

UNIVERSIDAD DE GRANADA



**FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA**

TESIS DOCTORAL

**EFFECTO PROTECTOR DEL PRECONDICIONAMIENTO
CON TRIYODOTIRONINA EN UN MODELO
EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA/REPERFUSIÓN RENAL
EN RATAS**

ANA CARLA FERREYRA LANATTA

Granada, 2013

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Ana Carla Ferreyra Lanatta
D.L.: GR 874-2014
ISBN: 978-84-9028-909-9

D. JOSÉ FÉLIX VARGAS PALOMARES, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA POR LA UNIVERSIDAD DE GRANADA Y CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA. FACULTAD DE MEDICINA. UNIVERSIDAD DE GRANADA.

Certifica: Que los trabajos efectuados en la elaboración de la Tesis Doctoral titulada: **“EFECTO PROTECTOR DEL PRECONDICIONAMIENTO CON TRIYODOTIRONINA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA/REPERFUSIÓN RENAL EN RATAS”**, presentada por Ana Carla Ferreyra Lanatta, han sido realizados bajo mi supervisión y dirección, reuniendo las condiciones académicas necesarias para su presentación para optar al grado de Doctor.

Y para que conste donde proceda, firmo la presente en

Granada, a 4 de Noviembre de 2013

Fdo. José Félix Vargas Palomares

D. ANTONIO OSUNA ORTEGA, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA POR LA UNIVERSIDAD DE GRANADA, PROFESOR TITULAR Y JEFE DE LA UNIDAD DE GESTIÓN CLÍNICA DE NEFROLOGÍA DE GRANADA.

Certifica: Que los trabajos efectuados en la elaboración de la Tesis Doctoral titulada: **“EFECTO PROTECTOR DEL PRECONDICIONAMIENTO CON TRIYODOTIRONINA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA/REPERFUSIÓN RENAL EN RATAS”**, presentada por Ana Carla Ferreyra Lanatta, han sido realizados bajo mi supervisión y dirección, reuniendo las condiciones académicas necesarias para su presentación para optar al grado de Doctor.

Y para que conste donde proceda, firmo la presente en

Granada, a 4 de Noviembre de 2013

Fdo. Antonio Osuna Ortega

D. FRANCISCO O'VALLE RAVASSA, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA POR LA UNIVERSIDAD DE GRANADA Y PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA. FACULTAD DE MEDICINA. UNIVERSIDAD DE GRANADA.

Certifica: Que los trabajos efectuados en la elaboración de la Tesis Doctoral titulada: **“EFECTO PROTECTOR DEL PRECONDICIONAMIENTO CON TRIYODOTIRONINA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA/REPERFUSIÓN RENAL EN RATAS”**, presentada por Ana Carla Ferreyra Lanatta, han sido realizados bajo mi supervisión y dirección, reuniendo las condiciones académicas necesarias para su presentación para optar al grado de Doctor.

Y para que conste donde proceda, firmo la presente en

Granada, a 4 de Noviembre de 2013

Fdo. Francisco O'Valle Ravassa

PUBLICACIONES

Los resultados de esta Tesis Doctoral han sido parcialmente publicados en:

- *Ferreyra C, O'Valle F, Osorio JM, Moreno JM, Rodríguez I, Vargas F, Osuna A.* **Effect of preconditioning with triiodothyronine on renal ischemia/reperfusion injury and poly(ADP-ribose) polymerase expression in rats.** *Transplant Proc.* 2009; 41(6): 2073-5.
- *C. Ferreyra Lanatta, R. Perez Abud, F. O'Valle, J.M. Osorio, F. Vargas, I. Rodriguez, A. Osuna.* **Effect of preconditioning with triiodothyronine on renal ischemia-reperfusion injury.** 1st International Meeting on Ischemia Reperfusion Injury in Transplantation, Poitiers (París-Francia) Mayo 3-4, 2012. Comunicación oral.
- *C. Ferreyra Lanatta, F. O'Valle, I. Rodriguez, R. Wangensteen Fuentes, F. Vargas, A. Osuna.* **Protective effects of preconditioning with triiodothyronine on renal ischemia/reperfusion injury in rats.** 3rd ESOT Basic Science Meeting. 13rd TTS Basic Science Symposium, Paris (Francia) Noviembre 6-7, 2013.

Los resultados completos han sido publicados en:

- ❖ *Ferreyra C, Vargas F, Rodríguez-Gómez I, Pérez-Abud R, O'Valle F, Osuna A.* **Preconditioning with triiodothyronine improves the clinical signs and acute tubular necrosis induced by ischemia/reperfusion in rats.** *PLoS One.* 2013; 8(9): e74960.

El doctorando Dña. Ana Carla Ferreyra Lanatta y los directores de la tesis D. Félix Vargas Palomares, D. Antonio Osuna Ortega y D. Francisco O'Valle Ravassa, garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, a 4 de Noviembre de 2013.

Directores de la Tesis

Fdo.: Félix Vargas P. Fdo.: Antonio Osuna O. Fdo.: Francisco O'Valle R.

Doctorando

Fdo.: Ana Carla Ferreyra L.

AGRADECIMIENTOS

ABREVIATURAS

AA: ascorbato

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADP: adenosín dinucleótido fosfato

AMP: adenosín mononucleótido fosfato

AP-1: proteína activadora tipo 1

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ATP: adenosín trinucleótido fosfato

Ca²⁺: ion calcio

CAT: catalasa

cGPx: glutatión peroxidasa citosólica y mitocondrial

CICr: aclaramiento de creatinina

DAB: diaminobenzidina

EEM: error estándar de la media

EGF: factor de crecimiento epidérmico

eGPx: glutatión peroxidasa extracelular

EIA: enzimo inmuno análisis

eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial

ERN: especies reactivas del nitrógeno

ERO: especies reactivas del oxígeno

FCE: factor de crecimiento epidérmico

Fe²⁺: hierro en forma ferrosa

Fe³⁺: hierro en forma férrica

FGR: flujo glomerular renal

FPR: flujo de perfusión renal

FRA: fracaso renal agudo.

FRI: función retardada del injerto

giGPx: glutathion peroxidasa gastrointestinal

GOT: glutamato-oxalacetato transaminasa

GPT: glutamato-pirúvico transaminasa

GPx: glutathion peroxidasa.

GR: glutathion reductasa.

GSH: glutathion

GSSG: glutathión oxidado

H⁺: ion hidrógeno

H₂O: agua

H₂O₂: peróxido de hidrógeno.

HCl: ácido clorhídrico

HOCl: ácido hipocloroso

I/R: Isquemia/Reperusión.

IL-6: interleucina 6.

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible

IP: preconditionamiento isquémico

LDL: lipoproteína de baja densidad

LOOH⁻: lipoperóxidos

MAP: proteína mitógena activada

MDA: malondialdehido.

Mg: ion magnesio

MgCl₂: cloruro de magnesio

MPO: enzima mieloperoxidasa

Na⁺: ion sodio

NAC: N-Acetilcisteína.

NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleótido

NADP: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido

NaOH: hidróxido de sodio, sosa o soda caustica

NF-κβ: factor nuclear κβ

NO: óxido nítrico

NO₂: dióxido de nitrógeno

NOS: óxido nítrico sintasa

NTA: necrosis tubular aguda

O₂: oxígeno

¹O₂: oxígeno singlete

O₂⁻: anión superóxido

OH[•]: radical hidroxilo

ONOO⁻: peroxinitrito

PARG: Poli-ADP ribosa Glicohidrolasa.

PARP-1: Poli-ADP ribosa polimerasa 1

PARS: Poli-ADP ribosa sintetasa.

PAS: tinción del ácido Peryódico de Schiff

PLGPx: glutation peroxidasa fosfolipídica

PMN: polimorfonucleares

PNA: péptido natriurético atrial

Redox: óxido-reducción

RIPA: Radio-Immunoprecipitation Assay

RL: radicales libres

RLO: radicales libres del oxígeno.

ROOH: hidroperóxidos

ROS: especies reactivas del oxígeno.

SOD: superóxido dismutasa

T₃: triyodotironina

T₄: tiroxina

TBA: ácido tiobarbitúrico

TBARS: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

TCA: ácido tricloroacético

TFG: tasa de filtración glomerular

TM: tinción Tricrómico de Masson

TNF α : factor de necrosis tumoral α .

Xantina-D: xantina deshidrogenasa

Xantina-O: xantina oxidasa

α -TO: α -tocoferol

α -TOH: α -hidrotocoferol

ÍNDICE

I. INTRODUCCION.....	1
1. CONSIDERACIONES GENERALES.....	3
2. SINDROME DE ISQUEMIA-REPERFUSION.....	5
2.1. FASE DE ISQUEMIA.....	6
2.1.1. Generalidades.....	6
2.1.2. Niveles de Adenosintrifosfato (ATP).....	8
2.1.3. Calcio intracelular.....	10
2.2. FASE DE REPERFUSIÓN.....	11
2.2.1. Reentrada masiva de oxígeno al tejido.....	13
3. RADICALES LIBRES DEL OXIGENO (RLO).....	14
3.1. EVIDENCIA DE DAÑO RENAL POR RADICALES LIBRES.....	15
3.1.1. Toxicidad directa.....	16
3.1.2. Toxicidad indirecta.....	16
4. FISIOPATOLOGÍA DE LA ISQUEMIA REPERFUSIÓN RENAL.....	19
4.1. Cambios funcionales en el riñón.....	19
4.2. Cambios morfológicos en el riñón.....	19
5. SISTEMAS ANTIOXIDANTES.....	22
5.1. ANTIOXIDANTES ENZIMATICOS.....	22
5.1.1. Enzima superóxidodismutasa (SOD).....	22
5.1.2. Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂).....	23
5.1.2. a. Metabolización a O ₂ y H ₂ O.....	23
5.1.2. b. Vía Glutation.....	24
5.1.2. c. Reacción de Fenton-Haber Weiss.....	28
5.1.2. d. Mieloperoxidasa leucocitaria.....	29
5.2. ANTIOXIDANTES NO ENZIMATICOS.....	32

5.2.1. <i>Antioxidantes hidrosolubles</i>	32
5.2.1. a. Flavonoides y polifenoles.....	32
5.2.1. b. Vitamina C (ascorbato).....	32
5.2.1. c. Ácido úrico.....	33
5.2.1. d. Bilirrubina.....	34
5.2.2. <i>Antioxidantes liposolubles</i>	34
5.2.2. a. Vitamina E.....	34
5.2.2. b. Coenzima Q10.....	34
6. MECANISMOS DE REPARACIÓN DE DAÑO POR I/R	35
6.1. Poli ADP-ribosapolimerasa (PARP).....	35
6.2. Estructura de la PARP-1.....	38
6.3. Funciones de la PARP-1.....	38
6.4. PARP-1 en la inflamación.....	40
7. INHIBICIÓN DEL DAÑO RENAL MEDIADO POR RADICALES LIBRES	42
7.1. USO DE PRECONDICIONANTES DE ISQUEMIA.....	42
7.1.1. <i>Inhibición de la Xantina-O</i>	43
7.1.2. <i>Inhibición de RLO por SOD</i>	45
7.1.3. <i>Vitamina E</i>	46
7.1.4. <i>Captopril</i>	46
7.1.5. <i>N-Acetilcisteína (NAC)</i>	47
7.2. PRECONDICIONAMIENTO RENAL.....	48
8. ISQUEMIA REPERFUSIÓN Y HORMONAS TIROIDEAS	50
9. ACCIONES DE LA HORMONA TIROIDEA SOBRE EL RIÑÓN	51

10. USO DE LA HORMONA TIROIDEA EN EL FRA TÓXICO E ISQUÉMICO	54
II. PLANTEAMIENTOS Y OBJETIVOS	57
III. MATERIAL Y METODOS	62
1. DISEÑO DEL ESTUDIO Y GRUPOS	64
2. TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS EMPLEADOS	65
2.1. Protocolo del experimento.....	65
2.1.1. <i>Precondicionamiento</i>	65
2.1.2. <i>Preparación de la rata</i>	66
2.1.3. <i>Cateterización de la arteria carótida</i>	66
2.1.4. <i>Inducción de la isquemia/reperfusión renal</i>	66
2.1.5. <i>Extracción de muestras y sacrificio de los animales</i>	67
2.2. Procesamiento general de los riñones.....	68
3. TIPOS DE MUESTRA Y PARÁMETROS EVALUADOS	68
3.1. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS.....	69
3.1.1. <i>Parámetros metabólicos y de función renal</i>	69
3.1.2. <i>Parámetros de estrés oxidativo</i>	69
3.1.3. <i>Parámetros de Inflamación</i>	69
3.2. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS.....	69
3.2.1. <i>Parámetros de función renal</i>	69
3.2.2. <i>Parámetros de estrés oxidativo e inflamación</i>	69
3.3. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO.....	71
3.3.1. <i>Procesamiento de las muestras</i>	71
3.3.2. <i>Valoración histopatológica de las muestras</i>	72
3.3.2. a. <i>Necrosis cortical</i>	72

3.3.2. b. Túbulos.....	72
3.3.2. c. Criterios de evaluación.....	73
3.4. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO.....	73
3.4.1. <i>Procedimiento de inmunohistoquímica para muestras incluidas en parafina</i>	73
3.4.2. <i>Procedimiento inmunohistoquímico basado en polímeros conjugados con peroxidasa</i>	75
3.4.3. <i>Cuantificación de los resultados inmunohistoquímicos</i>	77
4. MÉTODO DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	78
IV. RESULTADOS	79
1. VARIABLES METABÓLICAS GENERALES	81
2. VARIABLES BIOQUÍMICAS EN PLASMA Y ORINA	82
3. VARIABLES DE ESTRÉS OXIDATIVO E INFLAMACIÓN	83
4. HISTOPATOLOGÍA Y RESULTADOS INMUNOHISTOQUÍMICOS	87
5. CORRELACIONES ENTRE NTA Y VARIABLES DE FUNCIÓN RENAL, INFLAMACIÓN Y ESTRÉS OXIDATIVO	95
5.1. PRESENCIA DE NECROSIS TUBULAR.....	96
5.1.1. <i>Presencia de NTA y variables de función renal</i>	96
5.1.2. <i>Presencia de NTA y variables de inflamación</i>	97
5.1.3. <i>Presencia de NTA y variables de estrés oxidativo</i>	97
5.2. GRADO DE NECROSIS TUBULAR.....	97
5.2.1. <i>Grado de NTA y variables de función renal</i>	97
5.2.2. <i>Grado de NTA y variables de inflamación</i>	99
5.2.3. <i>Grado de NTA y variables de estrés oxidativo</i>	99
V. DISCUSIÓN	104

