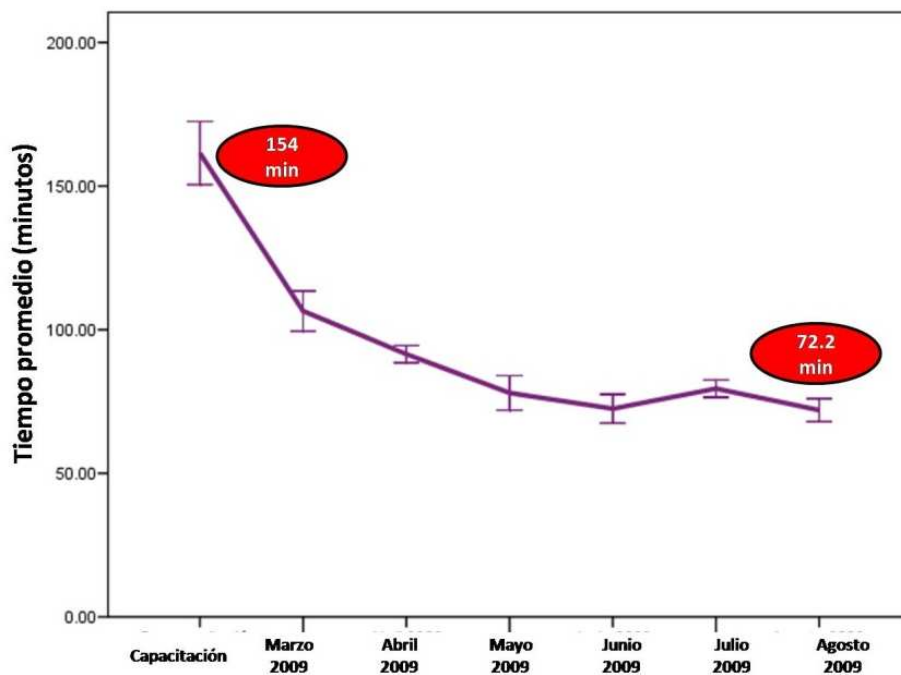
VARIABLES	Hopital de Bellvitge	INNSZ
Trasplante entre especies	Lewis a Lewis y Brauw a Wistar	Wistar a Wistar
Anestesia en rata donadora	Ketamina + Atropina + Diacepam	Pentobarbital
Anestesia en rata receptora	Fentanil + Naloxona	Pentobarbital
Tiempo nefrectomía [†]	20 minutos	60 minutos
Tiempo trasplante [‡]	60 minutos	150 minutos
Sobrevida del trasplante [¶]	70-80 %	0%
Complicaciones	Lesiones del uréter	Hemorragia, Estenosis aórtica y Sobredosis de anestesia

†Tiempo promedio aproximado en realizar una nefrectomía

‡Tiempo promedio aproximado en realizar un trasplante

¶ Sobrevida del injerto al quinto día postrasplante

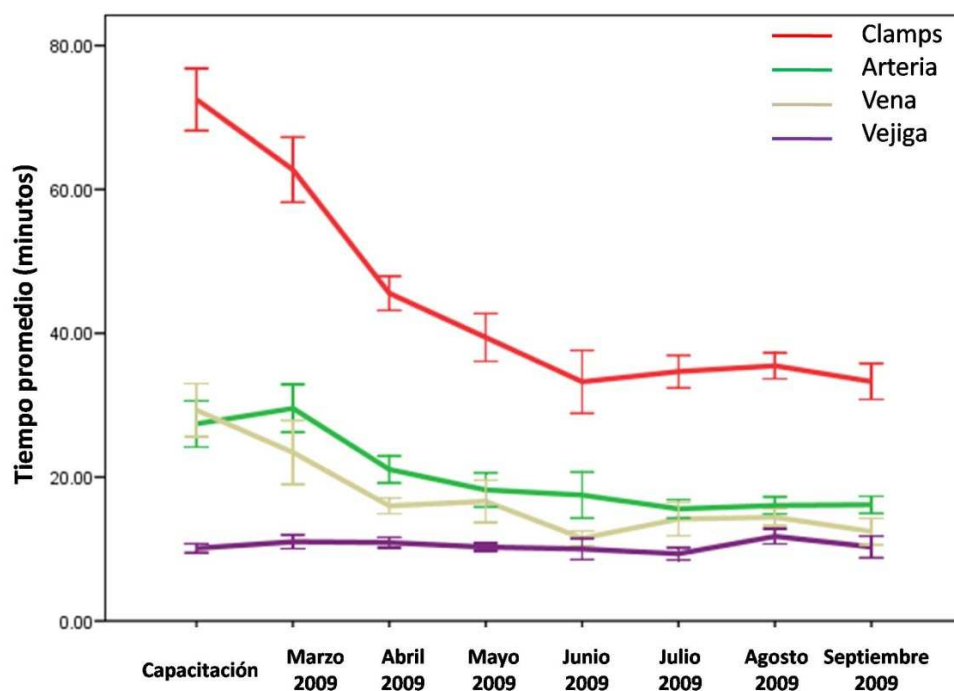
Figura V.4 Evolución del tiempo quirúrgico total en la estandarización del trasplante renal con anastomosis vascular latero-terminal en ratas.



De forma específica, las variables quirúrgicas de interés en la estandarización de la técnica se observan en la Figura V.5. Con excepción del tiempo quirúrgico realizado en la

anastomosis vesical, la comparación de los demás tiempos quirúrgicos mostraron una reducción estadísticamente significativa (Tabla V.4).

Figura V.5 Evolución de las variables quirúrgicas de interés en la estandarización del trasplante renal con anastomosis vascular latero-terminal



Finalmente, como se muestra en la tabla V.4, se documentó un incremento en el porcentaje de sobrevida de las ratas, a partir del mes de abril 2009 del 15.7% hasta 65% en el mes de julio 2009. Con estos resultados se finalizó el periodo de estandarización de la técnica de trasplante renal con anastomosis vascular latero-terminal.

Tabla V.4 Variables quirúrgicas de interés en la estandarización de la técnica de trasplante renal con anastomosis latero-terminal.

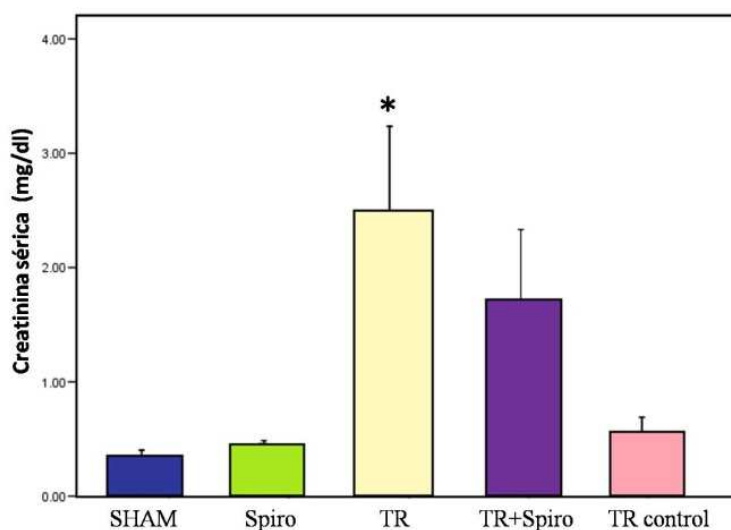
Variables	Capacitación	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Sept.	P
No de Trasplantes	10	20	19	20	20	20	18	9	-
Tiempo de Clamps $X \pm DE$	72.5 \pm 6.8	61.3 \pm 9.7	45.4 \pm 4.9	39.2 \pm 7.1	33.2 \pm 6.2	34.6 \pm 3.9	35.6 \pm 3.5	35 \pm 5.1	<0.001
Tiempo de anastomosis arteria $X \pm DE$	27.4 \pm 5.09	28.9 \pm 6.6	20.8 \pm 3.9	18.2 \pm 5.0	17.5 \pm 4.5	15.5 \pm 2.2	15.8 \pm 2.4	16.25 \pm 1.4	<0.001
Tiempo de anastomosis vena $X \pm DE$	29.3 \pm 5.8	22.9 \pm 8.1	16.1 \pm 2.2	16.5 \pm 6.2	11.5 \pm 1.4	14.2 \pm 4	14.3 \pm 2.6	12.3 \pm 2.3	<0.001
Tiempo de anastomosis vesical: $X \pm DE$	10 \pm 0.9	11 \pm 1.8	10.8 \pm 1.5	10.2 \pm 1.2	9.3 \pm 1.5	10 \pm 2	11.7 \pm 2.1	10.5 \pm 1.9	0.876
No de ratas vivas	0	0	3	4	11	13	12	6	-
Porcentaje de ratas vivas	0	0	15.7	20	55	65	66	66	-

