



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

ALTERACIONES HISTOLÓGICAS EN LA PROGRESIÓN A  
ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA SECUNDARIA A UN  
EVENTO DE LESIÓN RENAL AGUDA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

ARTURO GÓMEZ ROMERO

TUTORA:

DRA. NORMA ARACELI BOBADILLA SANDOVAL



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM

2016

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX



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.

## **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo se realizó bajo la asesoría de la Dra. Norma Araceli Bobadilla Sandoval en la Unidad de Fisiología Molecular del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México y en el Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” en el periodo comprendido de agosto de 2014 a marzo del 2015.

A los miembros del Jurado:

Propietaria: M. en IBB Diana Elodia Aguilar León

Propietaria: Dra. Blanca Margarita Bazán Perkins

Prioritaria: Dra. Norma Araceli Bobadilla Sandoval.

Tutora

Suplentes: M. en C. Roxana Minerva Rodríguez Romo y M. C. Norma Ofelia Uribe Uribe

Este trabajo fue realizado con los apoyos otorgados a la Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT No. 101030, 181267 y 235825) ECOS-NORD M13S03, por la Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA IN223915 y IN203412-3) y por la Fundación Miguel Alemán.

A la QFB Rosalba Pérez Villalba por su asesoría técnica durante la realización de este trabajo.

A la UNAM que es mi segunda casa, no solo por los muchos años que he tenido la oportunidad y el honor de pertenecer a la comunidad universitaria, sino porque al estar en una institución tan prestigiada, como lo es mi universidad, uno aprende todo aquello que en algún momento de la vida resulta ser lo más útil que jamás aprendí y porque gracias a todo esto ya mencionado se adquiere la identidad de ser universitario.

A la Dra. Norma Bobadilla por permitirme colaborar en su laboratorio donde tuve la oportunidad de aprender y de contagiarme de su pasión por la investigación y sobre todo por darme la oportunidad de desarrollarme, por la paciencia que usted me brindo por mi paso en el laboratorio, así como el apoyo que nunca rechazo en brindarme. Muchas gracias por todo Dra. Norma.

A mis padres, Eduardo y Patricia por su ejemplo y constante apoyo de mi carrera universitaria muchas gracias esto es por y para ustedes.

A mi hermano que a pesar de todo siempre estuvo allí para escuchar todo acerca de mi tesis y mi trabajo en laboratorio a pesar de ser temas que no son de interés para él, también a mi primo Cesar al cual admiro porque también se dedica a la investigación y por ser el más preocupado por que siga este camino de la investigación científica.

A la Dra. Norma Uribe y a la Dra. Diana Aguilar por sus valiosas aportaciones en este trabajo, gracias porque nunca se negaron a compartir su experiencia.

A todos y cada uno de los integrantes de la unidad de fisiología molecular, donde he compartido con personas muy importantes en mi vida, siempre se aprende de ustedes tanto en lo profesional, como en lo personal, gracias Roxana, Tino, Vicky, Rosy, Ixchel, Normita, Cinthya y Mauricio. También no tengo más que gratitud para Lore, Lalo, Víctor, Alex, Karlita, Silvana y Norma Vázquez de los cuales también aprendí y conviví muy amablemente.

A Roxana por su paciencia, por siempre estar ahí para animarme, apoyarme, enseñarme, por soportarme en mis malos ratos y porque siempre tienes la actitud para alentarme a continuar. Por ser más que mi maestra en el laboratorio y convertirte en mi amiga, por todo, muchas gracias.

A mis amigos de toda la vida que no son muchos, pero son importantes, gracias Ana Elena, Rafael Escobar, Rafael Gonzales, Silvana, Marel, Christian, Xavi. Porque siempre me inspiraron a caminar por la senda del estudio, porque siempre están dispuestos a compartir buenos momentos y porque siempre se preocuparon del progreso de este trabajo.

Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de Nutrición Salvador Zubirán por abrirme las puertas de sus laboratorios, así como al Instituto de Investigaciones Biomédicas. A mi taller Biología celular e inmunología del asma por darme la oportunidad de desarrollarme en el INCMNSZ.

## ÍNDICE

<b>Introducción</b> .....	5
Fisiología renal .....	5
Fisiopatología de la Lesión Renal Aguda.....	9
Fisiopatología de la Enfermedad Renal Crónica .....	12
<b>Justificación</b> .....	14
<b>Objetivo general</b> .....	14
<b>Objetivos particulares</b> .....	14
<b>Metodología</b> .....	15
Modelo de Isquemia/Reperusión .....	15
Parámetros Funcionales .....	16
Estudios Histopatológicos .....	16
Análisis Estadísticos .....	18
<b>Resultados</b> .....	18
<b>Discusión</b> .....	29
<b>Conclusiones</b> .....	33
<b>Referencias</b> .....	34

## ***Introducción***

### ***Fisiología Renal***

El cuerpo humano posee dos riñones, que se ubican fuera de la cavidad peritoneal, en el retroperitoneo, cada uno a lado de la columna vertebral; es decir, en la región retroperitoneal. Los riñones poseen una morfología similar a la de un frijol, donde el lado convexo se orienta hacia el exterior. En la región interna del riñón se encuentra el hilio renal, que es la porción media donde se encuentran la arteria renal y vena renal, nervios y uréter. El riñón posee corteza ubicada en la superficie y zona más externa del riñón y la médula que se encuentra debajo de la corteza.

El riñón es uno de los órganos más importantes del cuerpo dado que se encarga principalmente del correcto balance de iones y agua, así como del filtrado de desechos metabólicos. Esto lo lleva a cabo gracias a varios procesos fisiológicos importantes como: la filtración glomerular, que es el mecanismo por el cual, el agua y otros solutos pequeños abandonan el sistema vascular y entran a la cápsula de Bowman; la secreción, que consiste en el movimiento de sustancias desde el citosol de la célula hacia la luz tubular y la reabsorción, que es el paso de sustancias de la luz tubular hacia el intersticio adyacente.

La formación de orina comienza con el filtrado glomerular, el cual solo permite el paso de moléculas menores a 7000 Da, la filtración es el proceso por el cual solo agua y algunos solutos son capaces de atravesar la barrera de filtrado, dejando atrás a las proteínas en el sistema circulatorio. Los solutos que principalmente se encuentran en el filtrado glomerular son iones de sodio, potasio, cloro y bicarbonato; también podemos encontrar glucosa, urea, amino ácidos y algunos péptidos como insulina y la hormona antidiurética, en resumen, moléculas de bajo peso molecular.<sup>1</sup>

Cuando las proteínas completas son mayores a 7000 Da y se encuentran en la orina, se presume que existe un daño renal y que la barrera de filtrado no está cumpliendo su función.

La unidad funcional del riñón recibe el nombre de nefrona. Las nefronas están compuestas por el corpúsculo renal que consiste en un agregado de capilares en bucle rodeados por una capsula vacía de forma esférica llamada Cápsula de Bowman. El corpúsculo renal lo podemos dividir en dos regiones diferentes para su estudio, por un lado está el polo vascular, que es la región donde se encuentran la arteriola eferente y la arteriola aferente que es por donde el volumen de sangre llega al glomérulo ya sea para la filtración del mismo o para irrigar a la nefrona y por el otro lado se encuentra, la región opuesta a la vascular donde se encuentra una abertura en la cápsula de Bowman, que tiene como destino la primera sección del túbulo renal.

La barrera de filtración glomerular por la cual debe de pasar el plasma sanguíneo en el corpúsculo renal, consiste de tres capas. La primera son las células endoteliales de los capilares del corpúsculo renal, el endotelio de estos capilares se encuentra fenestrado, es decir, que posee pequeñas aberturas a lo largo del capilar, las fenestras son permeables a todo el plasma sanguíneo con excepción de glóbulos rojos y plaquetas. La siguiente capa intermedia, se trata de una membrana basal, que no es propiamente una membrana lipídica, sino, una malla acelular de características gelatinosas compuesta de glicoproteínas y proteoglicanos. La tercera capa consiste en células epiteliales que se encuentran de frente a la cápsula de Bowman, llamadas podocitos. Estos poseen una morfología peculiar en forma de tentáculos de pulpo los cuales rodean en su totalidad a la cápsula de Bowman, estos "tentáculos" llamados procesos podocitarios tienen la función de filtrar grandes volúmenes de fluidos, pero a su vez evitar el paso de cualquier proteína grande presente en el plasma. Esto es posible en parte por las diferencias de carga en las moléculas. Debido a que la carga eléctrica presente en los podocitos y membrana basal son negativas, solo

aquellas moléculas con carga positiva y/o neutra son capaces de atravesar la barrera de filtración de forma casi libre. Otro factor a considerar en la barrera de filtración son las diferencias de presión oncótica e hidrostática que son fundamentales para regular el paso de los iones disueltos en el filtrado glomerular. La presión hidrostática es aquella que favorece el filtrado glomerular, mientras que la presión oncótica presente en la cápsula de Bowman impide el filtrado glomerular.

Posteriormente, el filtrado glomerular, va a ser modificado a lo largo de los siguientes segmentos de la nefrona: el túbulo proximal, el asa de Henle, túbulo distal y el sistema de ductos colectores.

El túbulo proximal se encarga de drenar lo que fue filtrado a la cápsula de Bowman y para su estudio se puede dividir en el túbulo contorneado proximal y la sección recta que desciende hacia la médula, de manera perpendicular a la corteza, donde se reabsorbe aproximadamente  $\frac{2}{3}$  del agua filtrada, así como todas las moléculas orgánicas que el cuerpo desea conservar como, glucosa, aminoácidos, y varios iones importantes como potasio, sodio, fosfato y calcio. También es en esta porción donde se excretan sustancias consideradas desechos metabólicos como la urea y creatinina.

En la siguiente porción de la nefrona se encuentra el asa de Henle que está compuesta de diferentes segmentos los cuales desarrollan funciones diferentes y específicas. La parte descendente delgada; la ascendente delgada y la porción ascendente gruesa, donde se lleva a cabo la reabsorción del 20% del sodio y cloro, y a su vez del 10% del agua filtrada.