VI. CONCLUSIONES.....	120
VII. BIBLIOGRAFIA.....	123

I. INTRODUCCIÓN

1. CONSIDERACIONES GENERALES

En la mayoría de los órganos, incluyendo el riñón, la isquemia transitoria es la mayor causa de daño tisular. Aunque la isquemia por sí misma puede inducir un daño importante, se sabe que las lesiones van a producirse durante el periodo de reperfusión. La contribución relativa del componente de reperfusión sobre el daño total es, al parecer, dependiente de la duración del periodo isquémico. En algunos casos la reperfusión puede constituir tanto como las dos terceras partes del total del daño (Ratych y Bulkley, 1986).

En el riñón, el daño post-isquémico se manifiesta como necrosis tubular aguda (NTA), la cual constituye la expresión morfológica común del fracaso renal agudo (FRA), y se produce por una deprivación del aporte normal de oxígeno (O₂) y nutrientes a las células epiteliales tubulares (Thadhani y cols., 1996; Schrier y cols., 2004). El grado y la extensión del daño isquémico son dependientes de la duración y severidad de la isquemia. Cuando la isquemia es subletal, se observa mayoritariamente un desprendimiento de células a la luz tubular, con fenómenos de apoptosis y necrosis en menor medida. En isquemias prolongadas se observan apoptosis y necrosis como daño primario.

Los riñones son particularmente susceptibles al daño isquémico en varias situaciones clínicas tales como: el trasplante renal (Hoste y Kellum, 2006), el tratamiento de aneurismas suprarrenales (Ellenberger y cols., 2006), las reconstrucciones de la arteria renal, la nefropatía inducida por contraste (Wong e Irwin, 2007), la parada cardiaca y el shock. En el shock hipovolémico, el riñón está expuesto a un periodo imprevisible de isquemia caliente, la cual puede ocasionar

daño en 30-45 min. El trasplante renal, por otra parte, es una situación más predecible, en la cual los órganos, por necesidad, son sometidos a cortos periodos de isquemia caliente y más largos periodos de isquemia fría.

Una de las razones de la sensibilidad renal frente a la isquemia es que la microvasculatura renal es altamente compleja y debe cumplir con una alta demanda energética. Bajo condiciones normales, el suministro de O₂ a los tejidos renales excede a la demanda. Bajo condiciones patológicas, sin embargo, el delicado balance entre el aporte y la demanda de O₂ se altera fácilmente debido a la disposición única de la microvasculatura renal.

El estudio de los procesos de isquemia/reperfusión (I/R) renal, así como la investigación de posibles medidas terapéuticas cobra especial interés en la actualidad en el campo de los trasplantes renales. En los últimos años asistimos a un cambio bastante marcado en el perfil de los donantes: progresivo aumento de la edad media y de la patología como era de esperarse, órganos con mayor tiempo de isquemia y la inclusión de programas de donación en asistolia, características todas que constituye lo que podría denominarse “donante con criterios expandidos”. Los injertos de estos donantes son más sensibles a los procesos de I/R, con una alta incidencia de NTA, conduciendo, en la mayoría de los casos, a la presencia de función retardada del injerto (FRI) (Najarian y cols., 1994; Nicholson y cols., 1996). La FRI se define como la necesidad de hemodiálisis en la primera semana postrasplante inmediato; se presenta en un 50% de los trasplantes renales y es la primera causa de riñones no funcionantes. Esta circunstancia dificulta el manejo del tratamiento inmunosupresor del receptor,

asociándose a una mayor incidencia de rechazo agudo así como disminución de la supervivencia del injerto y del paciente.

Como consecuencia del daño por I/R, se produce una alteración del riñón a trasplantar provocando una NTA en mayor o menor grado que puede afectar la función y viabilidad del órgano, incluso llegar a necrosis cortical con la pérdida definitiva de éste.

En este contexto, identificar qué pacientes presentan más factores de riesgo de desarrollar un FRA a fin de aumentar y mejorar los cuidados perioperatorios, es lo único que se ha mostrado levemente eficaz para reducir la incidencia y la morbilidad relacionada con la FRI en el trasplante renal (Liaño y Pascual, 1996).

El desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que sean capaces de prevenir y/o mejorar la recuperación del FRA constituye, en la actualidad, una necesidad primordial. Para ello, se hace indispensable un mayor conocimiento de los factores protectores y promotores de daño renal secundario al síndrome de I/R.

2. SINDROME DE ISQUEMIA-REPERFUSION (I/R)

Se define como el proceso que sufre un órgano sometido temporalmente a la falta de flujo sanguíneo y que posteriormente es reperfundido con sangre oxigenada.

Puede dividirse en tres fases o tiempos bien definidos:

- a. Isquemia caliente:** tiempo transcurrido desde la asistolia o clampaje de la aorta y la colocación del tejido en la solución fría de transporte.
- b. Isquemia fría:** Intervalo transcurrido, en horas, entre la perfusión del órgano, con la solución de preservación fría a 4° C, y el desclampaje arterial en el receptor (paso de la sangre del receptor por el órgano del donante, tras finalizar la anastomosis venosa y arterial).
- c. Reperusión:** es la restauración del suministro sanguíneo al tejido isquémico.

El resultado de este proceso es una agresión tisular secundaria a la anoxia, a la privación de metabolitos y al acúmulo de sustancias de deshecho del metabolismo, que conduce a la muerte celular.

En los donantes a corazón parado (donantes en asistolia) la lesión por I/R es más importante, dado que se añade un tiempo de isquemia caliente, más o menos prolongado, a la habitual isquemia fría, de manera que existe un mayor riesgo para la viabilidad del injerto a corto y largo plazo.

La isquemia produce “per se” daño celular y se continúa con un posterior deterioro debido a la reperusión. Por tanto, la entrada de sangre oxigenada puede ser más perjudicial para el órgano que la falta de la misma.

2.1. FASE DE ISQUEMIA

2.1.1. Generalidades

La privación de O₂ y nutrientes *in vivo* produce a nivel celular una serie de alteraciones en el metabolismo y la estructura celulares.

Varios mecanismos han sido propuestos para explicar el daño tisular que ocurre en el tejido renal post-isquémico.

El primer mecanismo, el de la depleción de adenosintrifosfato (ATP), propone que la isquemia conduce a una rápida depleción de ATP celular, con la consecuente pérdida de los sistemas de transporte activo de ATP y, subsecuentemente, fallo en el mantenimiento de los gradientes iónicos, llevando a un daño celular irreversible.

Un segundo mecanismo que ha sido propuesto para explicar el daño tras la I/R, es la afluencia primaria de calcio (Ca^{2+}) dentro de la célula durante la reperfusión (Fig. 1). Todo ello, a su vez, conlleva alteraciones en el citoesqueleto y modificaciones en proteínas de uniones intercelulares y a la membrana basal, entre otras (Ratych y Bulkley, 1986; Devarajan, 2005).