V.3 Efecto de la espironolactona en la evolución del trasplante renal:

Para evaluar el efecto del bloqueo a receptores de mineralocorticoides en la evolución del trasplante renal, fueron seleccionados animales con trasplante renal y sin complicaciones quirúrgicas aparentes. El impacto de la espironolactona en los niveles de creatinina sérica se observa en la Figura V.6. Las cifras de creatinina sérica se determinaron al quinto día de la cirugía, con los siguientes resultados: 1) ratas con cirugía simulada, SHAM (n=5): 0.35 \pm 0.09 mg/dl, 2) ratas con espironolactona, SPIRO (n=5): 0.46 \pm 0.05 mg/dl, 3) ratas con trasplante renal (isquemia fría promedio de 120 minutos), TR (n=5): 2.49 \pm 1.99 mg/dl y 4) ratas con trasplante renal con previa administración de espironolactona, TR+SPIRO (n=5): 1.72 \pm 1.51 mg/dl y 6) ratas con trasplante renal control (isquemia fría menor de 60 minutos), TR control (n=4): 0.5 \pm 0.2 mg/dl. La comparación entre grupos mostró una diferencia estadística significativa entre las ratas TR *versus* ratas TR control (P= 0.03), sin embargo, la comparación entre el grupo TR *versus* TR+SPIRO no fue estadísticamente significativa (P= 0.459). En tanto, la comparación entre ratas SHAM *versus* ratas TR control, ratas SPIRO *versus* ratas TR control y ratas SPIRO *versus*

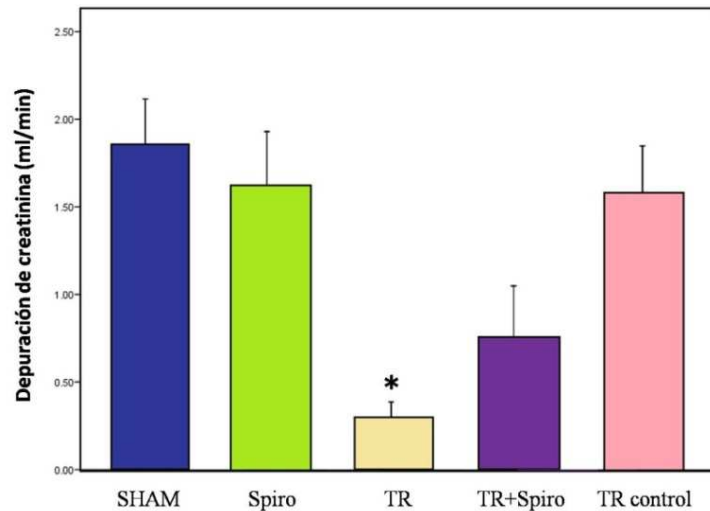
ratas TR+SPIRO tampoco mostró diferencia estadística significativa. Por otro lado, el efecto de la espironolactona en la depuración de creatinina (ClCr) en muestras de orina recolectadas durante 24 horas, se muestran en la Figura V.7. Los resultados en las determinaciones de la ClCr al quinto día de la cirugía fueron: 1) ratas SHAM 1.85 ± 0.59 ml/min, 2) ratas SPIRO 1.62 ± 0.69 ml/min, 3) ratas TR 0.29 ± 0.26 ml/min, 4) ratas TR+SPIRO 0.76 ± 0.71 ml/min y 5) ratas TR control fue 1.57 ± 0.46 ml/min. La comparación entre grupos mostró una diferencia estadística significativa entre el TR *versus* TR control ($P= 0.017$), en tanto, la comparación entre el grupo TR *versus* TR+SPIRO no mostró diferencia estadísticamente significativa ($P= 0.132$), así como tampoco la comparación entre ratas SHAM *versus* ratas TR control ($P= 0.516$), SPIRO *versus* TR control ($P= 0.921$) y SPIRO *versus* TR+SPIRO ($P= 0.074$).

Figura V.6 Efecto de la administración de espironolactona en los niveles séricos de creatinina postrasplante



* TR *versus* TR control: *T de Student* < 0.001

Figura V.7 Efecto de la administración de espironolactona en la depuración de creatinina

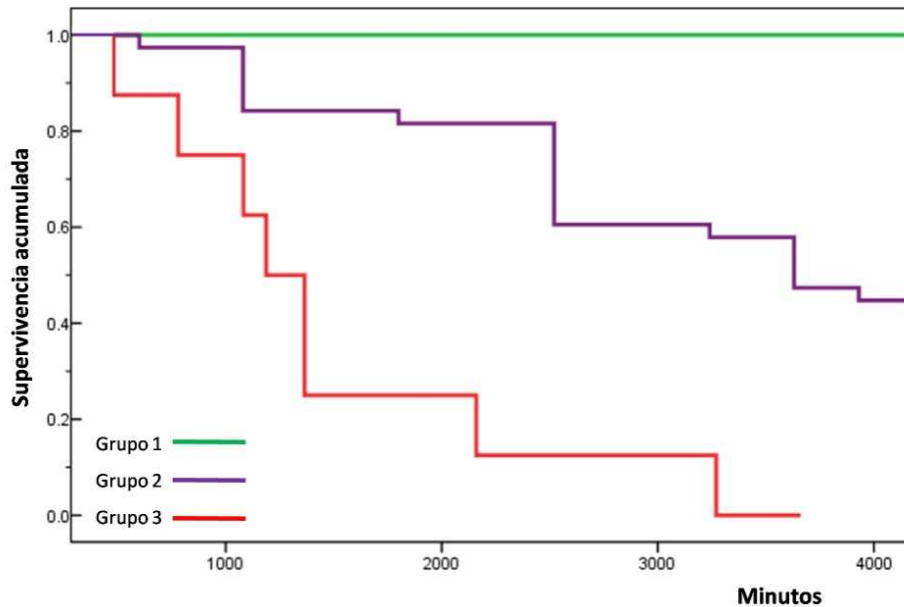


* TR versus TR control: *T de Student* = 0.03

V.4 Efecto de la isquemia fría/ reperfusión en la sobrevida:

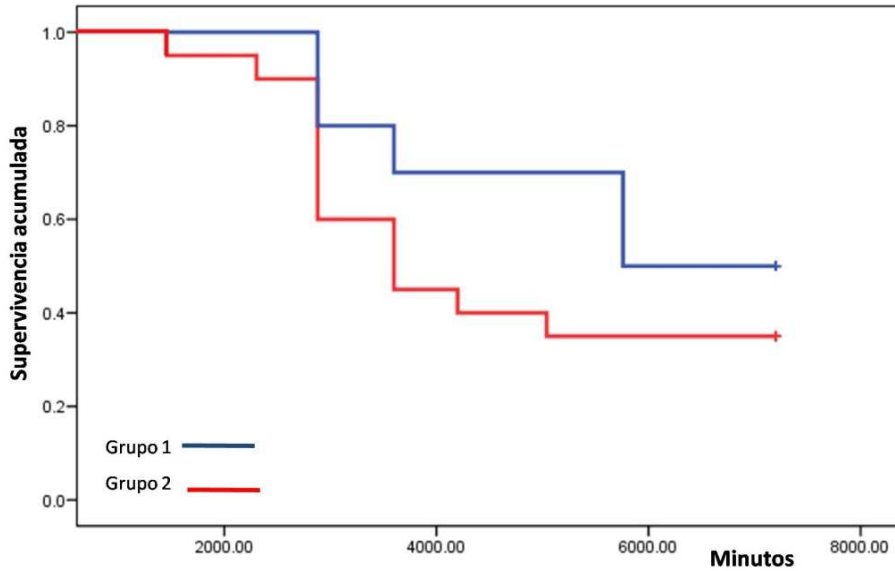
El tiempo promedio de isquemia fría/ reperfusión de las ratas estudiadas hasta ahora fueron: 1) ratas TR: 119 ± 24.9 min, 2) ratas TR+SPIRO: 113 ± 12 min y 3) ratas TR control de 55 ± 10.9 min. Para evaluar el posible efecto del tiempo de isquemia fría/ reperfusión en la evolución del trasplante se analizó la sobrevida de las ratas con trasplante renal en tres grupos con distintos tiempos de isquemia fría (Figura V.8). El grupo 1, fueron ratas con injerto renal sometido a isquemia fría/ reperfusión menor de 60 min (n=4); el grupo 2, fueron ratas cuyo injerto renal se sometió a isquemia fría de 120 min (n=18), finalmente, el grupo 3, fueron ratas donde el riñón se sometió a 240 min de isquemia fría (n= 7). Los resultados mostraron una mejor sobrevida a menor tiempo de isquemia fría ($P < 0.001$).