En el túbulo distal se encuentran las células que conforman la mácula, éstas células censan el cloro y el sodio presente en la luz tubular y generan señales que influyen en otros aspectos de la función renal como en el sistema renina angiotensina aldosterona. Por último, el túbulo contorneado distal y conector pueden reabsorber solo el 5% de agua y solutos presentes en la orina, mientras que el túbulo colector es la sección donde varios túbulos conectores se unen para formar uno



solo. La reabsorción de agua y solutos en el túbulo colector es regulado por la hormona aldosterona y la hormona antidiurética (ADH).

El riñón posee poco más de 1 millón de nefronas, éstas se encargan del filtrado del plasma sanguíneo para así mantener la homeostasis del cuerpo. Los riñones filtran un aproximado de 180 litros al día, lo que significa que tienen una tasa de filtrado glomerular (TFG) de 125 mL/min.<sup>1</sup> De los 180 litros filtrados al día se reabsorbe el 99%, es decir, solo el 1 % del filtrado formará la orina que se excreta diariamente en el humano. Es necesario enfatizar que el riñón no posee una capacidad regenerativa de estas nefronas.

Los riñones reciben un aproximado del 20% del gasto sanguíneo donde es filtrado el plasma, el restante 80 % se destina a la circulación en los capilares del órgano. La irrigación renal comienza con la arteria renal, la cual se divide en ramas más pequeñas que dan paso a las interlobares, que a su vez dan origen a arterias de menor diámetro denominadas arcuatas de donde surgen las arterias interlobulares. Son éstas, las que se proyectan hacia la corteza renal y a su vez, algunas se proyectan de manera perpendicular casi en un ángulo recto, cada una de éstas conduce hacia un glomérulo, recibiendo el nombre de arteriolas aferentes.

El riñón posee una irrigación sanguínea diferente al resto de los órganos del cuerpo. Mientras que en la mayoría los capilares se recombinan para dar inicio al sistema venoso, en el riñón los capilares glomerulares se recombinan para formar otro grupo de arteriolas llamadas arteriolas eferentes. Lo que favorece a que, la sangre entre a cada glomérulo por la arteriola aferente y salga del mismo por la arteriola eferente, ésta a su vez se subdivide en otro conjunto de capilares, llamados peri-tubulares que se encuentran ampliamente distribuidos en la corteza del riñón. Estos capilares tienen la función de proporcionar oxígeno y nutrientes a las células epiteliales del túbulo proximal.

La médula renal recibe una cantidad menor de sangre en comparación a la corteza, es de hecho un sistema diferente de capilares los que se encargan de la irrigación en este punto, estos capilares reciben el nombre de vasa recta.

Debido a la estrecha relación entre el sistema circulatorio y el riñón para que este pueda llevar a cabo la depuración del plasma, una caída en el aporte sanguíneo a este órgano representa un factor de riesgo para sufrir importantes alteraciones, un claro ejemplo de esto es: la lesión renal aguda (LRA). Este tipo de lesión se caracteriza por una caída repentina y transitoria del flujo sanguíneo renal, lo que ocasiona una reducción de la TFG.<sup>2</sup> Una de las principales causas de LRA es la isquemia renal<sup>3</sup> que se presenta como resultado de falla cardíaca<sup>4</sup> o pérdida excesiva de agua ó sangre como es el caso de la deshidratación ó algún procedimiento quirúrgico, respectivamente.<sup>2</sup>

### ***Fisiopatología de la Lesión Renal Aguda***

La LRA es una complicación importante entre pacientes hospitalizados responsable de aproximadamente 2 millones de muertes anuales a nivel mundial.<sup>5, 6</sup> La incidencia de LRA es del 7% en los pacientes hospitalizados, este porcentaje puede ser hasta del 18% en países de bajo ingreso económico,<sup>5</sup> con un incremento de hasta el 50% en pacientes en terapia intensiva.<sup>7</sup>

La mortalidad de los pacientes críticamente enfermos que se encuentran en las unidades de terapia intensiva que presentan LRA ha incrementado del 15% al 80%.<sup>5</sup> Otro dato importante resaltar, es que la incidencia de la lesión renal aguda ha incrementado hasta cuatro veces desde 1988 al 2003 olo en Estados Unidos. Más recientemente, del 2008 a 2012 múltiples estudios observacionales demostraron que pacientes que han sobrevivido un episodio de LRA tienen un riesgo mayor de progresar a Enfermedad Renal Crónica<sup>5</sup>

En la clínica, la LRA se diagnostica por la medición de los niveles de creatinina en suero, donde la creatinina un producto de desecho metabólico que debe ser depurada en los riñones. Es por eso que los niveles elevados en suero son un indicador de daño renal, ya que los riñones no están cumpliendo su función de depurarla. Sin embargo, los diferentes criterios de clasificación de la LRA han llevado a inconsistencias al momento del diagnóstico, tratando de evitar esto, la organización para mejorar los resultados globales de la enfermedad renal (KDIGO: Kidney Disease Improving Global Outcomes ) ha estipulado tres estadios de la LRA:

<b>Estadio</b>	<b>Creatinina Sérica</b>	<b>Gasto Urinario</b>
1	1.5-1.9 veces el valor basal o un incremento $\geq 0.3$ mg/dl	<0.5 ml/kg/h por 6-12 hrs
2	2.0-2.9 veces el basal	<0.5 ml/kg/h por más de 12 hrs.
3	>3.0 veces el basal o un incremento de la creatinina hasta >4 mg/dl o terapia de remplazo renal	<0.3 ml/kg/h por más de 24 hrs o anuria por más de 12 hrs.

La lesión renal aguda implica una relación compleja entre la hemodinámica renal, la lesión tubular y los procesos inflamatorios. La LRA clínicamente se describe en tres fases importantes y una intermedia, que son: la iniciación; que ocurre cuando existe una caída en el flujo sanguíneo renal (FSR) que conlleva a una reducción severa en los niveles de adenocil 5'-trifosfato (ATP) que ocasiona un daño celular agudo en el epitelio tubular; una fase intermedia, denominada fase de extensión, que está relacionada con la duración del evento isquémico, donde los principales factores de daño son la generación de un ambiente hipóxico y la consiguiente respuesta inflamatoria; y la fase de mantenimiento, en donde las células experimentan procesos de reparación, migración , proliferación y apoptosis en un intento de re-establecer y mantener la

integridad tubular; durante la fase de recuperación el FSR y la diferenciación celular continúan, con el fin de reparar la polaridad epitelial y regresar a una función celular y renal normales.<sup>9</sup>

Durante la LRA, las células del epitelio tubular sufren daño, el cual si es severo puede llevar a muerte celular mediante apoptosis y necrosis (necrosis tubular aguda (NTA)). También se presenta daño endotelial, que se caracteriza por pérdida de glicocálix, interrupciones en el citoesqueleto de actina, alteraciones de las uniones celulares endoteliales y la ruptura de la matriz peri vascular que culminan en incremento en la permeabilidad vascular y pérdida de fluido hacia el intersticio.

Así mismo, la respuesta inflamatoria contribuye de manera importante en el desarrollo de la patología, ya sea por la respuesta inmune innata o adaptativa, debido a la infiltración de macrófagos, neutrófilos, células natural killer (NK), células dendríticas y células T natural killer (NKT). No solo la respuesta inmune sino también las células tubulares contribuyen a la inflamación debido a producción de citocinas pro-inflamatorias, como: el factor de necrosis tubular alfa (TNF $\alpha$ ), proteína quimio-atrayente de monocitos (MCP-1), Factor transformante de crecimiento (TGF- $\beta$ ), así como diferentes interleucinas: IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$ .<sup>10</sup>

Antes se especulaba que con tratar oportunamente la LRA y darle seguimiento al paciente hasta que retomara su función renal basal, era más que suficiente y no representaban mayor complicación. Sin embargo, estudios recientes demuestran que la LRA incrementa el riesgo a largo plazo de desarrollar enfermedad renal crónica (ERC).<sup>3, 5, 11, 12</sup> No fue hasta el año 2007 cuando se evaluó la sobrevivencia al año, de los pacientes que habían presentado LRA y en los que, no se observaron complicaciones, determinando que hacían falta más estudios longitudinales que midieran los efectos de la LRA sobre la función renal a largo plazo.<sup>5</sup> No fue, sino hasta el 2011 que Lakhmir S. Chawla, et al con estudios basados en grandes poblaciones, mostraron que pacientes que sobrevivían a un episodio de LRA corrían el riesgo de progresar a estadios avanzados de ERC.

Aproximadamente existe una incidencia de 600,000 casos de LRA, de éstos, el 20% de los pacientes progresan a ERC cada año, por lo cual estamos hablando que la LRA es la responsable de 120,000 casos de ERC avanzada en Estados Unidos. Existen varios factores como, la edad avanzada, niveles bajos de albúmina en suero, presencia de diabetes y la severidad de la LRA que sirven como factores de riesgo para un mal pronóstico a largo plazo.<sup>13</sup>

Recientemente se ha demostrado que pacientes que presentan el estadio 1 de LRA son cuatro veces más propensos a desarrollar ERC, sin embargo, los pacientes en estadios más avanzados incrementan el riesgo hasta once veces de presentar ERC, evidenciando que existe una íntima relación entre la severidad de la LRA y la progresión a ERC, así como, la frecuencia de episodios de LRA.<sup>3, 5</sup> Existe, además, varios reportes en modelos animales que muestra que los riñones son susceptibles a desarrollar ERC después de un episodio de LRA.<sup>5</sup>

### ***Fisiopatología de la Enfermedad Renal Crónica***

Se ha sugerido que la LRA es un importante factor de riesgo para la ERC. La enfermedad renal crónica se define como una reducción en la TFG menor a 60 ml/min y un incremento en la excreción de albúmina en la orina por un periodo de tres meses o mayor.<sup>14</sup> Desafortunadamente no existe cura para la ERC y se va observando un deterioro del tejido renal en forma progresiva hasta llegar a enfermedad renal crónica terminal (ERCT). Una vez que el paciente presenta ERCT, solo puede sobrevivir si es tratado con terapia de remplazo como, la diálisis peritoneal y hemodiálisis ó bien recibir un trasplante renal.<sup>6</sup>