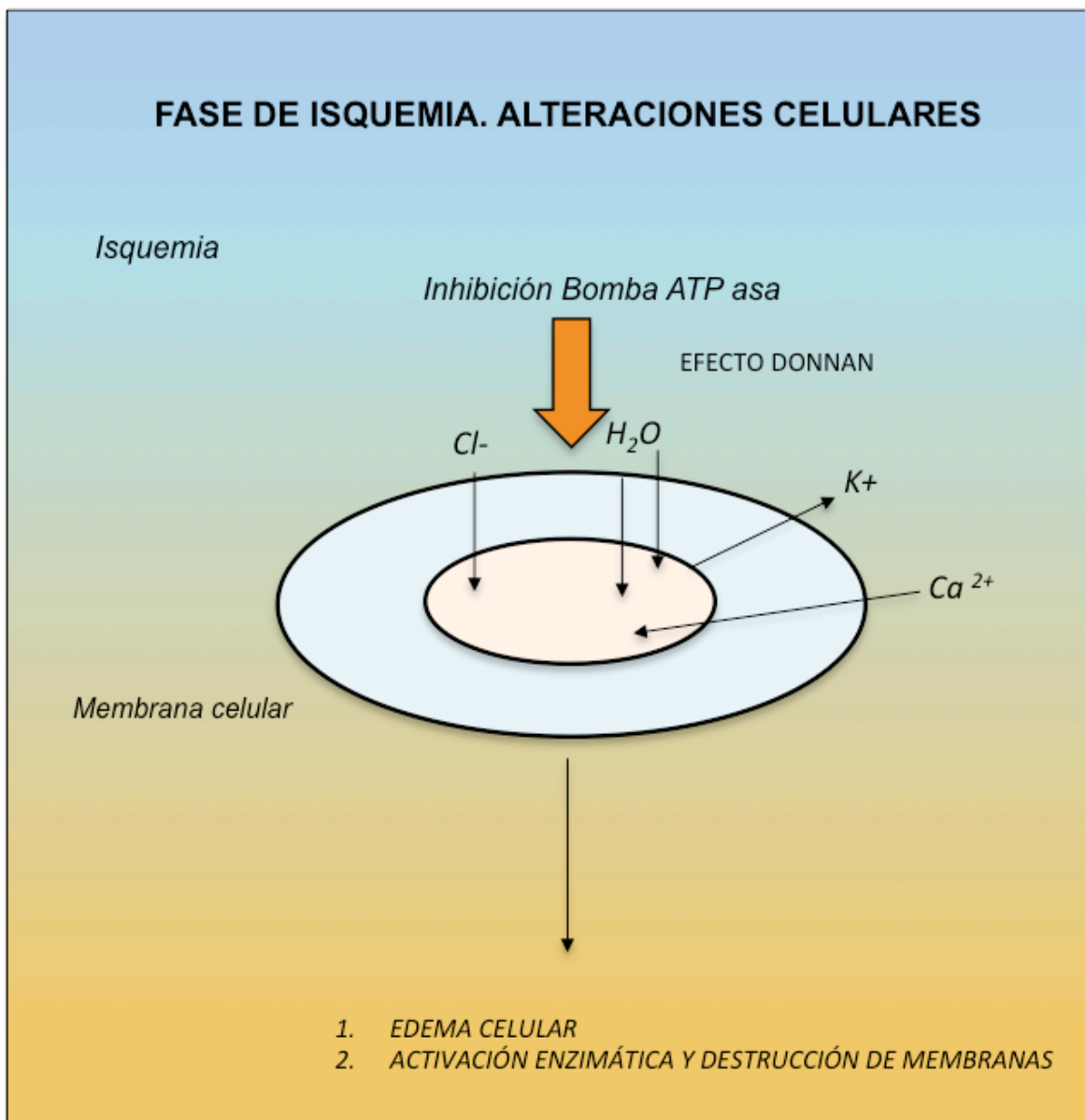


Figura 1. Alteraciones celulares en la isquemia.

2.1.2. Niveles de Adenosintrifosfato (ATP)

EL ATP es generado en las mitocondrias por fosforilación oxidativa, y libera la energía hidrolizándose a adenosindifosfato (ADP) cuando es necesario. En situaciones de privación de O₂, se produce la *inhibición de la fosforilación oxidativa* a nivel mitocondrial, con escasa formación de ATP, quedando

paralizadas todas las funciones celulares que requieran energía, y se estimula la *glicólisis anaerobia* formándose ácido láctico e hidrogeniones, dando lugar a la *acidosis intracelular*. Esto provoca la activación de los enzimas de los lisosomas conduciendo a la autólisis y muerte celular.

En 1981 Granger y cols. propusieron, por primera vez, un mecanismo molecular para explicar la producción de lesiones en el síndrome de I/R (Molitoris, 2004). Durante el periodo de isquemia se produce consumo de ATP por parte de las células para mantener la homeostasis (Fig. 2). El ATP es catabolizado a ADP y a adenosinmonofosfato (AMP). El AMP, a su vez, se cataboliza a hipoxantina, con el consiguiente acúmulo de esta última. La carga energética de las células cae y éstas no son capaces de mantener el gradiente iónico entre sus membranas, redistribuyéndose el Ca^{2+} hacia el interior de la célula y aumentando la concentración del mismo en el espacio intracelular. Los acúmulos de enzima xantina-oxidasa y de sus sustratos: hipoxantina y xantina, durante el periodo de isquemia, parecen ser los acontecimientos necesarios para producir la lesión en las células durante la posterior re-oxigenación, puesto que llegará el O_2 necesario para la enzima con la consecuente producción de radicales libres del oxígeno (RLO).