Figura V.8 Impacto del tiempo de isquemia fría/ reperfusión en la sobrevida de las ratas sometidas a trasplante renal



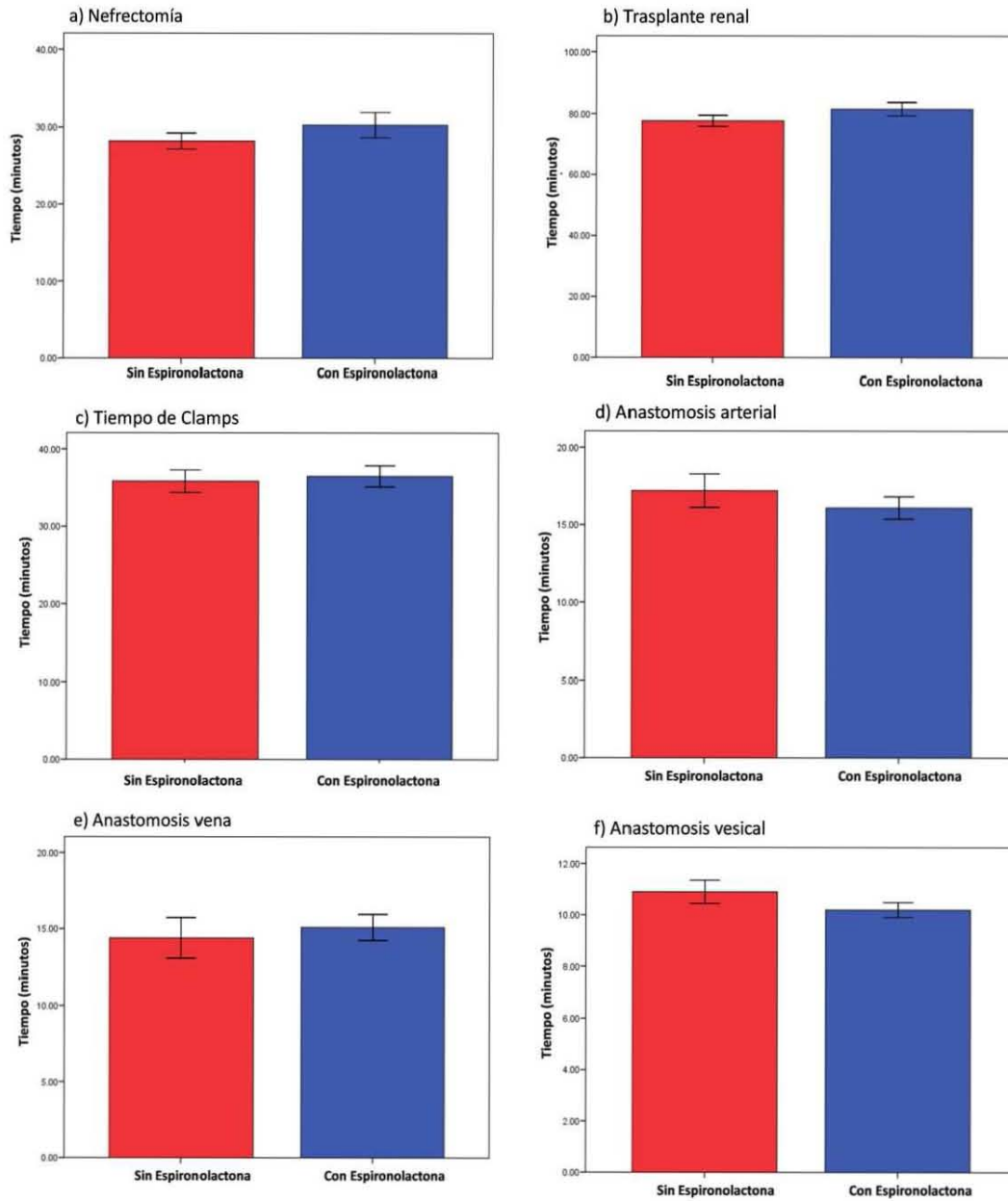
Posteriormente, evaluamos el impacto del bloqueo a receptores de mineralocorticoides en la sobrevida de las ratas sometidas a trasplante renal. El grupo 1 (n= 14), fueron ratas sometidas a trasplante renal donde ambas ratas (donadora y receptora) recibieron espironolactona desde 72 horas previas a la cirugía. El grupo 2 (n= 19), fueron ratas con trasplante renal sin administración de espironolactona. Como se muestra en la Figura V.9, no se demostró una diferencia estadística significativa ($P= 0.281$), para un tiempo de isquemia fría en el *grupo 1* de 122.65 ± 23.20 versus el tiempo de isquemia fría en el *grupo 2* de 119.47 ± 19.5 ($P=0.778$).

Figura V.9 Efecto del bloqueo a receptores de mineralocorticoides en la supervivencia de ratas sometidas a trasplante renal



Para analizar el resultado del efecto de la espironolactona en la supervivencia de las ratas trasplantadas, fueron evaluadas las variables relacionadas con la cirugía de las ratas sin espironolactona (SE) *versus* ratas con espironolactona (CE) (Figura V.10): 1) tiempo quirúrgico en la nefrectomía: SE 28.2 ± 1.04 *versus* CE 30.2 ± 1.65 min ($P=0.275$); 2) tiempo quirúrgico en el trasplante renal: SE 77.6 ± 1.8 *versus* CE 83.7 ± 2.9 min ($P=0.830$); 3) tiempo de clamps vasculares: SE 35.8 ± 1.4 *versus* CE 36.5 ± 1.3 min ($P=0.778$); 4) tiempo de anastomosis arterial: SE 17.2 ± 1.07 *versus* CE 16.1 ± 0.72 min ($P=0.503$); 5) tiempo de anastomosis venosa: SE 14.4 ± 1.3 *versus* CE 15.1 ± 0.86 min ($P=0.728$); y 6) tiempo de anastomosis vesical: SE 10.9 ± 0.45 *versus* CE 10.2 ± 0.29 min ($P=0.310$).

Figura V.10 Comparación de variables quirúrgicas de interés relacionadas con la sobrevida de ratas sometidas a trasplante renal



VI.- DISCUSIÓN

El trasplante renal en ratas ha sido un modelo experimental clásico en la formación de recursos humanos en microcirugía (60). En la última década, las publicaciones científicas utilizando este modelo en la investigación de daño renal por isquemia fría/reperfusión, hipertensión arterial, rechazo agudo y en la nefropatía crónica del injerto se han incrementado significativamente (61). La primera descripción de la técnica fue publicada por *Fisher y Lee* en 1965 y presentada inicialmente en 1961 en la Reunión Nacional del Colegio Americano de Cirujanos en Chicago, Estados Unidos (62, 63). A partir de entonces, han sido publicadas distintas variaciones a la técnica original, mejorando las técnicas de anastomosis vascular y ureteral, con el objetivo de reducir las complicaciones postquirúrgicas y el tiempo de isquemia caliente, todo ello con la intención de favorecer la reproducibilidad de la técnica (64-67).

Basado en lo anterior, nosotros nos planteamos como primer objetivo estandarizar el trasplante renal en ratas, como una técnica de laboratorio que permita el desarrollo de investigación biomédica en México (68). Para lo anterior, nosotros realizamos una revisión en la literatura de todas las técnicas quirúrgicas hasta ahora conocidas y posteriormente recibimos capacitación en técnicas de microcirugía hasta alcanzar las habilidades quirúrgicas necesarias para la reproducibilidad de la técnica.