Los pacientes con ERC tienen un porcentaje elevado de complicaciones entre ellas, desarrollo de LRA<sup>3</sup> por lo cual se sugiere que estos dos padecimientos se encuentran íntimamente relacionados.<sup>3, 4</sup> La enfermedad renal crónica tiene pronósticos poco favorables, si existen complicaciones, como episodios de LRA aumenta a 41 veces la probabilidad de desarrollar

enfermedad renal crónica terminal (ERCT), comparado a solo 13 veces más probabilidad de riesgo de aquellas personas que solo presentaron LRA sin una ERC.<sup>11</sup>

En años recientes se han buscado los mecanismos involucrados en la progresión de LRA a ERC <sup>5, 15</sup>, dentro de los mecanismos que conllevan a esta enfermedad sobresalen la pérdida de nefronas e hipertrofia glomerular, la fibrosis e inflamación intersticial, el daño endotelial y la deformación vascular e hipertrofia tubular. <sup>5</sup> También se han sugerido mecanismos involucrados en los efectos sistémicos e intrarenales de hipertensión e hiperfiltración. <sup>5</sup>

Un proceso de reparación normal del epitelio involucra la producción de factores de crecimiento y proliferación celular. A este respecto, estudios en animales han revelado que un evento de lesión renal aguda condiciona que las células del epitelio tubular sufran un arresto en el ciclo celular en la fase G2/M, lo cual está íntimamente involucrado en la fibrogénesis. Estudios en la expresión de RNA mensajero (RNAm) y cuantificación de proteínas han demostrado una sobre expresión de (Factor transformante del crecimiento beta) TGF- $\beta$  (por sus siglás en inglés), factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF por sus siglás en inglés), adicional a esto, estudios de expresión genómica han revelado la activación del gen COL4A1 y COL1A1, responsables de la síntesis de colágena tipo 4 y 1 respectivamente <sup>16</sup>

En nuestro laboratorio desarrollamos un modelo experimental en ratas, de progresión a ERC secundario a un evento de LRA inducido por un fenómeno de isquemia/reperfusión (I/R). Este modelo se caracterizó por el desarrollo progresivo de proteinuria, disminución en la depuración de creatinina y en el flujo sanguíneo renal, pero sin el desarrollo de hipertensión arterial, lo cual hace de este modelo una excelente forma de evaluar el impacto que tiene un evento de LRA en el desarrollo de ERC.<sup>17</sup> Las ratas que lograron sobrevivir a un episodio de LRA y aparentemente

recobraron su función renal, desarrollaron ERC después de 9 meses que se presentó el evento isquémico.

Este estudio tiene como propósito profundizar en las alteraciones histológicas que se presentan en la historia natural de la progresión a ERC posterior a un evento isquémico, desde que se induce la LRA hasta el desarrollo de ERC.

### ***Justificación***

La ERC es un problema de salud pública en México, genera gastos importantes al sistema de salud dadas las graves complicaciones cardiovasculares y renales a largo plazo, por lo cual, el entender de mejor manera los mecanismos por los cuales un evento de LRA conduce al deterioro progresivo de la función y la estructura renal, nos ayudaría a encontrar el primer eslabón para poder desarrollar nuevos tratamientos que detengan o que retrasen la progresión a ERC.

### ***Objetivo General***

Determinar los cambios morfológicos que ocurren en las nefronas tanto a nivel glomerular como tubular posterior a un evento de LRA y que condicionan el desarrollo de ERC.

### ***Objetivos Particulares***

1. Determinar el curso temporal del incremento del diámetro glomerular, así como, el diámetro de los túbulos en las nefronas de las ratas afectadas a diferentes tiempos durante la progresión de la enfermedad.
2. Llevar a cabo un registro de los cambios histológicos en el riñón de ratas afectadas para compararlo con el grupo de ratas sanas.

3. Comparar la densidad de glomérulos entre ratas sometidas a daño isquémico y las ratas con cirugía falsa durante el estudio.
4. Determinar el grado de proliferación del epitelio tubular en la transición de la LRA a ERC.

### **Metodología**

**Modelo de Isquemia/Reperusión:** Se utilizaron 36 ratas Wistar macho con un peso entre 250 a 300 g. Las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (30 mg/kg) y se colocaron en una cama termoregulada, la isquemia renal bilateral (IR) se indujo al interrumpir el flujo sanguíneo en ambos riñones mediante la colocación de un clip en cada arteria renal durante 45 min, posteriormente, los clips se retiraron y se verificó de forma visual que ocurriera una adecuada reperusión en ambos riñones. Los animales fueron suturados y se dejaron evolucionar en 8 sub-grupos por 30, 60, 90 y 120 días hasta su sacrificio. Las ratas sometidas a cirugía falsa (Sham), se manipularon de la misma forma que las ratas sometidas a I/R, pero sin la colocación de los clips.

Los grupos experimentales que se incluyeron en éste estudio son:

- Sham de 30 días (n=3)
- Sham de 60 días (n=3)
- Sham de 90 días (n=3)
- Sham 120 días (n=4)
- IR de 30 días (n=5)
- IR de 60 días (n=7)
- IR de 90 días (n=4)
- IR de 120 días (n=7)



**Parámetros funcionales:** Cada 30 días, las ratas se colocaron en jaulas metabólicas para recolectar la orina de 24 h y cada 90 días se obtuvo previa anestesia con isoflurano, una muestra de sangre de la arteria ocular para determinar la creatinina sérica (CrS). La concentración de creatinina en suero y orina se determinó por medio del ensayo QuantiChrom creatinine kit (DICT-500); junto con la determinación de la creatinina en la orina, se calculó la depuración de creatinina (CrCl).

La excreción de proteínas en la orina se determinó en la recolección de 24 horas realizada mensualmente por medio del método de turbidimetría con ácido tricloroacético.

Después de los respectivos 30, 60, 90 y 120 días de realizada la isquemia de 45 minutos, las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (30 mg/kg) y fueron colocadas nuevamente en una mesa termoregulada. Se realizó el registro de la presión arterial media con un transductor de presión (Model p23 db, Gould. Puerto Rico) y se capturó con un polígrafo (Grass Instruments, Quincy, MA). Posteriormente se realizó una incisión longitudinal en la línea media del abdomen, se disecó y expuso la arteria renal izquierda y se colocó una sonda de ultrasonido (1RB, Transonic, Ithaca, NY) alrededor de ésta arteria para realizar el registró del flujo sanguíneo renal.

**Estudios histopatológicos.** Al finalizar el experimento, el riñón derecho se extrajo, fue separado en corteza y médula renal; se almacenó en nitrógeno líquido y posteriormente se conservaron a -70°C para los estudios moleculares. El riñón izquierdo se perfundió a través de un catéter en la arteria femoral con amortiguador de fosfatos, manteniendo la presión arterial media de cada animal, posteriormente se perfundió con 20ml de formalina al 10%, después se colocó en un frasco con formol por un día. Se realizaron cortes transversales para incluir en parafina, pasando por alcohol al 70%, al 96%, y finalmente al 100% (deshidratación), xilol (aclaramiento) y por último en parafina (impregnación), con ayuda del equipo LEICA TP1020 Histoquinette. Al final de este proceso se

obtienen pequeños bloques de parafina con el tejido renal embebido, del cual se realizaron cortes de 3 $\mu$  los cuales fueron teñidos con hematoxilina-eosina (HE) con el fin de poder analizar la morfología y a su vez se realizó una tinción Rojo de sirio para la evaluación de fibrosis. Se analizó el factor de proliferación realizando una tinción inmunohistoquímica para Ki67. Donde el corte se hidrata, se realizó la recuperación antigénica con citrato, después se realiza el marcaje con un anticuerpo contra Ki67 y se revela con el sistema di-amino bencidina (DAB).

Ki67 es una proteína que nos sirve como indicador de la proliferación celular, ya que está presente en el proceso de replicación celular, proceso que es importante para la reparación que revierte el daño provocado durante un evento agudo de isquemia, por lo cual se utilizó para medir la regeneración en el epitelio tubular.

En las laminillas teñidas con HE, se evaluó el tamaño glomerular mediante la determinación del diámetro glomerular menor; para lo que, se capturaron 10 campos (10X) de corteza renal de cada grupo de ratas utilizando una cámara digital incorporada en un microscopio compuesto Nikon80i y se midieron al menos 1500 glomérulos en las microfotografías digitalizadas por cada grupo. Se cuantificó el diámetro glomerular con un promedio de tres diámetros por glomérulo y los diámetros fueron agrupados en rangos con el fin de detectar la aparición de hipertrofia glomerular. También, se analizó el daño túbulo intersticial con la medición del diámetro tubular con el fin de detectar la presencia de una hipertrofia tubular. Así mismo, se determinó el porcentaje de glomérulos con glomeruloesclerosis y la cantidad de glomérulos por área de cada campo analizado un promedio de 1.073954843 mm<sup>2</sup>

En las secciones teñidas con Rojo de Sirio se capturaron 5 campos (40X) subcorticales de los riñones de diferentes grupos para evaluar el porcentaje de fibrosis túbulo-intersticial mediante morfometría. La fibrosis túbulo-intersticial consiste en expansión de la matriz extracelular,

deposición de colágena junto con distorsión o colapso de los túbulos, por lo cual se delimitó el área afectada. El porcentaje de fibrosis se calculó al dividir el área fibrótica entre el área total excluyendo el área glomerular y el área de la luz tubular. Para evaluar la proliferación celular se realizó inmunohistoquímica para Ki 67 y se cuantificó el número de células positivas para Ki 67 a nivel tubular. Todas estas determinaciones se realizaron mediante un análisis doble ciego.