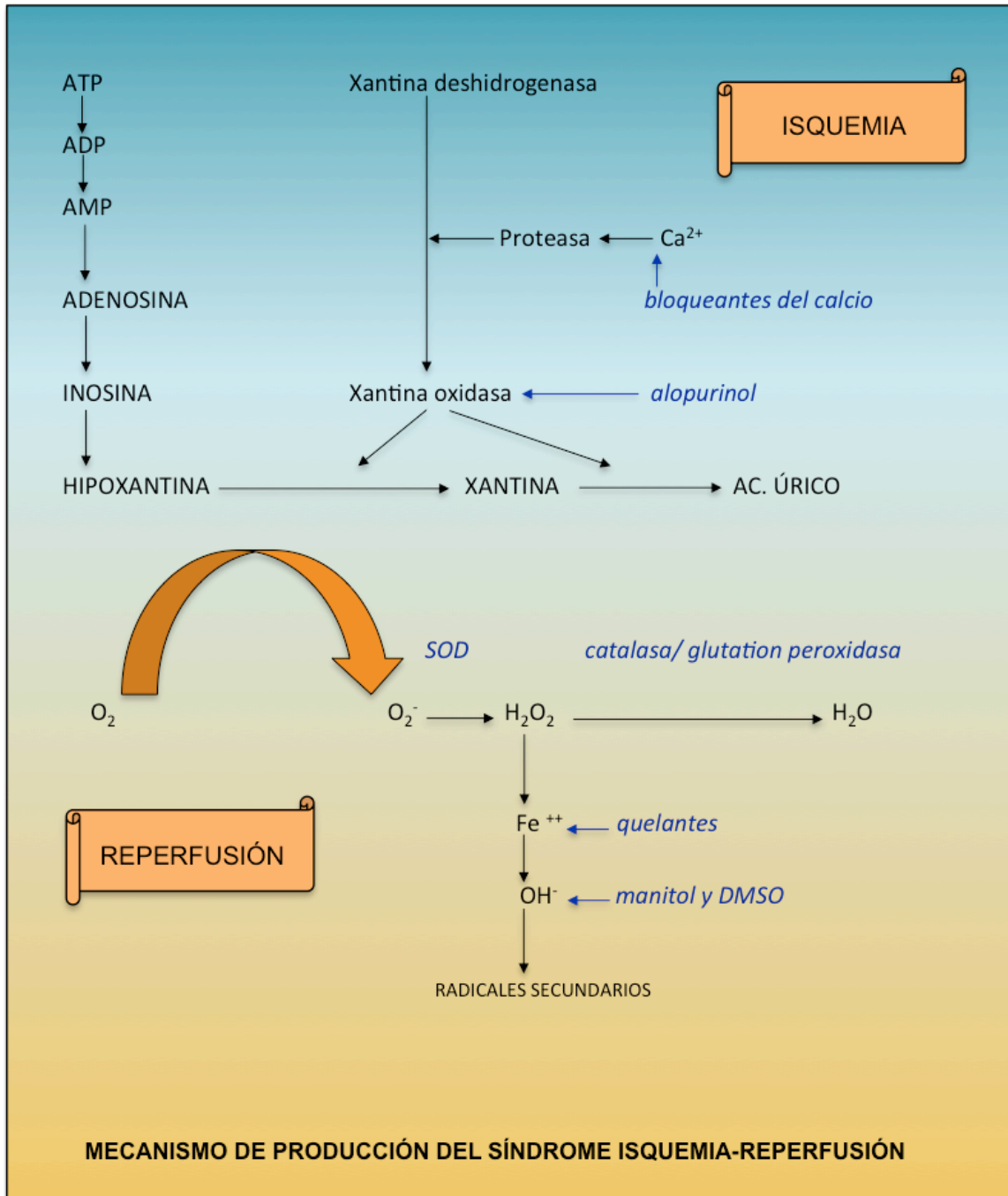


Figura 2. Síndrome de isquemia/reperfusión. Los nucleótidos de alta energía se hidrolizan progresivamente durante el periodo de isquemia, con la consecuente acumulación de hipoxantina. Además, existe una rápida conversión de xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa. En consecuencia, tanto ésta como la hipoxantina están presentes en exceso. Durante la reperfusión se produce la entrada masiva de O_2 , a partir del cual se producen los RLO, que son los que provocan la lesión del tejido. Se muestran asimismo (en azul y cursiva) las sustancias capaces de proteger frente a esta lesión (Modificado de Granger, Rutili y McCord).

2.1.3. Calcio intracelular

El Ca^{2+} citoplasmático es un importante segundo mensajero, capaz de activar muchas rutas de señalización intracelular, como las mediadas por la proteína quinasa C.

La privación de O_2 produce un aumento del Ca^{2+} citosólico por movilización hacia el citoplasma del contenido en el retículoendoplásmico e incluso por captación de Ca^{2+} extracelular. La elevación en la concentración de Ca^{2+} intracitoplasmático se ha identificado como marcador de daño en la mayoría de las respuestas celulares a injurias agudas, como por ejemplo la isquemia y/o la hipoxia. Así, el aumento de Ca^{2+} intracitoplasmático es una situación mediadora de muchas patologías de etiología isquémica (Vanderklish y Bahr, 2000).

En el caso de patologías de origen hipóxico, y más concretamente en la NTA de etiología isquémica, el aumento de Ca^{2+} intracitoplasmático induce fosforilación de fosfolipasa A2, a través de sus formas calcio-dependientes (Kribben y cols., 1994). Estas fosfolipasas activadas alteran la permeabilidad y actividad de las membranas e incrementan los niveles de ácidos grasos libres que actúan como detergentes de la membrana.

Durante la isquemia y los primeros momentos de reperfusión se produce una situación de acidosis merced al acúmulo de protones de hidrógeno (H^+). El aumento de estos H^+ intracelularmente estimula el intercambiador Na^+/H^+ que elimina H^+ de la célula introduciendo sodio (Na^+). Esto implica un aumento de la concentración intracelular de Na^+ que la célula intenta balancear mediante la activación del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, que se localiza tanto en la membrana citoplasmática como en la membrana mitocondrial, y que retira el Na^+ a cambio de

internalizar Ca^{2+} , resultando finalmente en una elevación de la concentración de Ca^{2+} intracitoplasmático. Varios estudios han demostrado una progresiva acumulación mitocondrial de Ca^{2+} , con una disfunción respiratoria celular asociada, durante la reperfusión tras 45 min de isquemia (Arnold y cols., 1985). La entrada de Ca^{2+} a la célula se ha asociado con una activación de las ATP-etasas estimuladas por Ca^{2+} , lo cual deprime aún más los depósitos de por sí ya reducidos de ATP.

Dos estudios indican el efecto protector de los bloqueantes de los canales de Ca^{2+} en la isquemia renal. Hertle y Garthoff (1985) estudiaron el efecto del nisoldipino (un bloqueante de los canales de Ca^{2+}) en riñones de ratas tras 60 min de isquemia normotérmica. La administración de este fármaco durante el periodo de isquemia mejoró la función renal inmediata y a largo plazo de estos animales, e incrementó su supervivencia en un 40%. Sin embargo, la administración post-isquemia de la droga fue inefectiva. De igual modo, Shapiro y cols., en 1985, fueron capaces de demostrar que el verapamilo, otro bloqueante cálcico, fue efectivo para mejorar el aclaramiento de inulina y la absorción renal de sodio cuando era administrado previo al periodo de isquemia. Al igual que en el estudio con nisoldipino, el efecto protector de estos agentes se ha visto durante el periodo de isquemia y no durante el periodo de reperfusión.

2.2. FASE DE REPERFUSIÓN

¿Realmente la reperfusión exagera el daño tisular más allá del que estaba destinado a suceder tras la agresión isquémica o simplemente actúa por diferentes vías bioquímicas y patológicas?. En otras palabras, ¿es potencialmente

salvable la destrucción tisular debida a la reperfusión o ésta simplemente acelera el destino de células que ya estaban condenadas?.