Nuestros resultados muestran las curvas de aprendizaje de los primeros 100 consecutivos trasplantes renales en rata realizados en nuestro laboratorio. Las curvas de aprendizaje en el modelo del trasplante renal experimental han sido evaluadas y publicadas previamente por *Hölzen y cols* (69). De acuerdo con sus resultados, el éxito en las cirugías no solo depende de la correcta secuencia de pasos para llevar a cabo el trasplante, sino

también en la rapidez con la que se lleve a cabo la técnica. Para alcanzar la estandarización, ellos recomiendan realizar un rango de 50 a 100 cirugías por alumno, mientras que, para garantizar la sobrevivencia del animal, estas deberán realizarse con un tiempo de isquemia caliente menor a 30 minutos y en un tiempo quirúrgico total menor de 90 minutos (69). Sin embargo, un punto importante en el que *Hölzen y cols*, centran su discusión, son en los requisitos fundamentales para alcanzar con éxito la estandarización de la técnica. Ellos consideran como factores a resaltar: 1) suficientes recursos financieros, 2) adecuada infraestructura del laboratorio, 3) personal experimentado en la técnica y 4) alumnos cuya personalidad se caracterice por una motivación y compromiso de trabajo superior al promedio. Estas observaciones, también han sido descritas por otros grupos de trabajo en el área (70, 71). *Mikó y cols*, describieron la experiencia de 15 años en la enseñanza de técnicas de microcirugía a alumnos de distintas áreas de interés: cirujanos, investigadores y alumnos de posgrado (70). Ellos sugieren una serie de principios necesarios para la estandarización de la técnica: 1) *actividad*, considerada como la práctica diaria en sesiones de hasta 4 horas, previa revisión de videos y de la literatura; 2) *sincronía*, definida por la retroalimentación alumno maestro; 3) *prácticas video asistidas*, en la cual, el alumno realiza grabaciones de sus cirugías y posteriormente bajo la supervisión de un maestro son revisadas, evaluando de esta manera, los movimientos de su práctica quirúrgica y permitiendo así corregir redundancias en el manejo del instrumental quirúrgico; 4) *individualización*, fundamentada en la premisa que el dominio de la técnica solo dependerá de la práctica diaria del alumno; y 5) *análisis*, en el cual se lleva a cabo un registro semanal de las variables relacionadas con la cirugía, lo que permitirá la corrección en las fallas, desarrollando así una visión autocrítica de la misma.

En la misma línea, el grupo del Dr. Gassel en Alemania, publicó la experiencia de 10 años en la capacitación de técnicas de microcirugía tanto a personal médico como investigadores biomédicos (71). Ellos consideran, que el éxito de la cirugía depende en gran medida de la organización y equipamiento de la unidad de investigación. El contar con un adecuado equipo quirúrgico, área de trabajo con mesas individuales y microscopios bifocales conectados a una pantalla de televisión y videograbación, así como la asesoría adecuada por personal con experiencia en el área, permitirá en un momento dado estandarizar la técnica. Por otro lado, uno de los grupos pioneros en la enseñanza de la técnica, ha sido el grupo del Dr. Ullrich Spiegel, en Alemania (69). Ellos describen el trasplante renal experimental como un modelo complicado y difícil de aprender por parte de los alumnos, en el que en muchos casos se requiere de una enseñanza a largo plazo, basado en un plan de estudios, con objetivos de aprendizaje claros y adaptados a las necesidades individuales de cada proyecto y persona (69). Este grupo considera que la formación de recursos humanos debe ser dividida en dos partes, la teórica y la científica, así como la experimental y la práctica, siempre bajo la supervisión y bajo una serie de pasos técnicos encaminados a desarrollar las habilidades quirúrgicas necesarias (69).

De acuerdo con nuestros resultados en la estandarización de la técnica, estos podemos dividirlos en dos periodos: 1) *pre-capacitación*: de noviembre del 2006 a diciembre del 2008 y 2) *post-capacitación*: de enero a junio del 2009.

Como se demostró, los trasplantes realizados durante el primer periodo muestran pocos resultados exitosos, debidos quizás, a un aprendizaje prácticamente empírico y solamente apoyado en publicaciones relacionadas con la técnica quirúrgica; y aunque hubo algunos cursos de capacitación en el manejo de cirugía experimental, estos fueron dirigidos por cirujanos sin experiencia en el modelo. Sin embargo, la parte a rescatar de todo ese

tiempo fue el desarrollo de habilidades en el manejo microscopio bifocal, del instrumental de microcirugía y de las suturas 9-0 y 10-0, así como, la manipulación de las ratas. Por otro lado, en el periodo post-capacitación, se demostró un incremento significativo en la sobrevida de las ratas y en la reducción de las complicaciones asociadas con el procedimiento. Es indudable que haber recibido una adecuada capacitación en un centro con experiencia en el modelo experimental permitió la estandarización de la técnica, sin embargo, una parte a destacar fue la importancia de adquirir las habilidades quirúrgicas necesarias para llevar a cabo las cirugías en el menor tiempo posible, habilidad que sólo se fue adquiriendo al realizar prácticamente un trasplante renal al día.

Como se puede observar en la curva de aprendizaje de las variables asociadas con el trasplante renal (Figura VI.5), fue a partir que se logró la reducción en el tiempo de isquemia caliente (periodo definido como el tiempo que transcurre en la construcción de las anastomosis vasculares), que la sobrevida se incrementó de forma significativa. Este hallazgo es uno de los puntos que mayor énfasis hacen los centros de investigación en trasplantes (60, 69, 70). Como fue señalado, actualmente se recomienda reducir el tiempo de isquemia caliente a menos de 30 minutos. Esta observación se basa, en una publicación realizada por el grupo de *Weight y cols*, quienes evaluaron el impacto de distintos periodos de isquemia caliente/ reperfusión en la tasa de filtrado glomerular (TFG) y en la sobrevida de las ratas sometidas al procedimiento (72). Como era de esperarse, sus resultados mostraron una sobrevida del animal, inversamente proporcional al tiempo de isquemia caliente y directamente relacionado con la caída en la TFG evaluada al segundo ($r^2= 0.88$) y séptimo día ($r^2= 0.95$) de la isquemia caliente/ reperfusión. Estos hallazgos funcionales mostraron una fuerte asociación con cambios morfológicos sugerentes de necrosis tubular aguda. Sin embargo, el análisis del periodo de isquemia caliente/ reperfusión en la

sobrevida y en TFG de ratas sometidas a trasplante renal, aún no ha sido completamente evaluado. Una publicación realizada en los años setentas por *Norlén y cols*, mostró el impacto del tiempo de isquemia fría en la sobrevida y en la TFG de ratas sometidas a trasplante renal. Los resultados mostraron un incremento significativo en la mortalidad cuando el tiempo de isquemia fría superó las dos horas y prácticamente no hubo sobrevida cuando la isquemia fría fue mayor a 12 horas. El análisis de estos datos demostró que los cambios en la TFG fueron directamente asociados con cambios funcionales de presión hidrostática intratubular y con cambios histológicos sugerentes de hipoperfusión e isquemia a nivel tubular (73). Similar a lo anterior, nosotros evaluamos el impacto de la isquemia fría/ reperusión en la sobrevida de las ratas sometidas a trasplante renal con resultados hasta cierto punto esperados, una mortalidad mayor cuanto mayor fue el tiempo de isquemia fría/ reperusión.

Durante el periodo de capacitación, una de las diferencias encontradas al comparar las técnicas de trasplante renal del Hospital de Bellvitge *versus* INNSZ, fue el tipo de anestésico utilizado durante la cirugía. Al respecto podemos señalar, que no existe alguna recomendación para utilizar un anestésico específico durante el trasplante renal. Una publicación reciente, evalúa el impacto de la administración intraperitoneal de cuatro tipos de anestésico en el daño renal por isquemia reperusión (74). Los autores mostraron una reducción en el daño renal utilizando propofol o tiopental, hallazgo posiblemente relacionado con propiedades antioxidantes de ambos medicamentos. Durante el periodo de pre-capacitación, nuestros resultados mostraron una frecuencia de muerte por sobredosis de pentobarbital del 13%. Por tal motivo, luego de la capacitación, de forma similar al grupo español, comenzamos a administrar fentanil de forma intraperitoneal. El fentanil es un agonista sintético de los receptores opiáceos, caracterizado por su alto poder analgésico y

de sedación (75). La ventaja principal del fentanil, es la rápida recuperación *ad integrum* de sus efectos luego de la administración de naloxona, antagonista de los receptores opiáceos. Sin embargo, en ausencia de naloxona la administración de fentanil se asocia con un incremento significativo de las muertes por paro respiratorio (75). Lamentablemente, actualmente la venta de naloxona en México se encuentra limitada y en consecuencia el uso de fentanil fue difícil y prácticamente abandonado luego de algunas cirugías.