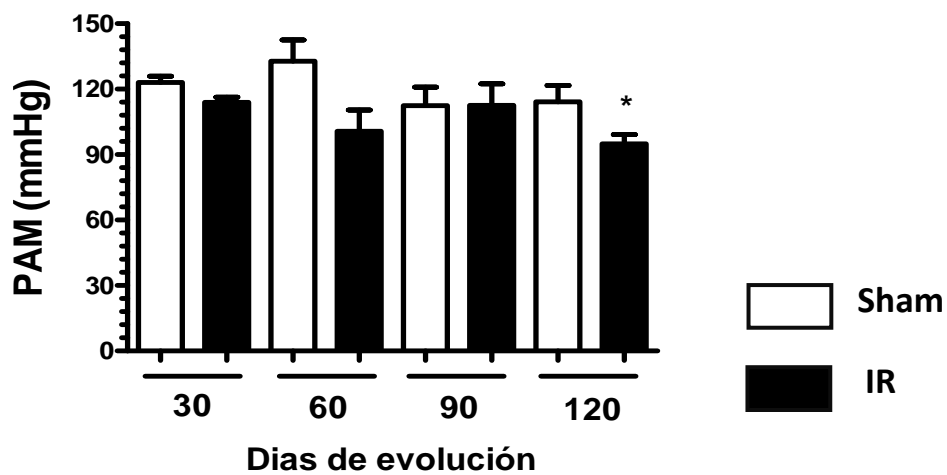
### ***Análisis estadístico***

Para la descripción de los grupos se utilizó el promedio de cada grupo con su respectivo error estándar. En el caso de determinar diferencias solo entre dos grupos se realizaron pruebas T de Student para grupos no pareados. Mientras que, las diferencias estadísticamente significativas entre tres o más de los grupos estudiados, se llevaron a cabo pruebas de ANOVA de una vía, con prueba post-hoc de Bonferroni, donde se consideró significativo un valor de  $p < 0.05$  para ambas pruebas estadísticas. Las diferencias en los rangos de los diámetros glomerulares entre los grupos se evaluaron mediante análisis de contingencia, y las diferencias se evaluaron mediante la prueba de Xi cuadrada con la corrección de Yates. La correlación entre los datos fue evaluada por el test de Pearson. La significancia estadística se definió cuando el valor de  $p$  fue  $< 0.05$ .

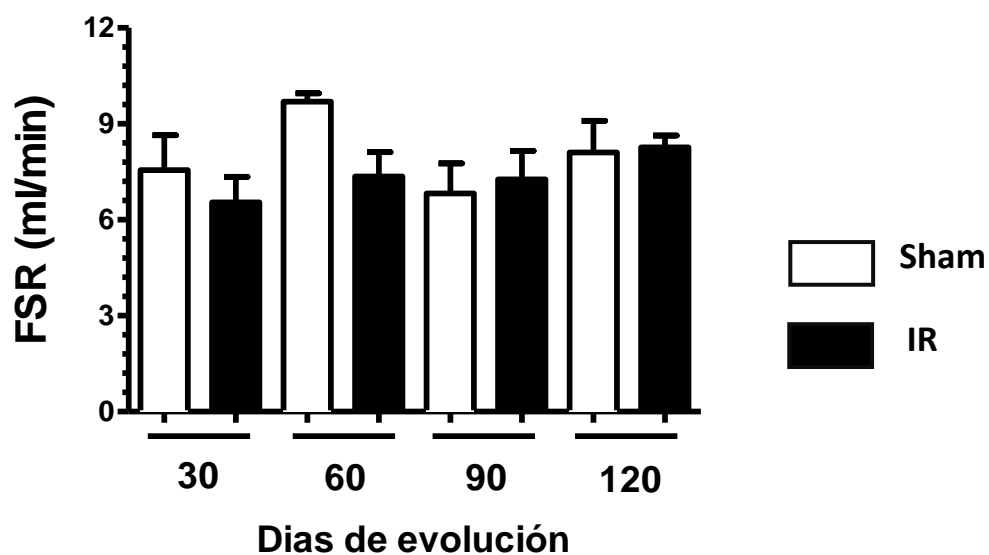
### ***Resultados***

Como se muestra en la Figura 1, la presión arterial media (PAM) se mantuvo estable en todos los grupos experimentales, con excepción de las ratas de 120 días post isquemia, quienes registraron una disminución estadísticamente significativa, sin repercusión fisiológica. El flujo sanguíneo renal (FSR) se mantuvo en parámetros normales hasta el cuarto mes de seguimiento en el grupo sometido a isquemia (Fig.2). Estos datos hacen sentido al observar que hasta el cuarto mes de seguimiento no se observan cambios en la depuración de creatinina (CrC) en los grupos de

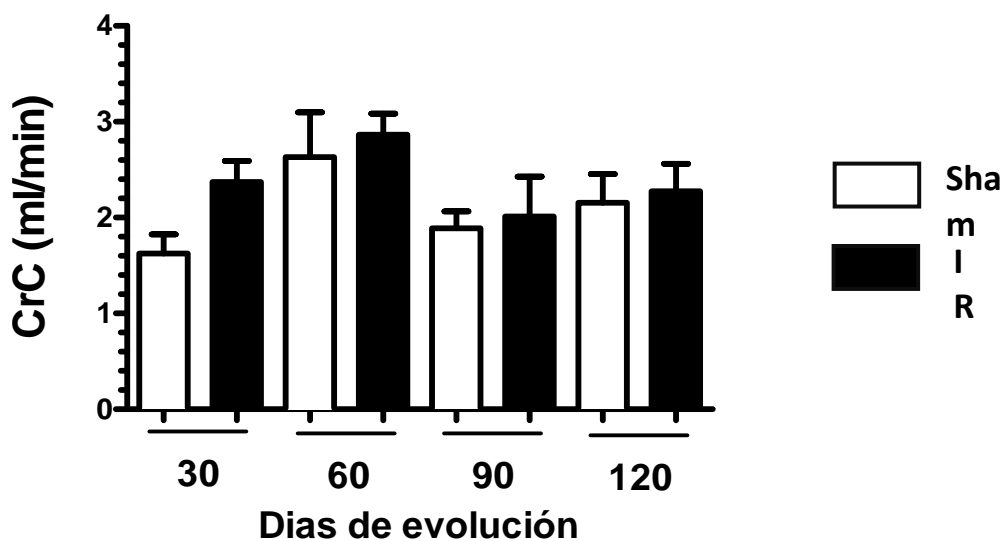
isquemia con respecto a sus controles, lo cual sugiere que a los 120 días de evolución post isquemia aún no se detecta daño funcional renal (Fig. 3).



**Figura 1. Registro entre grupos experimentales de la Presión Arterial Media (PAM).** PAM expresada en mm/Hg, las ratas con 120 días de evolución post isquemia presentan una disminución significativa con respecto a su grupo cotrol. \*  $p < 0.05$ .

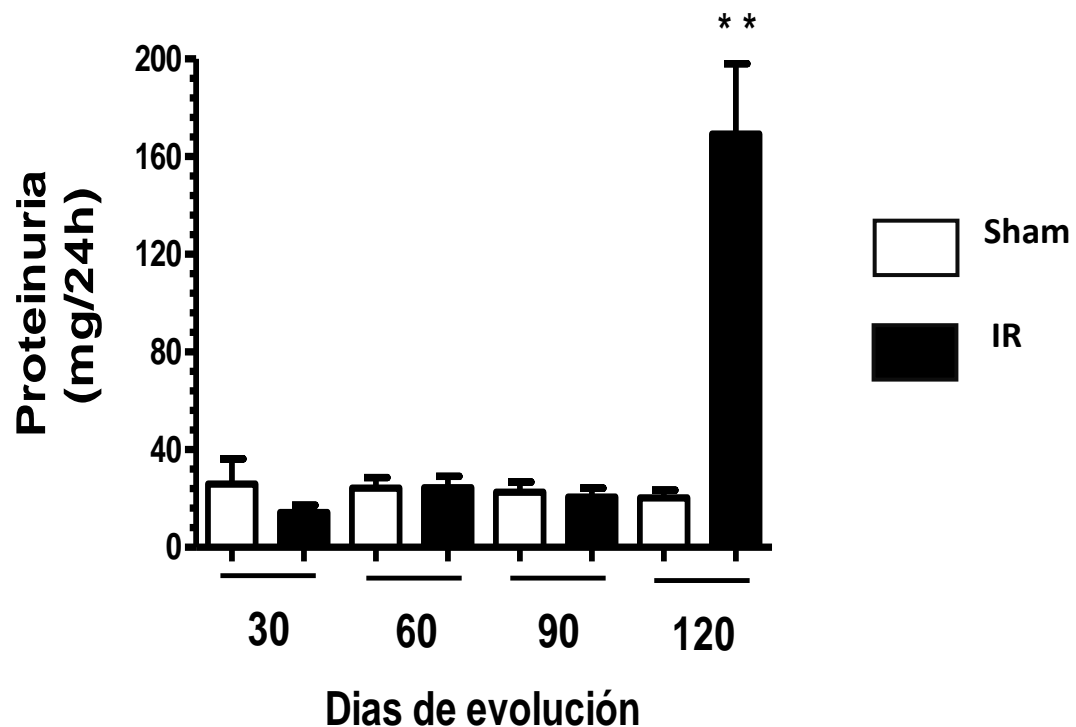


**Figura 2. Seguimiento durante cuatro meses del flujo sanguíneo renal (FSR) entre grupos experimentales. FSR expresado en ml/min, no se observan diferencias significativas entre los grupos.**



**Figura 3. La función renal determinada por la Depuración de creatinina (CrC) no se ve afectada hasta los 4 meses de seguimiento posterior al evento isquémico. La CrC esta xpresada en ml/min, no hay diferencias significativas entre los grupos.**