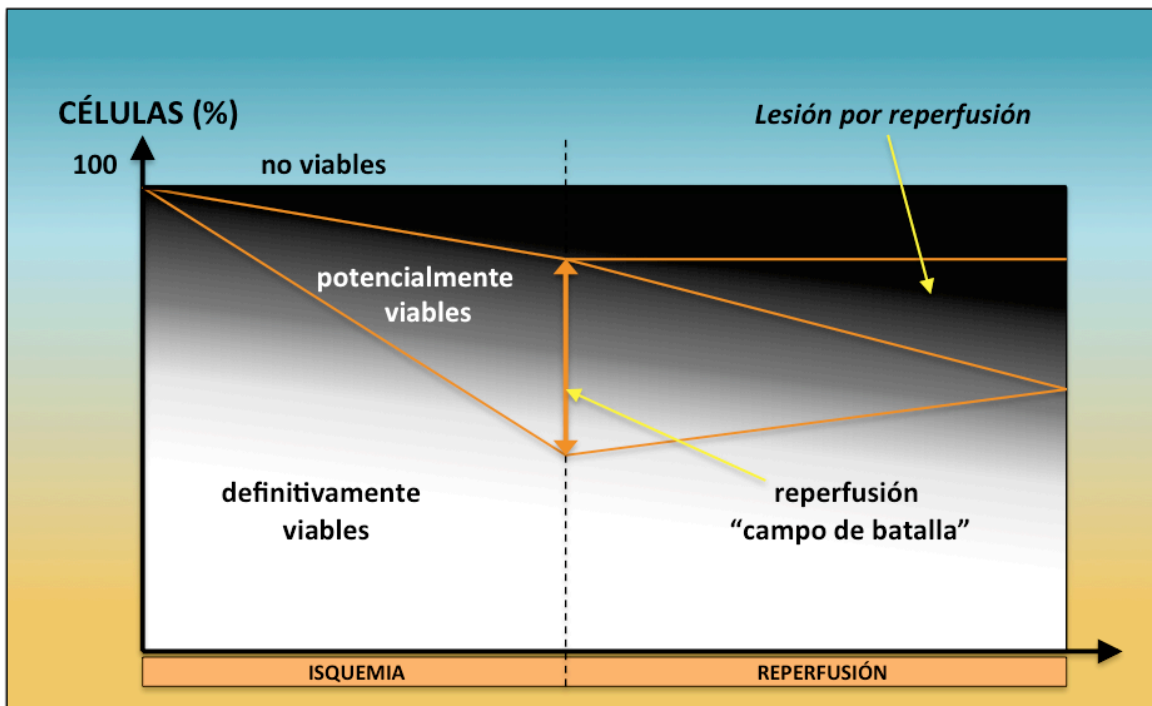


Figura 3. Lesión por reperfusión. Durante el periodo de isquemia algunas células sufrirán cambios bioquímicos y patológicos asociados con la anoxia pero permanecen potencialmente viables. Otras serán no viables, estando irreversiblemente dañadas por la isquemia y finalmente se necrosarán. Durante la reperfusión, las células potencialmente viables pueden revertir los cambios de la isquemia y recuperar su función normal o continuar hacia la necrosis. Estas células potencialmente viables constituyen el “campo de batalla” en el periodo de reperfusión. En una reperfusión óptima todas estas células serían salvadas. Esta situación ideal no se alcanza fácilmente y muchas células serán perdidas (lesión de la reperfusión). En la clínica es difícil demostrar si alguna de las células que finalmente se necrosaron eran realmente “potencialmente viables”. Este concepto sólo puede ser establecido si una intervención puede, sin lugar a dudas, demostrar que mejora los resultados tras la reperfusión (Modificado de Maxwell y Lip).

Durante el periodo de isquemia una gran fracción de células sufrirá cambios bioquímicos y patológicos asociados con la anoxia, pero permanecerán “potencialmente viables”. Una pequeña fracción estará “irreversiblemente dañada” y al final de la isquemia se necrosará. Al momento de la reperfusión y de la readmisión de O_2 el grupo de células “potencialmente viables” puede revertir los cambios de la isquemia y recuperar su función normal, o avanzar más tarde hacia la necrosis. Estas células “potencialmente viables” son, por lo tanto, el “campo de

batalla” en el periodo de reperfusión (Fig. 3). Después de la reperfusión es difícil saber si las células dañadas eran realmente parte del grupo de células potencialmente viables (Maxwell y Lip, 1997).

2.2.1. Reentrada masiva de oxígeno al tejido

Cuando el flujo sanguíneo se reinstaura, se produce una reentrada masiva de O_2 a las células. El exceso de Ca^{2+} intracitoplasmático activa la enzima proteasa que cataliza el paso de Xantina-D (deshidrogenasa) a Xantina-O (oxidasa) en presencia de NADPH -Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido- (Nauta y cols., 1991; Mc Cord, 1983; Granger, 1988). Batelli y cols. ya en 1972 demostraron que la tasa de conversión es órgano-dependiente, ocurriendo en 1 min en el intestino de la rata isquémica y en 30 min en el riñón isquémico del animal. La Xantina-O es la mayor fuente biológica de producción de superóxidos en tejidos postisquémicos (Parks y Granger, 1983), siendo la primera fuente documentada de producción de dicho radical. En tejidos no isquémicos, la Xantina-D es la mayor enzima responsable de la degradación de la purina. La Xantina-D no puede transferir electrones al O_2 molecular para formar peróxido de hidrógeno o superóxido (O_2^-), pero puede reducir el NAD^+ (Nicotinamida adenina dinucleótido).



En condiciones de baja concentración de O_2 , como ocurre en la fase de isquemia, se transforma la Xantino-D en Xantino-O, esta última utiliza el O_2 molecular en lugar del NAD^+ produciendo superóxido y peróxido de hidrógeno (H_2O_2):



De esta forma se han sintetizado los *radicales libres del oxígeno*.

3. RADICALES LIBRES DEL OXIGENO (RLO)

Una molécula normal consiste en un par de electrones opuestos en giro (spin) y circulando en una misma órbita.

El radical libre (RL) contiene un número impar de electrones. Si dos RL reaccionan entre sí ambos son eliminados, pero si reacciona con una molécula normal se produce un nuevo radical.

Los RLO son metabolitos tóxicos que presentan estados intermedios de reducción electroquímica del O_2 al agua (Mc Cord, 1985; Bulkley, 1983). Por ello, participan en múltiples reacciones ya que pueden servir como oxidantes y como reductores.

SUPERÓXIDO	$\text{O}_2 + \text{e}^-$	O_2^-
PERÓXIDO DE HIDRÓGENO	$\text{O}_2^- + \text{O}_2^-$	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
RADICAL HIDRÓXILO	H_2O	$\text{H}^+ + \text{OH}^\bullet$
OXÍGENO SINGLETE	$\text{O}_2^+ + \text{H}_2\text{O}_2$	$^1\text{O}_2 + \text{OH}^+ + \text{OH}$

Figura 4. Radicales libres de oxígeno

Los RLO se producen durante la fase de reperfusión, por lo que la entrada de O_2 en el tejido es más nociva que la producida por la propia isquemia (Haglund y Lundgren, 1978).

El organismo normalmente elimina el 95% del O_2 transformándolo en agua, en una reacción catalizada por la citocromo oxidasa mitocondrial. No obstante, un 5% del O_2 se elimina a través de la denominada reducción univalente del O_2 , es decir, el O_2 pierde un electrón cada vez dando lugar a los denominados RLO.