Basado en la experiencia de nuestro laboratorio, decidimos seguir utilizando pentobarbital intraperitoneal como anestésico, reduciendo significativamente las muertes por sobredosis al reducir los tiempos de anastomosis vascular (isquemia caliente). Además un hallazgo interesante que logramos identificar fue un fenómeno hasta ahora no descrito y al que denominamos “*sedación post-clamps*”. Este fenómeno se caracterizaba, por un incremento en los efectos anestésicos del pentobarbital, luego del retiro de los clamps vasculares. Nuestra hipótesis es, que este fenómeno posiblemente tenga relación con la administración intraperitoneal *per se*, donde la colocación de los clamps vasculares limita la farmacocinética de las dosis de mantenimiento administradas a lo largo de la cirugía, sin embargo, inmediatamente después que los clamps son retirados, se recupera la distribución normal del medicamento y con ello la “*sedación post-clamps*”.

Completada la fase de la estandarización de la técnica, continuamos con nuestro principal objetivo de la tesis: evaluar el efecto del bloqueo a receptores a mineralocorticoides en la evolución del trasplante renal. Nuestros resultados mostraron un efecto no significativo de la administración de espironolactona en los niveles de creatinina sérica y en la depuración de creatinina al quinto día postrasplante.

El trasplante renal experimental es el mejor modelo para el estudio del daño renal por isquemia fría/ reperusión. En este modelo, a diferencia del modelo de isquemia

caliente/ reperusión, el daño renal tiende a ser mayor, debido a múltiples factores que en un momento dado pueden influir en la función renal. Entre los factores a estudiar se encuentran: 1) tiempo de isquemia caliente (tiempo de anastomosis vascular), 2) manipulación quirúrgica del injerto, 3) uso de soluciones de preservación, 4) tiempo de isquemia fría y 5) rechazo inmunitario (76).

Con relación al tiempo de isquemia caliente, como fue señalado previamente es importante mantener un tiempo de isquemia caliente menor a 30 minutos (69, 71). Esta reducción dependerá directamente de la habilidad del cirujano para realizar las anastomosis vasculares una vez que el injerto es colocado en el cuerpo del animal (70). En el mismo sentido corresponde la manipulación quirúrgica del injerto, ya que a mayor habilidad del cirujano menor es la posibilidad de dañar el riñón (60,71).

El uso de soluciones de preservación en las cirugías de trasplante ha evolucionado según se han ido conociendo los mecanismos patogénicos de las lesiones por isquemia y los métodos para contrarrestarlas. En un principio, se usaban *soluciones cristaloides*, sin embargo se comprobó que favorecían el edema celular al aportar gran cantidad de sodio a la célula hipóxica. Por eso se empezaron a utilizar *soluciones hiperosmolares* para intentar contrarrestar este edema, surgiendo así la solución de *Sacks* (usaba manitol como componente osmótico), de *Collins* (glucosa y fosfatos), de *Came* (con PPF o fracción proteica del plasma, principalmente albúmina), de *Lambotte* (sucrosa), etc. La modificación de estas solución con soluciones parcialmente similares a las del líquido intracelular permitió el surgimiento de las *soluciones intracelulares* (*Collins C1, C2, C3, C4* y *EuroCollins*), a las que luego se les introdujeron nuevos aditivos perfeccionándolas hasta llegar a producir soluciones más complejas entre las que se encuentra la solución de la Universidad de Wisconsin y la solución de *Custodiol*® (77).

Para nuestro estudio utilizamos la solución de *Costudiol*®, la cual es una solución de preservación diseñada en los años sesentas por el profesor Bretschneider en Alemania (77). Utiliza como sustancia osmótica el manitol y la histidina (también con efecto tampón) e incorpora sustancias estabilizadoras de la membrana celular como el triptófano y el ketoglutarato (éste último también útil como componente energético). Su efecto en el injerto renal ha sido ampliamente analizado, mostrando un adecuado efecto renoprotector contra el daño renal por isquemia fría/ reperfusión (78, 79).

El último de los factores descrito, que puede llegar a impactar en la función renal de los animales sometidos a trasplante renal, corresponde al rechazo inmunitario (29). Basado en lo anterior, actualmente existen distintas cepas de animales derivadas con el fin de reducir al máximo el daño inmunitario por rechazo del injerto. Entre las cepas recomendadas para investigación en trasplante renal son las especies de ratas *Fisher* (derivadas de los Instituto Nacionales de Salud en Estados Unidos, Bethesda, Maryland), ratas *Lewis* (derivadas de los Instituto Nacionales de Salud en Estados Unidos, Bethesda, Maryland) y ratas *Dark Agouti* (derivadas del Centro de Investigación en Agricultura de la Universidad de Cambridge, Reino Unido), todas estas son ratas cuyas características inmunitarias permiten llevar a cabo trasplantes singénicos controlando de esta manera el daño inmunitario ocasionado por el injerto (80).

De forma particular con el daño renal isquemia fría/ reperfusión, son múltiples estudios que han evaluado el impacto de distintas maniobras terapéuticas con el objetivo de reducir este daño (81-84). *Nickkholgh* y cols, evaluaron el impacto de la administración de melatonina 2 horas antes de la nefrectomía e isquemia fría de 24 horas. La evaluación postraplante mostró una sobrevida mayor de las ratas tratadas con melatonina *versus* control (60 ± 6.8 hrs *versus* 24.8 ± 1.4 hrs, $P < 0.01$), así como una reducción en las cifras de

creatinina sérica a las 24 horas de la reperfusión, en el grupo de ratas con melatonina *versus* control (1.8 ± 0.3 mg/dl *versus* 3.3 ± 0.3 mg/dl, $P < 0.05$). Estos hallazgos se asociaron con una reducción en la expresión del NF- κ B y del estrés oxidativo (81). *García-Criado y colaboradores* evaluaron el efecto de un nuevo donador de óxido nítrico (LA-803), en el daño renal por isquemia fría de 10 minutos y reperfusión de 6 horas. La administración de LA-803 se asoció con una reducción significativa en los niveles plasmáticos de TNF α , IFN- γ e IL-1 β , y un incremento en los niveles séricos de IL-6 e IL-10. Estos resultados se asociaron con una reducción en el estrés oxidante tisular, sin embargo los autores no muestran datos relacionados con la función renal (82). En otro estudio, *Guan y cols*, evaluaron el impacto de la administración de tres dosis distintas de taurina previas a la nefrectomía. Los resultados mostraron a las seis horas postrasplante cifras más bajas de nitrógeno de urea y creatinina sérica, en las ratas cuyos injertos habían sido expuestos a dosis más altas de taurina (300nM); hallazgos que se asociaron con un menor daño histológico a nivel tubular y con una menor expresión de procaspasa-3 (taurina 44% *vs* control 18%, $P < 0.01$), así mismo se documentó una mayor expresión de la enzima superóxido dismutasa y de la proteína HSP 72 (taurina 95% *vs* control 77%, $P < 0.05$) (83). *Fuller y cols* analizaron la administración intraperitoneal de glutamina en ratas donadoras previo a la nefrectomía con posterior isquemia fría de 40 horas y reperfusión de 24 horas. Los resultados mostraron que la administración previa de glutamina incrementó significativamente la expresión de HSP 70, sin impacto en la cifras de creatinina sérica (glutamina 2.7 ± 0.5 mg/dl *vs* control 2.6 ± 0.2 mg/dl). Por otro lado, también se demostró una reducción significativa en las células apoptóticas de la corteza, medula y papila renal ($P < 0.001$ *vs* control) (84). Cabe señalar, que la mayoría de los estudios hasta ahora publicados, han sido dirigidos a reducir el daño secundario a la inflamación e infiltración de

leucocitos en los injertos, más que evitar las alteraciones en la regulación vascular posiblemente asociada en las cirugías de trasplante renal. Lamentablemente nuestros resultados no parecen mostrar un efecto benéfico de la espironolactona, ni en función renal, ni en la sobrevida de los animales trasplantados. Pensamos que nuestros resultados podrían estar relacionados con tres observaciones realizadas *a posteriori*: 1) tiempo de isquemia fría prolongado, 2) diseño experimental y 3) trasplante alogénico.