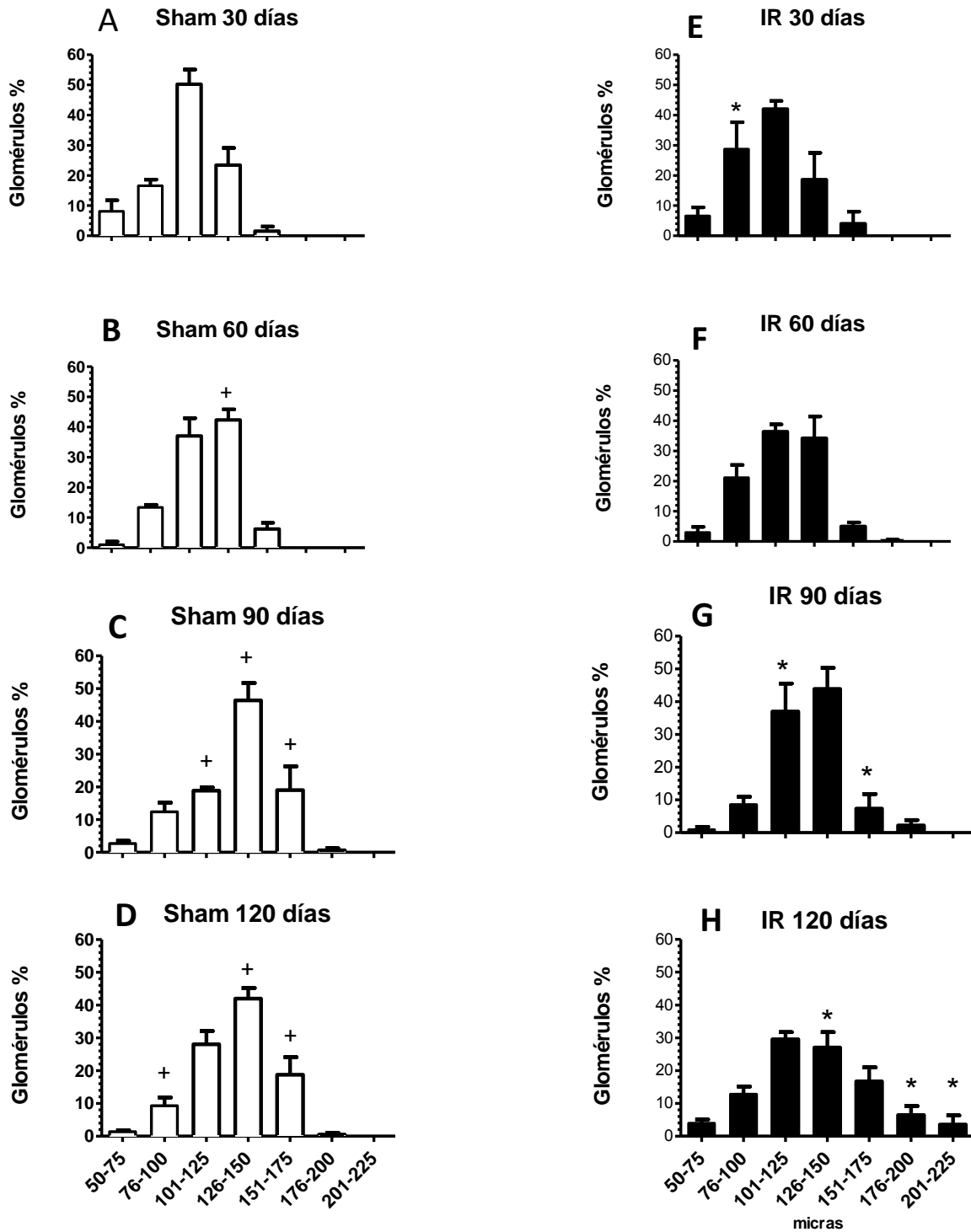
A pesar de que los animales sometidos a isquemia no presentaban aún daño funcional, si se observó aumento significativo en la proteinuria en el grupo de isquemia con seguimiento durante 120 días. Este grupo muestra una diferencia significativa comparado con el grupo control y el resto de los grupos de isquemia. (Fig. 4)



**Figura 4.** Al cuarto mes de seguimiento existe un aumento significativo en la excreción de proteínas en orina, denotando el desarrollo de Enfermedad renal crónica al cuarto mes de seguimiento posterior al evento isquémico. Proteinuria expresada en mg/24h, solo el grupo de 120 días post isquemia denota una diferencia significativa \*\*  $p < 0.05$  vs el resto de los grupos

En lo que respecta al análisis de los diámetros glomerulares, se observan diferencias entre los grupos, siendo evidentes los cambios en diámetro glomerular entre ratas sham y post isquemia en el mismo tiempo de evolución. El grupo sham de 30 días presento una distribución normal, en la cual el 50% de glomérulos se encuentra en un rango de 101-125  $\mu$  (Fig.5.A). En los grupos Sham de

60, 90 y 120 días (Figuras 5B, C y D respectivamente) se aprecia que el crecimiento de las ratas *per se*, modificó el tamaño glomerular, el rango con mayor porcentaje de glomérulos (50%) cambió a: 126-150  $\mu$  manteniéndose así hasta el final del seguimiento, sugiriendo que las ratas han completado su desarrollo en el cuarto mes posterior a la realización de la cirugía falsa. En contraste con lo anterior, en los animales sometidos a isquemia renal, se presentó un patrón de distribución diferente a los grupos controles desde los 30 días post-isquemia. Como se observa en la figura 5-E hubo un mayor porcentaje de glomérulos pequeños (30%) en el rango de 76-100  $\mu$ , contrastando con el grupo Sham correspondiente, donde solo el 20% de los glomérulos pertenecen al mismo rango. Lo mismo se observa en el grupo de 90 días post isquemia (Fig 5-F), el cual presenta también un incremento en glomérulos de ese mismo rango (76-100  $\mu$ ) con un porcentaje del 38% de glomérulos afectados, así como, una reducción en los glomérulos del rango 151-175  $\mu$  con respecto a su grupo control teniendo hasta un 10% menos de glomérulos en este rango, lo que es consistente con el grupo post isquemia de 30 días de evolución previamente mencionado, sugiriendo que existe un incremento en la proporción de glomérulos pequeños y un correspondiente decremento de glomérulos grandes, dando como resultado, una reducción de tamaño en los glomérulos que podría interpretarse como un fenómeno de hipoperfusión. No es sino hasta el día 120 después del insulto isquémico que se aprecia una marcada hipertrofia glomerular, al incrementar de manera significativa la proporción de glomérulos en rangos mayores: de 8% y 4% de rangos altos de 176-200  $\mu$  y de 201-225  $\mu$  respectivamente. Esto contrasta de forma evidente con las ratas pertenecientes a su grupo control, donde se presentan menos del 2% en el rango de 176-200  $\mu$ . Así mismo en el grupo sham no se presentan glomérulos en el rango de 201-225. (Fig. 5H).

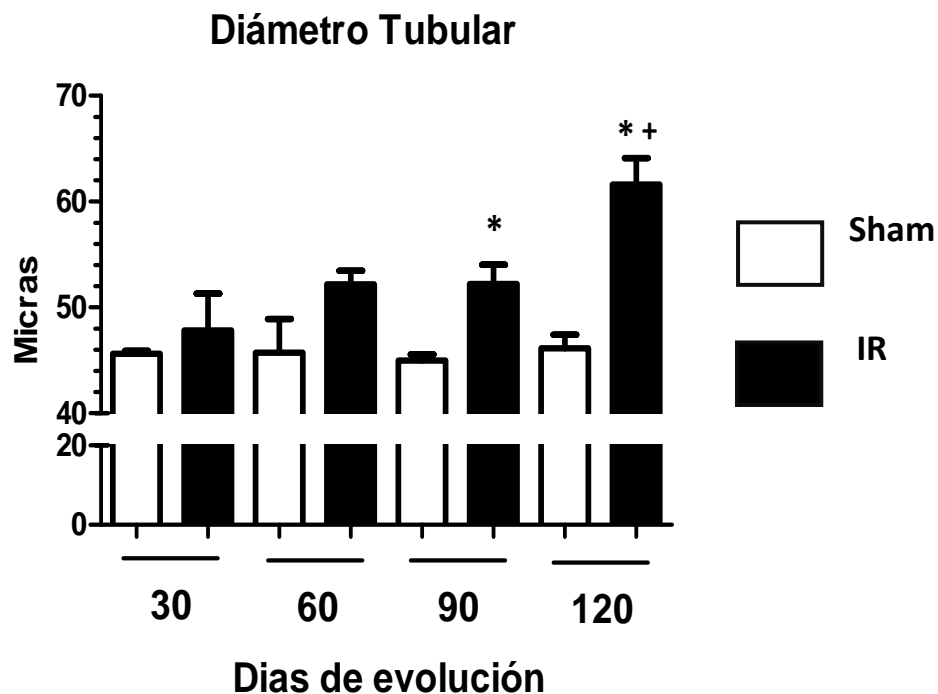


**Figura 5. Hipoperfusión renal en el primer mes de seguimiento, así como desarrollo de hipertrofia glomerular al cuarto mes posterior al evento isquémico.** Rangos correspondientes al grupo Sham 30 días (A) donde las diferencias significativas denotan el aumento de tamaño en los glomérulos por el propio crecimiento de las ratas (B, C, D). +  $p < 0.05$  vs S30d.

Se muestra una hipertrofia glomerular significativa en los grupos con 90 y 120 días post-isquemia (G,H). \* $p < 0.05$  vs Sham.



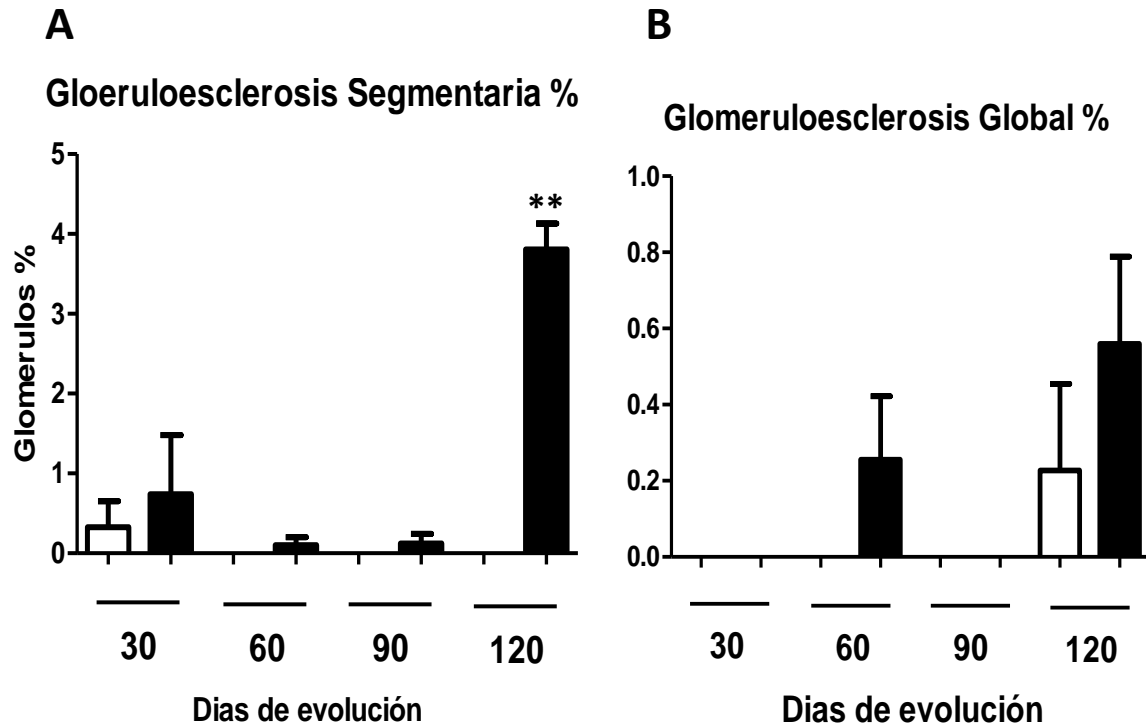
En este trabajo demostramos que el diámetro tubular es un buen indicador de dilatación tubular, es posible apreciar que a partir de los 90 días de evolución posterior al insulto isquémico, existen cambios significativos con respecto a su control; también se observa una diferencia significativa a los 120 días post isquemia, respecto a su control, que a su vez, es significativa con el grupo de 60 días post isquemia. Lo que sugiere que la dilatación tubular en el tejido es progresiva. (Fig 6).