Durante la hipoxia, por la falta de O_2 , un gran número de enzimas mitocondriales, como la citocromo oxidasa y la manganeso superóxidodismutasa (SOD), entre otras, disminuyen su actividad. Estas enzimas son captadoras de aniones por lo que su descenso provoca el aumento intracelular en RLO. El exceso de RLO provoca daño celular por incrementar la peroxidación de lípidos, entre otros mecanismos. Una fuente adicional de RLO dentro de la célula, procede de la actividad de enzimas como la Xantina-O, la ferrihemoglobina y la nicotinamidaadeninucleótido fosfato oxidasa (NADP). Estas enzimas aumentan su actividad oxidasa durante la I/R actuando como donadoras de electrones y principales fuentes de producción intracelular de RLO, fundamentalmente O_2^- y H_2O_2 .

3.1. EVIDENCIA DE DAÑO RENAL POR RADICALES LIBRES

Paller y cols. (1984) demostraron un incremento de malondialdehído(MDA), producto de la peroxidación lipídica, en todo el riñón de la rata, tras 60 min de isquemia y 15 min de reperfusión. Paller y Hebbel (1986) también proporcionaron evidencias, in vivo, de peroxidación lipídica mediante el dosaje de la producción de etano tras isquemia renal transitoria. Este ensayo se basa en el hecho de que la peroxidación del ácido linoleico por los RLO genera etano, el cual es excretado por los pulmones. Los niveles de etano duplicaron la producción basal tras 60 min

de isquemia y 10 min de reperfusión, pero a partir de los 60 min de reperfusión la excreción de etano comenzó a descender. Paller fue capaz de demostrar, en un modelo vivo animal, que la peroxidación lipídica, una medida indirecta de la actividad de los RLO, se inicia a los pocos minutos de la reperfusión y acaba antes de una hora.

En un modelo experimental de trasplante renal en conejos, Green y cols. (1986) investigaron si existía evidencia de producción de RLO durante la isquemia fría y la reperfusión. Utilizaron como líquidos de preservación solución salina isotónica o citrato hipertónico frío y conservaron los órganos a 0° durante 24 a 48 h antes de autotrasplantarlos a los animales. El periodo de reperfusión fue de 60 min. Realizaron ensayos para valorar peroxidación lipídica a través de la medición de las bases de Schiff. Demostraron que no había evidencias de peroxidación lipídica tras 24-48 h de preservación en frío en citrato hipertónico. Sin embargo, después de la reperfusión se producía un incremento significativo de la peroxidación lipídica. Esto sugiere, nuevamente, el daño renal mediado por RLO tras la I/R, incluso después de la preservación por isquemia fría. Hay que destacar la importancia del medio de preservación, ya que la conservación en suero salino asocia un aumento de la peroxidación lipídica previo a la reperfusión. El hecho de que la peroxidación lipídica también ocurra durante el periodo de isquemia sugiere que otros sistemas generadores de RLO se han activado en el riñón incluso durante el almacenaje en frío.

Desde el punto de vista químico, el anión O_2^- es un buen agente reductor pero tan solo un moderado agente oxidante. Desde el punto de vista biológico, existen numerosas evidencias de la citotoxicidad del O_2^- en múltiples

circunstancias. Puede suceder que a una sustancia con moderada reactividad desde el punto de vista químico se le atribuya una considerable toxicidad biológica.

Existen numerosos ejemplos de compuestos de baja reactividad química (cloruro potásico, cianuro sódico o la toxina del veneno de cobra) que producen reacciones letales cuando son inyectados en un animal. Por tanto, la citotoxicidad no siempre es sinónimo de reactividad orgánica (Mc Cord, 1983).

La toxicidad del O_2^- es el resultado del ataque directo o indirecto a nivel molecular por parte del mismo, o bien, por radicales generados secundariamente (Fig. 5)

Asimismo el H_2O_2 , generado en la pared vascular, está implicado en la patogénesis de varias enfermedades vasculares a través de un potente efecto vasoconstrictor renal como ha demostrado el estudio de nuestro grupo (Moreno y cols., 2010).

3.1.1. Toxicidad directa

La toxicidad directa puede producirse a través de diferentes mecanismos:

- Mediante modificaciones de los ácidos nucleicos y rupturas del ADN (Brawn y Fridovich, 1980; Fenn y cols., 1957).
- Mediante despolimerización de mucopolisacáridos y del ácido hialurónico, así como degradación del colágeno (Matsumura y cols., 1966).
- Mediante inactivaciones enzimáticas (Allen y cols., 1973), en particular por oxidación de grupos sulfhidrilo, lo cual puede alterar la integridad de las membranas.

3.1.2. Toxicidad indirecta

Se manifiesta mediante el proceso de lipo-peroxidación, que constituye la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados contenidos en los fosfolípidos de las membranas celulares. De ello resulta una reacción en cadena con formación de radicales libres intermedios que son altamente reactivos y, por tanto, extremadamente tóxicos (Chen, 1979; Peters y Foote, 1976). Esta reacción en cadena finaliza con la formación de aldehídos o por la unión de dos radicales lipídicos, o bien, por la formación de un compuesto cíclico. Los productos más conocidos son los eicosanoides, ácidos grasos de 20 átomos de carbono, que pueden ser de dos tipos: prostanooides (prostaglandinas, tromboxano, prostaciclina) y leucotrienos, que derivan del ácido araquidónico por las vías de la ciclooxigenasa o de la lipooxigenasa. El ácido araquidónico se sintetiza gracias a la acción de la fosfolipasa A2 sobre los fosfolípidos de la membrana celular (Hayaishi y Shimizu, 1982; Petrone y cols., 1980). La riqueza en ácidos grasos insaturados de las membranas celulares e intracelulares sugiere la gravedad de las lesiones de membrana que pueden llevar a la apoptosis (Dormandy, 1983).