Aunque han sido pocos los estudios que han evaluado el impacto del tiempo de isquemia fría/ reperusión en la sobrevida de ratas trasplantadas, las evidencias muestran que todo daño el isquémico superior a 2 horas muestra un significativo daño histológico inicial, pero con adecuada sobrevida a largo plazo. Sin embargo, cuando el tiempo de isquemia fría es superior a las 12 horas se considera un daño isquémico severo con daño histológico irreversible (infarto renal) y baja sobrevida a largo plazo (73). Basado en lo anterior, evaluamos el impacto de la isquemia fría/ reperusión de tres diferentes tiempos de isquemia fría (60, 120 y 240 minutos) en tres grupos de ratas sometidas a trasplante renal. Como era de esperarse, las ratas sometidas a un menor tiempo de isquemia fría mostraron mejores cifras de creatinina sérica y una sobrevida superior al resto de los grupos. Con base en estos resultados, planteamos diseñar un nuevo experimento para evaluar el efecto de la espironolactona en grupos de ratas sometidas a tiempos de isquemia fría > 60 y < 120 minutos.

Otra posible situación que quizás influyó en nuestros resultados, fue el diseño experimental *per se*. Todas las evidencias muestran un efecto protector de la espironolactona en el daño renal agudo mediado quizás por sus acciones vasculares previamente descritas (26-28). De acuerdo a nuestro diseño, nosotros realizamos una evaluación de la función renal al quinto día de la cirugía, cuando quizás el impacto agudo

ha desaparecido o bien nunca existió. Por lo anterior, creemos necesario considerar un nuevo diseño experimental en el cual la evaluación de la función renal se mida con 24 horas de reperfusión, de esta manera quizás podríamos identificar el efecto agudo del bloqueo de receptores de mineralocorticoides en el daño renal por isquemia fría reperfusión.

Finalmente, una tercera posible explicación a nuestros resultados, tenga relación con el hecho de que los trasplantes renales que realizamos fueron alogénicos. Los trasplantes renales alogénicos son modelos habitualmente utilizados para el estudio de rechazo agudo o crónico y se realizan utilizando ratas de cepas diferentes con o sin esquemas de inmunosupresión administrados (85, 86). Debido a que nuestro estabulario únicamente cuenta con ratas Wistar, nosotros utilizamos un modelo de trasplante renal alogénico utilizando cepas de rata Wistar a Wistar. Aunque todos los riñones fueron evaluados desde el punto de vista histológico y no se reportaron datos aparentes de rechazo agudo (datos no demostrados en los resultados), cabe señalar que las evaluaciones, sólo se hicieron con tinciones de HE y PAS, técnicas insuficientes para descartar fehacientemente la presencia o la ausencia de rechazos inmunitarios (por ejemplo, rechazo humoral). Basado en lo anterior, consideramos adecuado realizar trasplantes singénicos para evaluar el efecto de la espironolactona en el daño renal por isquemia fría/ reperfusión, reduciendo de esta manera el posible daño inmunitarios que con nuestro modelo actual no podemos controlar.

VII.- CONCLUSIONES

Se logró la estandarización del trasplante renal experimental utilizando una técnica de anastomosis vascular latero-terminal. No se demostró una reducción significativa en el daño renal por isquemia fría de 120 minutos en ratas sometidas a trasplante renal alogénico, resultado independiente de la técnica quirúrgica utilizada. La sobrevida de las ratas trasplantadas fue directamente relacionada con el tiempo de isquemia fría e independiente del uso de espironolactona. Es posible que nuestros resultados puedan ser modificados con un diseño experimental que evalúe la función renal en las primeras 24 horas de reperfusión o bien utilizando un modelo singénico de trasplante renal.

VIII.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Eknoyan G, Lamiere N, Barsoum R, et al. The burden of kidney disease : Improving global outcomes. *Kidney Int* 66: 1310-1314, 2004.
- 2.- Levey AS, Eckardt KU, Tsunamoto Y, et al. Definition and classification of chronic kidney disease: Aposition Statement from kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int* 67: 2089-2100, 2005.
- 3.- El Nahas AM, Bello AK. Chronic Kidney Disease: The global challenge. *Lancet* 365: 331-340, 2005.
- 4.- Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, et al. Improved graft survival after renal transplantation in the United Stated, 1988 to 1996. *N Engl J Med* 342: 605-12, 2000.
- 5.- Levey AS, Beto JA, Coronado BE, Eknoyan G, Foley RN, Kasiske BL, Klag ML, Mailloux LU, Manske CL, Meyer KB, Parfrey PS, Pfeffer MA, Wenger NK, Wilson PWF, Wright JT: Controlling the epidemic of cardiovascular disease in chronic renal disease: What do we know? What do we need to learn? Where do we go from here? *Am J Kidney Dis* 32: 853–906, 1998.
- 6.- Cecka JM. The UNOS Scientific Renal Transplant Registry, 2000. *Clin Transpl* 1-18, 2000.
- 7.-Lorraine C, et al. The Banff 97, Working Classification of Renal Allograft Pathology. *Kidney Int* 55, 713-723, 1999.

- 8.- Lu CY, Penfield JG, Kielar ML, Vazquez MA, Jeyarajah DR. Hypothesis: is renal allograft rejection initiated by the response to injury sustained during the transplant process?. *Kidney Int* 55: 2157-2168, 1999.
- 9.- Kouwenhaven EA, De Bruin RWF, Bajema IM, Marquet RL, Ijzermans JNM. Cold ischemia augments allogenic-mediate injury in rat kidney allograft. *Kidney Int* 59: 1142-1148, 2001.
- 10.- Sahudeen AK. Cold ischemic injury transplanted kidneys: new insights from experimental studies. *Am J Physiol Renal Physiol* 287: F181-F187, 2004.
- 11.- Chapman JR, O'Connell PJ, Nankivell BJ. Chronic renal allograft dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 16: 3015-3026, 2005.
- 12.- Shoskes DA, Parfrey NA, Halloran PF. Increased major histocompatibility complex antigen expression in unilateral ischemic acute tubular necrosis in the mouse. *Transplantation*. 1990 Jan; 49(1):201-7.
- 13.- Feria I, Pichardo I, Juarez P, Ramirez V, et al. Therapeutic benefit of spironolactone in experimental chronic cyclosporine A nephrotoxicity. *Kidney Int* 63, 43-52, 2003.
- 14.- Pérez-Rojas JM, Derive S, Blanco JA, Cruz C, Martinez de la Maza L, Gamba G, Bobadilla N. Renocortical mRNA expression of vasoactive factors during spironolactone protective effect in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Am J Physiol* 289:1020-1030, 2005.
- 15.- Mejia-Vilet JM, Ramirez V, Cruz C, Uribe N, Gamba G, Bobadilla NA. Renal ischemia-reperfusion injury is prevented by the mineralocorticoid receptor blocker spironolactone. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007 Jul; 293(1): F78-86.

- 16.- Mortensen RM, Williams GH. Aldosterone action. In: DeGroot LJ, Jameson JL, Burger HG, et al. eds. *Endocrinology* 4th ed. Philadelphia: WB Saunders, 2001:1783–1790.
- 17.- Williams GH. Aldosterone biosynthesis, regulation and classical mechanism of action. *Heart Fail Rev.* 10: 7-13, 2005.
- 18.- Simpson SA, Tait JF, Wettstein A, Neher R, Von Euw J, Reichstein T: Isolation from the adrenals of a new crystalline hormone with especially high effectiveness on mineral metabolism. *Experientia.* 9: 333-335, 1953.
- 19.- Rogerson FM, Brennan FE, Fuller PJ. Mineralocorticoid receptor binding structure and function. *Molecular and Cell Endocrinology.* 217: 203-212, 2004.
- 20.- Arriza JL, Weinberger C, Cerelli G, Glaser TM, Handelin BL, Housman DE, Evans RM. Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science.* 1987 Jul 17; 237:268-75.
- 21.- Pacual-Le L, Lombés M. The mineralocorticoid receptor: A journey exploring its diversity and specificity of action. *Molecular Endocrinology.* 19: 2211-2221, 2005.
- 22.- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM: The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83: 835-839, 1995.
- 23.- Beato M, Klug J: Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update* 6: 225-236, 2000.
- 24.- Pratt WB, Toft DO, Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev.* 18: 306-360, 1997.
- 25.- Cortés-Gonzales CC, Ramirez-Gonzalez V, Ariza AC, Bobadilla NA. Significado funcional de las proteínas de choque térmico de 90 kDa. *Revista de Investigación Clínica.* 60 (4), 311-320, Julio-Agosto 2008.