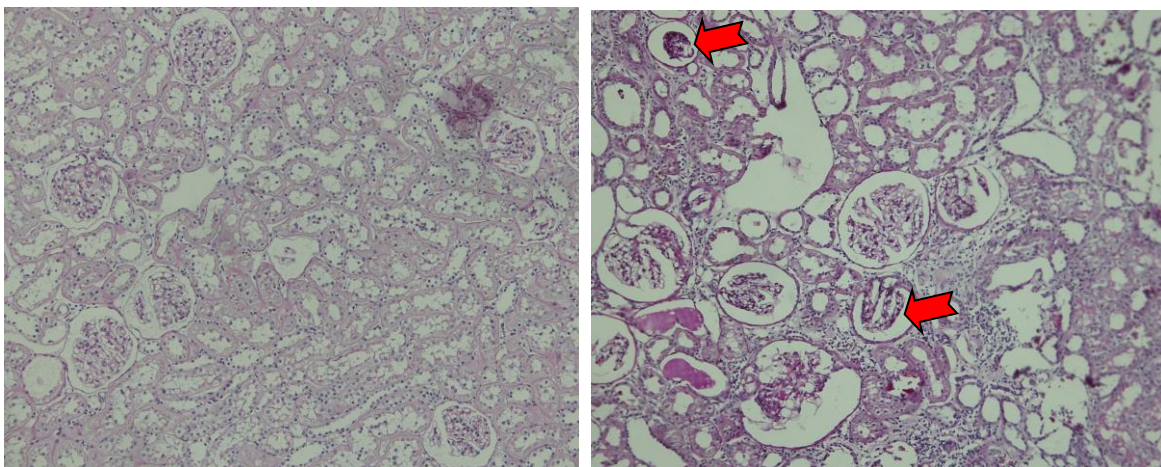
**Figura 6. Dilatación tubular evaluada mediante la determinación del diámetro tubular, dilatación desde el tercer mes de seguimiento posterior al evento isquémico.** Comportamiento del ancho tubular con diferencias significativas desde el día 90 y 120 post isquemia con respecto a su grupo control \*  $p < 0.05$ . A su vez el grupo de 120 días post isquemia es significativamente mayor con respecto a la fibrosis presente en el grupo de 60 días post isquemia +  $p < 0.05$ .

La glomerulosclerosis, se clasifica en 2 grupos para su estudio: la segmentaria y la global, donde la segmentaria corresponde a la presencia de esclerosis de 50% o menos de la masa glomerular y la global corresponde a más del 50% de daño en el glomérulo. En la figura 7.A se observan

diferencias significativas en cuanto al porcentaje de glomérulos con esclerosis segmentaria a los 120 días de evolución post isquemia con respecto a su grupo control y a los demás grupos post isquemia.

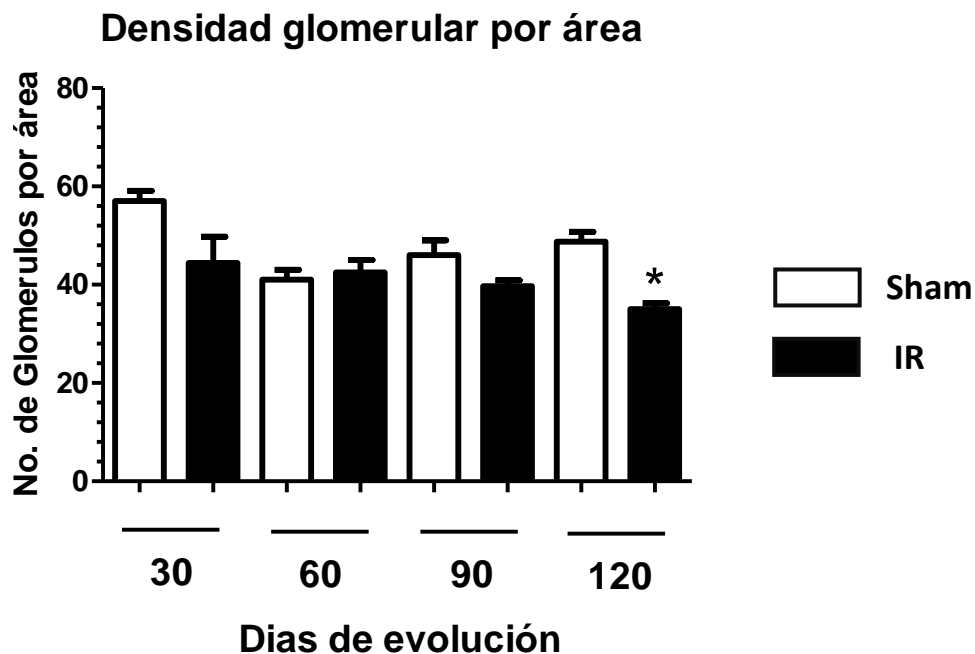


**Figura 7. Esclerosis glomerular en los grupos sometidos a isquemia, con presencia importante al cuarto mes de seguimiento.** Glomeruloesclerosis medida en los grupos, donde solo la segmentaria posee un incremento significativo a los 120 días post isquemia con respecto al resto de grupos de estudio. \*\*  $p < 0.05$  vs todos los grupos.



**Figura 8. Campos representativos de Glomeruloesclerosis** De lado izq. Rata de 120 días Sham, a la derecha rata de 120 días post isquemia. (HE / 10X)

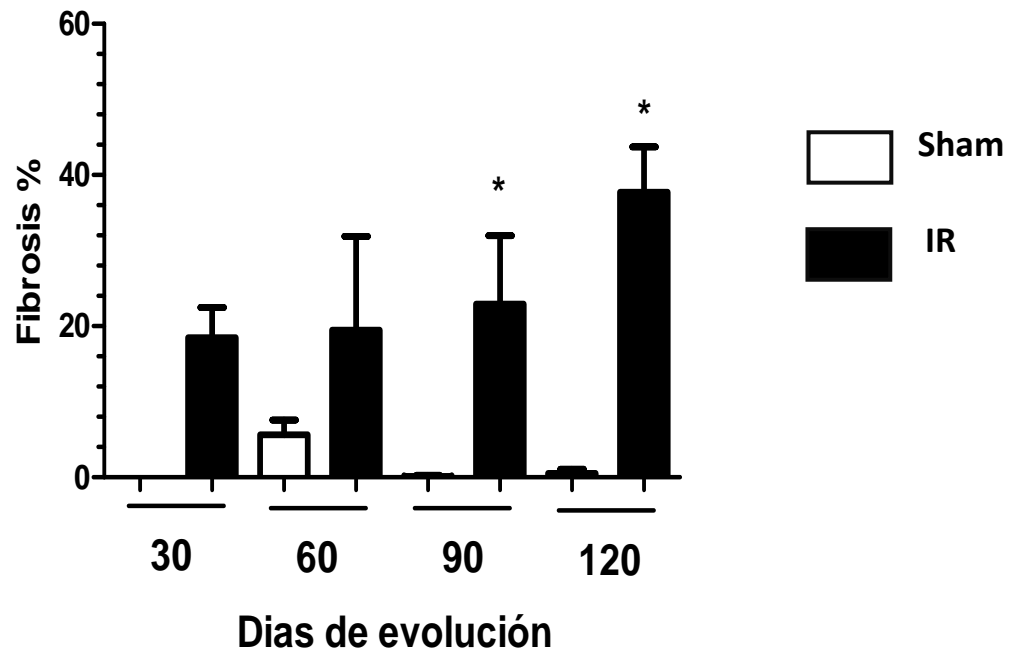
Es importante señalar que en este modelo podemos corroborar que en la ERC hay una pérdida de nefronas. La densidad glomerular mostró una reducción significativa del número de nefronas por área en las ratas de 120 días de progresión post isquemia, con respecto a su control, pasando de 58-60 glomérulos cada 1.7mm<sup>2</sup> en las ratas Sham a una reducción de menos de 40 glomérulos en la misma área en ratas de 120 días post isquemia. (Fig.9)



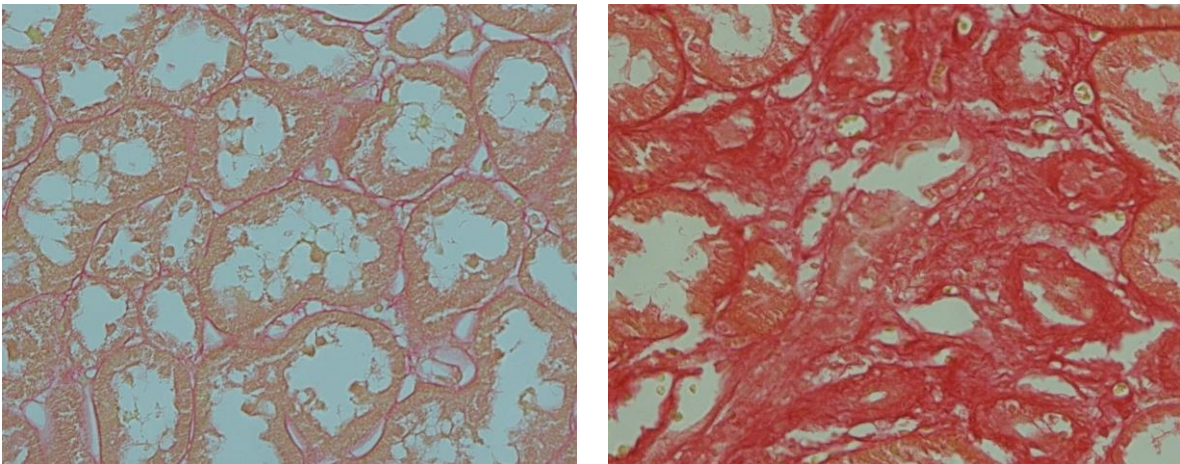
**Figura 9. Número de nefronas por área en el desarrollo de Enfermedad renal crónica.** Numero de glomérulos por área (1.7mm<sup>2</sup>) donde se aprecia un decremento significativo de glomérulos en el grupo de 120 días de isquemia \*p< 0.05.

Con respecto a la fibrosis túbulo intersticial es posible observar un incremento a partir del día 90 post isquemia, que fue mayor y estadísticamente significativa a los 120 días de evolución, en contraste con los respectivos grupos control donde la fibrosis en el tejido es casi nula (Fig. 10).

## Fibrosis Túbulo Intersticial

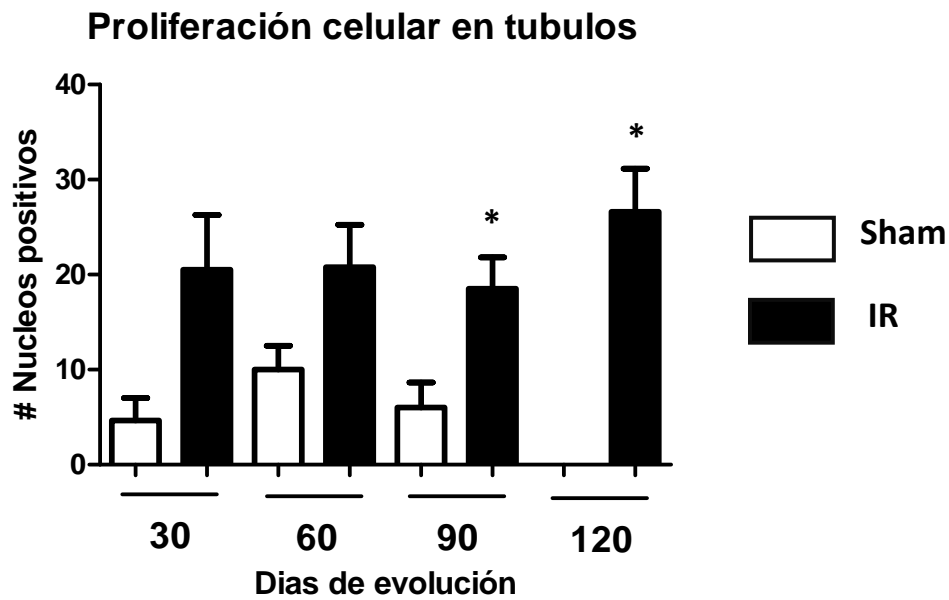


**Figura 10. Presencia de Fibrosis túbulo intersticial desde el tercer mes posterior al evento de Lesión renal aguda (LRA).** Solo las ratas de los grupos de 90 y 120 días post isquemia mostraron un incremento significativo de fibrosis túbulo-intersticial con respecto al resto \*p < 0.05 vs Sham.

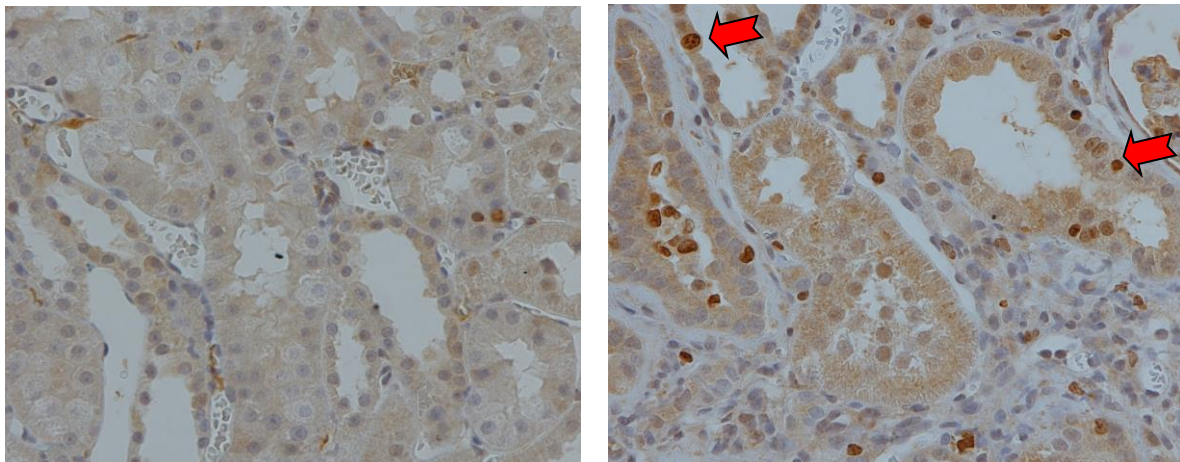


**Figura 11. Campos representativos de fibrosis.** Del lado izq. Rata de 120 días Sham, a la derecha rata de 120 días post isquemia. (Rojo de sirio/ 40X)

Por último, se evaluó la proporción de núcleos positivos para la proteína Ki67 en las células del epitelio tubular. Los resultados indican que en los grupos con isquemia se observa una desregulación en esta actividad proliferativa, ya que la presencia de este factor se mantiene incrementando con cada periodo de observación, esto conlleva a un aumento en la dilatación tubular, lo que además podría ser responsable del desarrollo de fibrosis túbulo-intersticial (Fig.12).



**Figura 12. Proliferación anormal evidente desde el tercer mes de seguimiento.** Evidencia de la desmesurada proliferación celular en el epitelio tubular \*p < 0.05 vs Sham.



**Figura 13. Inmunohistoquímica de Ki67.** Del lado izq. Rata de 120 días Sham, a la derecha rata de 120 días post isquemia (IHQ / 40X)

## **Discusión**

La Enfermedad renal crónica (ERC) es un padecimiento considerado un grave problema de salud pública. La ERC se caracteriza por anomalías en la estructura o en la función renal, presentes durante más de 3 meses con implicaciones a la salud. Para la determinación de este padecimiento se proponen los siguientes marcadores de daño renal:

- Albuminuria > 30 mg/24h
- Anormalidades en el sedimento de la orina
- Anormalidades electrolíticas debido a alteraciones tubulares
- Anormalidades detectadas en la morfología

También la reducción de la TFG se utiliza como un parámetro para determinar el estadio de la ERC, donde se caracteriza una TFG anormal cuando es menor a 60 ml/min, ya que la TFG normal es de 125 ml/min<sup>1, 18</sup>

Dentro de los factores de riesgo que se saben predisponen al desarrollo de ERC se encuentra la LRA. Sin embargo, hasta el momento se desconocen los mecanismos precisos que llevan al desarrollo de disfunción renal crónica posterior a un evento isquémico.<sup>19, 20, 21</sup>

Modelos animales han ayudado a dilucidar la fisiopatología y el proceso de reparación que ocurre en la LRA, también han proporcionado pistas del desarrollo de la ERC posterior a un evento isquémico.<sup>19</sup> En este estudio, desarrollamos un modelo mediante el cual podemos diseccionar los mecanismos que pueden estar participando en esta progresión. En los resultados demostramos, que, en el grupo con cuatro meses de seguimiento posterior a un evento de LRA, no muestra alteración en la función renal, evaluada por la depuración de creatinina, tal y como se muestra en la figura 3. La depuración de creatinina es un parámetro usado ampliamente para el diagnóstico de daño renal, sin embargo, este parámetro fisiológico, no reflejó lo que estaba ocurriendo a nivel

histológico. Estos resultados muestran que el túbulo-intersticio es afectado desde etapas tempranas post-isquemia y que las nefronas no dañadas en ese momento, se hipertrofian e hiperfiltran para compensar la función de las nefronas dañadas.

Los cambios hemodinámicos son esenciales en la progresión a enfermedad renal crónica, ya que se ha demostrado que existe una fuerte asociación entre la hipertensión y el daño renal. La hipertensión ha sido asociada con el desarrollo de la disfunción renal, siendo así un elevado flujo sanguíneo un marcador de daño renal.<sup>22</sup> Sin embargo, en este modelo experimental, ni la presión arterial media ni el flujo sanguíneo renal (FSR) mostraron cambios, denotando que en este modelo los hallazgos observados de ERC son consecuencia directa del daño isquémico agudo y que se inicia en el túbulo-intersticio. (Fig. 2).

La elevación de la proteinuria, característica presente habitualmente en el daño renal, se incrementó de forma significativa a los 4 meses, con niveles superiores a los 30 mg/24h considerados como indicativo de la ERC (Fig. 4), por lo tanto fue el único parámetro funcional (proteinuria) que mostró la presencia de daño renal, pero que fue evidente solo hasta el cuarto mes de seguimiento, cuando a nivel histológico, ya eran evidentes las alteraciones desde los 3 meses de evolución post-isquemia, reflejado en el incremento del diámetro glomerular, ancho tubular y el incremento progresivo de fibrosis túbulo intersticial.

La progresión a enfermedad renal crónica se caracteriza por un continuo, progresivo e irreversible daño en la estructura del riñón debido a la pérdida de nefronas y al remplazo de tejido dañado por fibrosis. Se ha propuesto que, el mantenimiento de la función renal posterior a un evento de LRA puede conducir a una hipertrofia glomerular y tubular.<sup>23</sup>

La cuantificación del diámetro glomerular, refleja el aumento de tamaño en los glomérulos (101-125 y 126-150 micras) en los grupos Sham 60, 90 y 120 días se deben per se al desarrollo normal

de las ratas (Fig.5A-D), sin embargo al comparar los diámetros glomerulares obtenidos en los grupos post-isquemia, pudimos observar un incremento en el rango de glomérulos pequeños (76-100 micras) , lo que sugiere un fenómeno de hipoperfusión entre los 30 y 60 días post-isquemia (Fig. 5 E), empero los glomérulos progresan a una hipertrofia, que se ve reflejada en el incremento de los diámetros glomerulares de más de 200 micras, posterior a los 120 días post-isquemia. (Fig. 5 H). Estos resultados sugieren que hubo una pérdida temprana de nefronas y que las nefronas remanentes se hipertrofian para compensar la función de las nefronas faltantes y de las que se continuaron dañando, como lo muestra la presencia de esclerosis segmentaria.