- 26.- Arima S, Kohagura K, Xu HL, Sugawara A, Abe T, Satoh F, Takeuchi K, Ito S. Nongenomic vascular action of aldosterone in the glomerular microcirculation, *J Am Soc Nephrol* 14: 2255–2263, 2003.
- 27.- Grossman C, Gekle M. New aspect of rapid aldosterone signaling. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 308: 53-62, 2009.
- 28.- Funder JW. The nongenomics action of aldosterone. *Endocrine Reviews* 26(3):313–321, 2005.
- 29.- Danovitch G. Options for Patients with End-Stage Renal Disease. In Danovitch G Handbook of Kidney Transplantation 4ta ed. Lippincott Williams & Wilkins 2004: 12-35.
- 30.- Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, Remuzzi G. Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet* 364: 1814-27, 2004.
- 31.- Yokoyama I, Uchida K, Kobayashi T, Tominaga Y, Orihara A, Takagi H. Effect of prolonged delayed graft function on long-term graft outcome in cadaveric kidney transplantation. *Clin Transplant* 1994; 8 (2 Pt 1): 101.
- 32.- Shoskes DA, Halloran PF. Delayed graft function in renal transplantation: etiology, management and long-term significance. *J Urol* 155: 1831-40. 1996.
- 33.- Lechevallier E, Dussol B, Luccioni A, Thirion X, et al. Posttransplantation Acute Tubular Necrosis : Risk Factor and Implications for Graft Survival. *Am J of Kidney D*. 32 (6): 984-991, 1998.
- 34.- Koning OHJ, Ploeg RJ, Van Bockel JH, et al. Risk factors for delayed graft function in cadaveric kidney transplantation. *Transplantation* 63: 1620–28, 1997.

- 35.- Ojo AO, Wolfe RA, Held PJ, Port FK, Schmouder RL. Delayed Graft Function: risk factor and implications for renal allograft survival. *Transplantation* 63(7): 968-974, 1997.
- 36.- Lynch RJ, Kubus J, Chenault RH, Pelletier SJ, Campbell DA, Englesbe MJ. Comparison of histidine-tryptophan-ketoglutarate and University of Wisconsin preservation in renal transplantation. *Am J Transplant.* 2008 Mar;8(3):567-73.
- 37.- Merion RM, Ashby VB, Wolfe RA, Distant DA, Hulbert-Shearon TE, Metzger RA, Ojo AO, Port FK. Deceased-donor characteristics and the survival benefit of kidney transplantation. *JAMA.* 2005 Dec 7; 294(21):2726-33.
- 38.- Shoskes DA. Nonimmunologic renal allograft injury and delayed graft function: Clinical strategies for prevention and treatment. *Transplant Proc* 32: 766-768, 2000.
- 39.- Lu CY, Penfield JG, Kielar ML, Vazquez MA, Jeyarajah DR. Hypothesis: is renal allograft rejection initiated by the response to injury sustained during the transplant process?. *Kidney Int* 55: 2157-2168, 1999.
- 40.- Gjertson DW. Impact of delayed graft function and acute rejection on kidney graft survival. *Clin Transpl* 467-480, 2000.
- 41.- Daly PJ, Power RE, Healy DA, Hickey DP, Fitzpatrick JM, Watson RW. Delayed graft function: a dilemma in renal transplantation. *BJU Int.* 2005 Sep;96(4):498-501.
- 42.- Boom H, Mallat MJ, de Fijter JW, Zwinderman AH, Paul LC. Delayed graft function influences renal function but not survival. *Transplant Proc.* 2001 Feb-Mar; 33(1-2):1291.

- 43.- Schnitzler MA, Hollenbeak CS, Cohen DS, Woodward RS, Lowell JA, Singer GG, Tesi RJ, Howard TK, Mohanakumar T, Brennan DC. The Economic Implications of HLA matching in cadaveric renal transplantation. *N Engl J Med* 341:1440, November 4, 1999
- 44.- Almond PS, Troppmann C, Escobar F, Frey DJ, Matas AJ. Economic impact of delayed graft function. *Transplant Proc* 1991; 23 (1 Pt 2): 1304.
45. Rosenthal JT, Danovitch GM, Wilkinson A, Ettenger RB. The high cost of delayed graft function in cadaveric renal transplantation. *Transplantation* 1991; 51(5): 1115.
- 46.- Brady H. Leukocytes adhesion molecules and kidney disease. *Kidney Int* 45: 1285-1300, 1994.
- 47.- Gómez-Ullate P, Amenabar JJ, Urbizu JM, Garcia Erauzkin G, Zarragas S and Lampreabe I. Influence of acute tubular necrosis. *Kidney Int* 55: 368, 1998.
- 48.- Davarajan P. Update on Mechanisms of Ischemic Acute Kidney Injury. *J Am Soc Nephrol* 17: 1503-1520, 2006.
- 49.- Brodsky SV, Yamamoto T, Tada T, et al. Endothelial dysfunction in ischemic acute renal failure : Rescue by transplanted endothelial cell. *Am J Physiol Renal Physiol* 282: F1140-F1149, 2002.
- 50.- Schrier RW, Wang W, Poole B, Mitra A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *J Clin Invest* 114: 5-14, 2004.
- 51.- Liano F, Junco E, Pascual J, Madero R, Verde E. The spectrum of acute renal failure in the intensive care unit compared with that seen in the other settings. The Madrid Acute Renal Failure Study Group. *Kidney Int* 53 (Suppl 66): S16-24, 1998.

- 52.- Dluhy RG, Williams GH. Aldosterone--villain or bystander?. *N Engl J Med*. 2004 Jul 1;351(1):8-10.
- 53.- Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med*. 1999 Sep 2;341(10):709-17.
- 54.- Pitt B, Remme W, Zannad F, et al. Eplerenone , a selective Aldosterone Blocker, in patients with Left Ventricular Dysfunction after Myocardial Infarction. *N Engl J Med* 348: 1309-21, 2003.
- 55.- Rossing K, Schjoedt KJ, Smidt UM, Boomsma F, Parving HH. Beneficial effects of adding spironolactone to recommended antihypertensive treatment in diabetic nephropathy: a randomized, double-masked, cross-over study. *Diabetes Care*. 2005 Sep; 28(9):2106-12.
- 56.- Aronson D, Rayfield EJ, Chesebro JH. Mechanisms determining course and outcome of diabetic patients who have had acute myocardial infarction. *Ann Intern Med*, 126: 296-306, 1997.
- 57.- Greene EL, Kren S, Hostetter TH. Role of aldosterone in the remnant kidney model in the rat. *J Clin Invest*. 1996 Aug 15;98(4):1063-8.
- 58.- Ramirez V, Trujillo J, Valdes R, Uribe N, Cruz C, Gamba G, Bobadilla NA. Adrenalectomy prevents renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 297: F932–F942, 2009.

59.- Leopold JA, Dam A, Maron BA, Scribner AW, Liao R, Handy DE, Stanton RC, Pitt B, Loscalzo J. Aldosterone impairs vascular reactivity by decreasing glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Nat Med.* 2007 Feb;13(2):189-97.

60.- Pahlavan PS, Mehrabi A, Kashfi A, Soleimani M, Fani-Yazdi SH, Schemmer P, Gutt CN, Friess H, Weitz J, Kraus TW, Büchler MW, Schmidt J. Guidelines for Prevention and Management of Complications Following Kidney Transplantation in Rats. *Transplantations Proc*, 37, 2333–2337, 2005.

61.- Payam S, Pahlavan MD, Corry S, Adams MA, Shumacher M. Kidney transplantation procedures in rats: Assessments, complications, and management. *Microsurgery* 26:404–411, 2006.

62.- Lee S. An improved technique of renal transplantation in the rat. *Surgery* 1967;61:771–773.

63.- Fisher B, Lee S. Microvascular surgical techniques in research, with special references to renal transplantation in the rat. *Surgery* 1965; 58:904–914.

64.- Daniller A, Bucholl R, Chase AR. Renal transplantation in rats with the use of microsurgical techniques: a new method. *Surgery* 1968;63:956_961.

65.- Schumacher M, Van Vliet BN, Ferrari P. Kidney transplantation in rats: an appraisal of surgical techniques and outcome. *Microsurgery* 2003;23:387_394.

66.- Fanua SP, Kim J, Shaw Wilgis EF. Alternative model for teaching microsurgery. *Microsurgery* 2001;21:379_382.