Los cambios histológicos son el estándar de oro para el diagnóstico de estas alteraciones, como se ha reportado previamente, se han propuesto dos modelos con énfasis en la participación del glomérulo ó el tubulointersticio como sitios en los cuales ocurre un insulto renal que conlleva a ERCT. En la hipótesis de la “sobrecarga”, un insulto renal inicial tiene como resultado el decremento en el número de nefronas funcionales, en respuesta a este fenómeno, las nefronas aun presentes incrementan su función a manera de compensación. Esto ocasiona a la larga un daño estructural en la nefrona y pérdida de las mismas.

La segunda hipótesis, llamada “hipótesis de la fibrosis” sugiere que un insulto renal inicial tiene como resultado daño tubulointersticial con la posterior inflamación y daño severo a la pared tubulointersticial.

Estas vías previamente mencionadas no son mutuamente excluyentes, pero son dos maneras diferentes de conceptualizar la naturaleza progresiva de la ERC.<sup>24</sup> Es por esto que otro parámetro importante de daño histológico es la dilatación tubular, observándose diferencia significativa, desde los 90 días post isquemia, lo cual sugiere que los procesos de reparación epitelial fallan dando origen a una excesiva proliferación de células epiteliales tubulares, que a su vez deriva en



un incremento en el diámetro de los túbulos que, sumados a los incrementos en diámetros glomerulares conllevan al aumento de volumen renal. Aunado a esto, los análisis histológicos demuestran incremento significativo en la fibrosis túbulo intersticial, sugiriendo que los errores en los procesos de reparación epitelial, pueden ser causa de diferenciación epitelio mesénquima (DEM) que da lugar a la generación de fibroblastos, responsables del incremento en la fibrosis tubulointersticial.

Es bien sabido que la regeneración tubular posterior a un evento de LRA, debido a la pérdida del epitelio tubular, involucra una rápida e intensa señalización en vías implicadas en la proliferación y diferenciación de células epiteliales, acompañado de la secreción de citocinas y factores de crecimiento, por lo tanto, durante la LRA ocurren procesos de diferenciación, migración, y la proliferación de las células sobrevivientes. Una sana regeneración de la LRA no solo involucra el cese de la división celular, sino también la re-diferenciación de las células. Las células epiteliales tienen una proliferación vigorosa posterior a la LRA, pero frecuentemente no existe recuperación a su estructura normal. Dando origen así a errores en la reparación tubular, que pueden derivar a hipertrofia tubular y el establecimiento de fibroblastos que, posteriormente, son causantes de la fibrosis túbulo intersticial. Por lo tanto, la LRA es seguida de una recuperación incompleta y/o desordenada que conlleva a un daño residual que puede llevar al desarrollo de ERC.<sup>24, 25</sup>

Para demostrar que los procesos en la regeneración epitelial están involucrados en la progresión a ERC, se llevaron a cabo inmunohistoquímicas dirigidas al factor de proliferación celular Ki 67 donde es posible evidenciar que hay desregulación de la replicación celular (Fig. 12, 13) denotando un marcado incremento en la proliferación incluso a los 30 días post-isquemia y manteniéndose elevación de la misma a través de los 60, 90 y 120 días post-isquemia, sugiriendo

que no se posee un control en la proliferación celular y esta se mantiene de manera desmesurada a través de la progresión a ERC.

Previamente se ha descrito que la filtración anormal del glomérulo, inflamación, fibrogénesis y la hipoxia contribuyen al desarrollo de daño tubulointersticial a su vez perpetúan el daño renal, contribuyendo a la progresión de la enfermedad renal crónica.<sup>24</sup>

### ***Conclusiones***

Los resultados encontrados en este estudio, sugieren la presencia de alteraciones en la estructura renal posteriores a una lesión tipo isquemia-reperfusión, asociadas con el desarrollo de características típicas de la enfermedad renal crónica. Con lo anterior demostramos, que efectivamente un evento de LRA conlleva al desarrollo de ERC y que esta progresión de la ERC se manifiesta de forma temprana a nivel histológico, sin repercusiones a nivel funcional en los primeros 3 meses del desarrollo de la enfermedad. Esta información es reveladora, ya que las alteraciones fisiológicas son detectables después de 4 meses de progresión de esta enfermedad. Finalmente, se ha descrito que el daño isquémico puede resultar en glomérulos atubulares y que puede ser el responsable de un decremento en nefronas funcionales, de forma tal que, las nefronas funcionales remanentes se hipertrofian y son más vulnerables a cambios patológicos. Así mismo, los mecanismos de reparación celular sufren desregulación en su función, teniendo como consecuencia proliferación celular excesiva que, a su vez promueve un fenómeno de hiperplasia en los túbulos.

## Referencias

1. Douglas Eathon, John Pooler Vander's Renal Physiology, 7th Edition, McGraw Hill Professional (2011).
2. Sánchez-Pozos, K. *et al.* Recovery from ischemic acute kidney injury by spironolactone administration. *Nephrol. Dial. Transplant* **27**, 3160–9 (2012).
3. Jason Kline and Jean-Sebastien Rachoin. Acute Kidney Injury and Chronic Kidney Disease: It's a Two-Way Street. *Informa Healthcare*, 35(4): 452–455, (2013)
4. Neesh Pannu, MD, SM, Brenda Hemmelgarn, MD, PhD. The Acute Kidney Injury to Chronic Kidney Disease Continuum. *ARCH INTERN MED/VOL* **171** (NO. 3), (2011)
5. Chawla, L. S. & Kimmel, P. L. Acute kidney injury and chronic kidney disease: an integrated clinical syndrome. *Kidney Int.* **82**, 516–24 (2012).
6. Okusa, M., Chertow, G. & Portilla, D. The nexus of acute kidney injury, chronic kidney disease, and World Kidney Day 2009. *Clin. J. ...* 520–522 (2009). doi:10.2215/CJN.06711208.
7. Philip Kam Tao Li, Emmanuel A. Burdmann, Ravindra L. Mehta. Acute Kidney Injury: Global Health Alert. *Transplantation* **95**, 653-657 (2013)
8. Mark D. Okusa and Andrew Davenport, Reading between the (guide)lines—the KDIGO practice guideline on acute kidney injury in the individual patient. *Kidney Int.* **85**, 39–48 (2013)
9. Timothy A. Sutton, Charles J. Fisher, and Bruce A. Molitoris. Microvascular endothelial injury and dysfunction during ischemic acute renal failure. *Kidney International*, Vol. **62**, pp. 1539–1549 (2002).
10. Joseph V. Bonventre, Li Yang. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. The Journal of Clinical Investigation. Vol. **121**, 4210-4221 (2011)
11. Pannu, N. Bidirectional relationships between acute kidney injury and chronic kidney disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **22**, 351–6 (2013).
12. Goldstein, S. L., Jaber, B. L., Faubel, S. & Chawla, L. S. AKI transition of care: a potential opportunity to detect and prevent CKD. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **8**, 476–83 (2013).
13. Lakhmir S. Chawla, Richard L. Amdur, Susan Amodeo, Paul L. Kimmel, Carlos E. Palant. The severity of acute kidney injury predicts progression to chronic kidney disease. *Kidney International* **79**, 1361–1369 (2011).
14. Jha, V. *et al.* Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *Lancet* **382**, 260–72 (2013).

15. Basile, D. P. The endothelial cell in ischemic acute kidney injury: implications for acute and chronic function. *Kidney Int.* **72**, 151–6 (2007).
16. Li Yang, Tatiana Y Besschetnova, Craig R Brooks, Jagesh V Shah, Joseph V Bonventre. Epithelial cell cycle arrest in G2/M mediates kidney fibrosis after injury. *Nature Medicine.* **Vol. 16**, Num. 5, 535-543 (2010).
17. Barrera-Chimal, J. *et al.* Spironolactone prevents chronic kidney disease caused by ischemic acute kidney injury. *Kidney Int.* **83**, 93–103 (2013).
18. Adeera Levin and Paul E. Stevens. summary of kdigo 2012 CKD Guidelne:behindthe scenes, need for guidance, and a framework for moving forward. *Kidney Int.* **85**,49-61(2013).
- 19 Michael Heung and Lakhmir S. Chawla *Predicting progression to chronic kidney disease after recovery from acute kidney injury. Curr opin nephron hipertens.* 21(6)628-34 (2012).
- 20 Ryan Goldberg and Paula Dennen *Long-Term Outcomes of Acute Kidney Injury. Advances in chronik disease. Vol 15, No 3, 297-307(2008).*
- 21 Dena E. Rifkin, Steven G. Coca and Kamyar Kalantar-Zadeh, *Does Aki truly lead to CKD? Journal of the American Society of Nephrology.*23:979-984 (2012)
- 22 Rafael Marín, Manuel Gorostidi, Francisco Fernández-Vega and Rafael Ávares-Navascués. *Systemic and glomerular hypertension and progression of chronic renal disease: The dilemma of nephrosclerosis.International Society of Nephrology.* (2005).
- 23 Manjeri A. Venkatachalam, Karen A. Griffin, Rongpei Lan, hui Geng, Pothana Saikumar and Anil K. Bidani *akute kidney injury: a springboard for progression in chronic kidney disease. Am J Physiol Renal Physiol* 298:F1078-F1094 (2010)
- 24 Kavita S. Hodgkins and H. Wiliam Schnaper . *tubulointerstitial injury and the progression of chronic kidney disease. Pediatr Nephrol* 27: 901-909 (2012).
- 25 David P. Basile, Deborah Donohoe, Kelly Roethe and Jeffrey L. Osborn. *Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillaries and influences long-term function. Am J Physiol Renal Physiol* 281:F887-F899 (2001).