- 67.- Zhu L, Gong D, Zou Y, Li Y, Wu Y, Guan L, Wu Q, Yuan B, Wang L, Luo F. Cervical heterotopic kidney transplantation in rats using non-suturing and preserving-bag techniques. *Nephrol Dial Transplant*. 2009 Sep; 24(9):2708-13. Epub 2009 Apr 15.
- 68.- Green CJ. Organization of a microsurgical laboratory. *Br J Plast Surg* 1990;43:641_644.
- 69.- Holzen JP, Palmes D, Langer M, Spiegel HU. Microsurgical training curriculum for learning kidney and liver transplantation in the rat. *Microsurgery* 2005;25:614–623.
- 70.- Miko I, Brath E, Furka I. Basic teaching in microsurgery. *Microsurgery* 2001;21:121_123.
- 71.- Klein I, Steger U, Timmermann W, Thiede A, Gassel HJ. Microsurgical training course for clinicians and scientists at a German university hospital: a 10-year experience. *Microsurgery* 2003;23:461_465.
- 72.- Weight SC, Furness PN, Nicholson ML. New model of renal warm ischemia-reperfusion injury for comparative functional, morphological and pathophysiological studies. *British Journal of Surgery* 1998, 85; 1669-1673.
- 73.- Norlén BJ, Engreg A, Källskog Ö, Wolgast M. Nephron function of the transplanted rat kidney. *Kidney Int*. Vol 14 (1978), pp 10-20
- 74.- Yuzer H, Yuzbasioglu MF, Ciralik H, Kurutas EB, Ozkan OV, Bulbuloglu E, Atli Y, Erdogan O, Kale IT. Effects of intravenous anesthetics on renal ischemia/reperfusion injury. *Ren Fail*. 2009;31(4):290-6.

- 75.- Chevillard L, Mégarbane B, Risède P, Baud FJ. Characteristics and comparative severity of respiratory response to toxic doses of fentanyl, methadone, morphine, and buprenorphine in rats. *Toxicol Lett.* 2009 Oct 9. [Epub ahead of print]
- 76.- Menger MD, Vollmar B. Role of microcirculation in transplantation. *Microcirculation.* 2000 Oct; 7(5):291-306. Review.
- 77.- Moreno SJ, Jimenez EJ, Redondo E, Bocmn G, Snsi A, Resel L. Conservación de órganos. *Clinicas Urológicas de la Universidad de Complutense Madrid*, 7, 209-218, 1999.
- 78.- - Agarwal A, Murdock P, Fridell J: Comparison of histidine tryptophan ketoglutarate solution and University of Wisconsin solution in prolonged cold preservation of kidney allograft. *Transplantation* 81:480, 2006
- 79.- Plovč R, Bockel J, Langendijk E Effect of preservation solution on results of cadaveric kidney transplantation. *Lancet* 1992; 340: 120.
- 80.- Mashimo T, Serikawa T. Rat resources in biomedical research. *Curr Pharm Biotechnol.* 2009 Feb;10 (2):214-20. Review.
- 81.- Li Z, Nickkholgh A, Yi X, Bruns H, Gross ML, Hoffmann K, Mohr E, Zorn M, Büchler MW, Schemmer P. Melatonin protects kidney grafts from ischemia/reperfusion injury through inhibition of NF- κ B and apoptosis after experimental kidney transplantation. *J Pineal Res.* 2009 May;46(4):365-72. Epub 2009 Apr 9.
- 82.- García-Criado FJ, Rodríguez-Barca P, García-Cenador MB, Rivas-Elena JV, Grande MT, López-Marcos JF, Mourelle M, López-Novoa JM. Protective effect of new nitrosothiols on the early inflammatory response to kidney ischemia/reperfusion and transplantation in rats. *J Interferon Cytokine Res.* 2009 Aug; 29(8):441-50.

83.- Guan X, Dei-Anane G, Liang R, Gross ML, Nickkholgh A, Kern M, Ludwig J, Zeier M, Büchler MW, Schmidt J, Schemmer P. Donor preconditioning with taurine protects kidney grafts from injury after experimental transplantation. *J Surg Res.* 2008 May 1;146(1):127-34. Epub 2007 Jul 25.

84.- Fuller TF, Rose F, Singleton KD, Linde Y, Hoff U, Freise CE, Dragun D, Niemann CU. Glutamine donor pretreatment in rat kidney transplants with severe preservation reperfusion injury. *J Surg Res.* 2007 Jun 1;140(1):77-83. Epub 2007 Feb 9.

85.- Reutzel-Selke A, Hartmann J, Brandenburg P, Jurisch A, Francuski M, Ulrich F, Kotsch K, Pascher A, Neuhaus P, Tullius SG, Pratschke J. Cold ischemia does not interfere with tolerance induction. *Transplantation.* 2009 Apr 27;87(8):1116-24.

86.- Hoffmann U, Bergler T, Rihm M, Pace C, Krüger B, Rümmele P, Stoelcker B, Banas B, Männel DN, Krämer BK. Upregulation of TNF receptor type 2 in human and experimental renal allograft rejection. *Am J Transplant.* 2009 Apr;9(4):675-86.

ANEXO 1 DEFINICIÓN OPERACIONAL DE VARIABLES

Variables	Definición	Categoría	Escala de medición
Daño isquemia reperusión	Daño endotelial inducido inicialmente por un tiempo de isquemia seguido por un tiempo de reperusión sanguínea.	Nominal	Dicotómica: Si/ No
Retardo en el funcionamiento del injerto	Disminución del volumen urinario o el retardo en el descenso en los niveles de creatinina sérica luego de 24 horas del trasplante.	Nominal	Dicotómica: Sí/ No
Depuración de creatinina	Creatinina en orina de 24 hrs (en mg) /1440/creatinina sérica.	Dimensional	ml/min
Volumen urinario	Mililitros de orina en 24 hrs.	Dimensional	ml/min
Creatinina sérica	Producto de degradación de la creatina, presente en el plasma	Dimensional	mg/ dl
Trombosis vascular	Proceso obstructivo de la luz vascular por formación intravascular <i>in vivo</i> de una masa compuesta por varios elementos sanguíneos y que se produce como complicación del trasplante renal	Nominal	Dicotómica: Si/ No
Dehiscencia de las anastomosis	Separación de suturas y de herida quirúrgica, luego del trasplante renal	Nominal	Dicotómica: Sí/ No
Trasplante renal	Técnica quirúrgica por medio de la cual un injerto renal es colocado por medio de anastomosis vasculares y ureterovesical en el organismo	Nominal	Dicotómico: Si/No
Tiempo quirúrgico nefrectomía	Tiempo transcurrido desde la incisión de la pared abdominal hasta la extracción quirúrgica del riñón izquierdo	Continua	Minutos
Tiempo quirúrgico trasplante	Tiempo transcurrido desde la incisión de la pared abdominal, preparación del área quirúrgica, construcción de anastomosis vasculares y vesical, nefrectomía bilateral, hasta el cierre de la cavidad abdominal	Continua	Minutos
Tiempo quirúrgico área	Tiempo transcurrido en la disección y preparación del área quirúrgica donde se realizará el trasplante renal	Continua	Minutos
Tiempo quirúrgico	Tiempo transcurrido entre en la anastomosis termino-terminal o	Continua	Minutos

anastomosis arterial	latero-terminal vascular arterial		
Tiempo quirúrgico anastomosis venosa	Tiempo transcurrido entre en la anastomosis termino-terminal o latero-terminal vascular venosa	Continua	Minutos
Tiempo quirúrgico anastomosis vesical	Tiempo transcurrido entre en la anastomosis del parche de vejiga de la rata donadora con la vejiga nativa de la rata receptora	Continua	Minutos
Tiempo clamps	Tiempo transcurrido entre el inicio de la colocación de los clamps vasculares hasta el retiro de los mismos	Continua	Minutos
Sobredosis de anestesia	Muerte asociada minutos después de la administración de fármacos sedantes o anestésicos	Nominal	Dicotómica: Si /No
Hipotermia	Registro continuamente por debajo de los 36.5° centígrados de la temperatura corporal de la cola de la rata	Nominal	Dicotómica: Si/No

ANEXO 2 HOJA DE CAPTURA DE VARIABLES

I.- Identificación

No de Trasplante		Grupo		Fecha			
------------------	--	-------	--	-------	--	--	--

II.- Rata Donadora

Peso		Anestesia		Tiempo quirúrgico	
Custodial		Heparina		Tiempo isquemia fría	
Observaciones					

II.- Rata Receptora

Peso		Tiempo Quirúrgico		Tiempo área	
Clamps		Anast. arterial		Anast. venosa	
Anast. vesical		Antibiótico		Anestesia	
Observaciones					

III.- Evolución postrasplante

Días	Peso	Sangrado	Observaciones				
1							
2							
3							
4							
5							
Tiempo recolección		Volumen urinario		Peso riñón		Depuración creatinina	