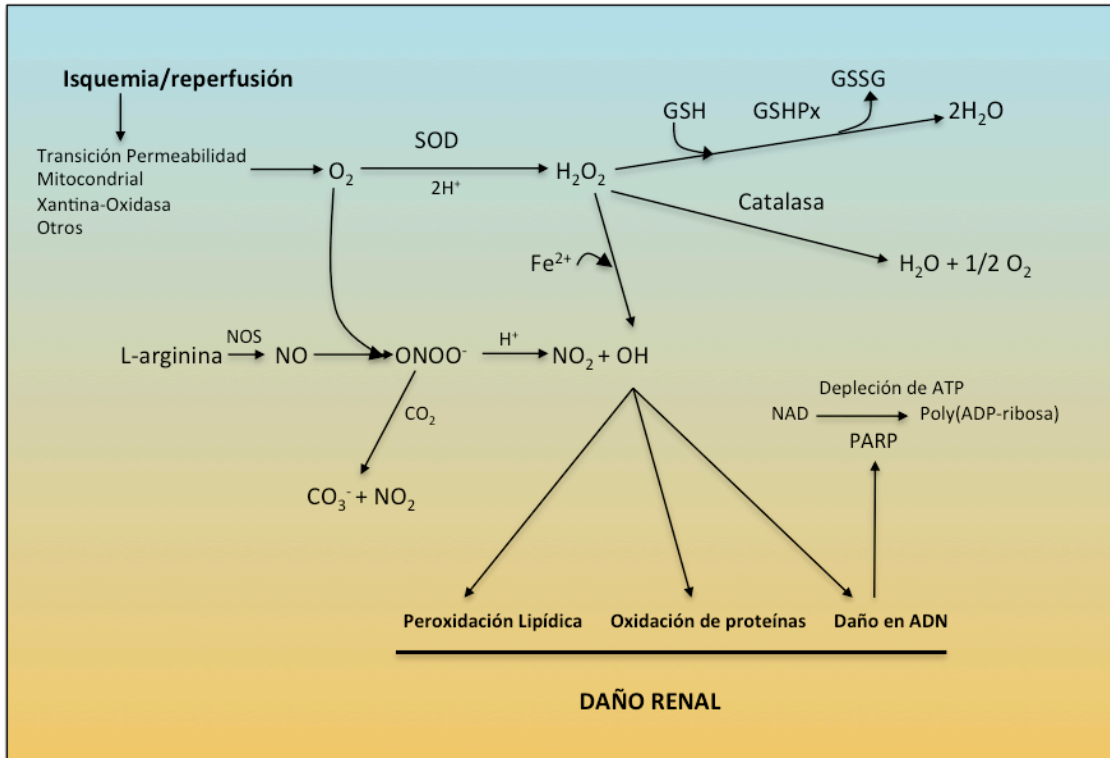


Figura 5. Esquema de generación de RLO y mecanismos de daño molecular.

4. FISIOPATOLOGÍA DE LA ISQUEMIA REPERFUSIÓN RENAL

4.1 Cambios funcionales en el riñón

Los principales eventos que suceden tras la reperfusión de un riñón isquémico son: una reducción de la tasa de filtrado glomerular (TFG) y una disminución del flujo sanguíneo medular. La reducción de la TFG (a menos del 95% de la normalidad) es significativamente mayor que la reducción del flujo plasmático renal (a menos del 40 a 50% de lo normal). Esto implica que los dos procesos ocurren de forma independiente. El descenso de la TFG puede atribuirse a una disminución de la presión de gradiente hidráulico transglomerular como consecuencia de la obstrucción tubular postglomerular y/o de reabsorción

tubular. El descenso del flujo plasmático medular, por otra parte, se ha atribuido a la congestión y atrapamiento de eritrocitos en los capilares de la medula externa.

4.2 Cambios morfológicos en el riñón

El examen de riñones sometidos a 45-60 min de isquemia caliente, seguido de reperfusión, revela una zona hiperémica en el límite interior de la médula externa y una zona pálida en el límite exterior de la misma.

Las microscopías óptica y electrónica han demostrado que la zona pálida es debida a una extensa necrosis del tercer segmento del túbulo proximal, que es la porción recta del mismo (también llamado segmento S3). Dentro de esta zona hay edema intersticial intenso, dilatación y aplastamiento tubular con pérdida del borde en cepillo. Además, los túbulos renales aparecen cargados de cuerpos citoplasmáticos de varios tamaños. La luz de los túbulos contiene restos del borde en cepillo y cilindros (Schrier y cols., 2004; Fig. 6).

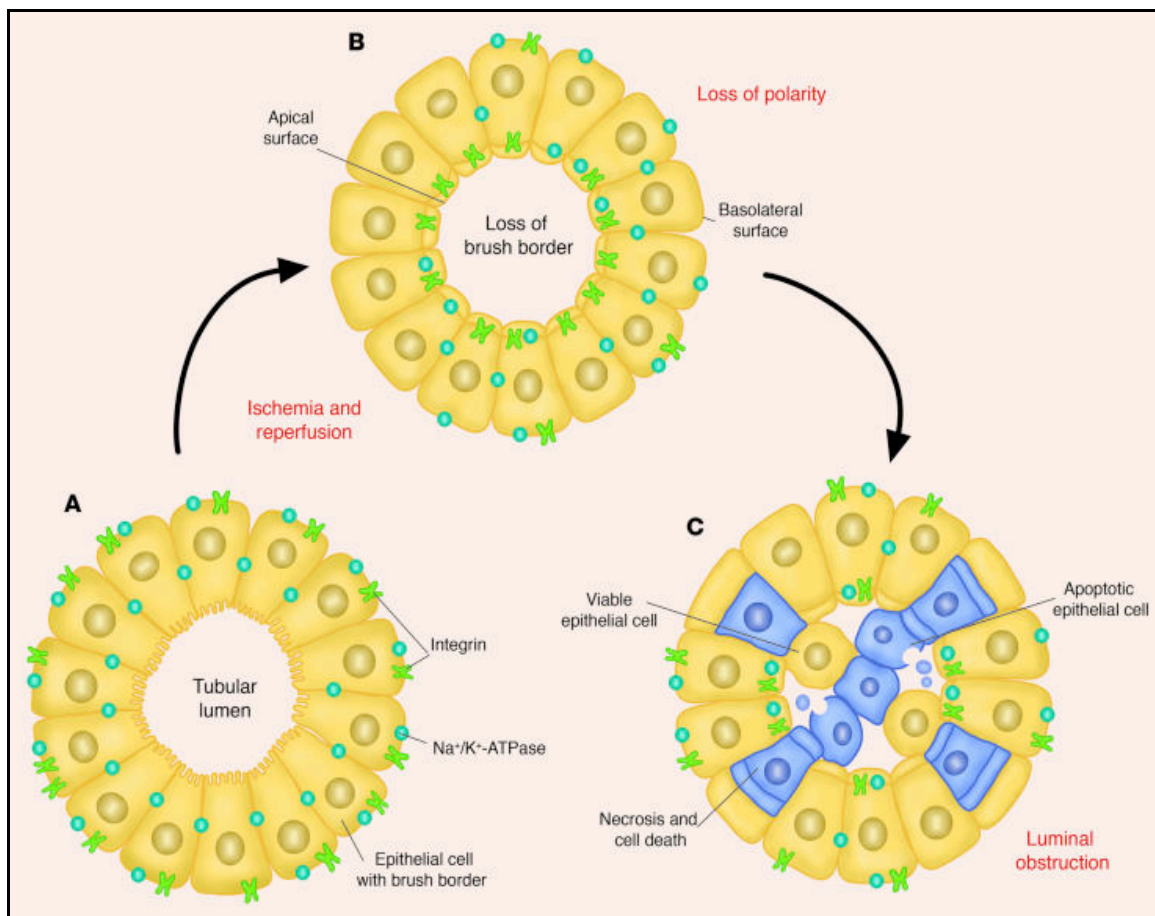


Figura 6. Cambios tubulares en la fisiopatología de la NTA isquémica. Tras la isquemia y reperfusion, ocurren cambios morfológicos en los túbulos proximales, incluyendo pérdida de la polaridad, pérdida de bordes en cepillo, y redistribución de integrinas y de la ATPasa de la superficie apical. El Ca²⁺ y los RLO también pueden tener un papel importante en estos cambios morfológicos, además de la subsiguiente muerte celular consecuencia de la necrosis y apoptosis. Tanto las células viables como las no viables se desprenden hacia la luz tubular, provocando la formación de cilindros y obstrucción luminal, contribuyendo a la reducción de la TFG (Schrier y cols., 2004).

La obstrucción luminal puede explicar en parte la reducción de la TFG que ocurre tras la isquemia. Haciendo una descripción más detallada de la distribución específica del daño en el segmento S3, se ha observado que la necrosis en esta región ocurre en grupos de túbulos localizados en la porción central baja de la médula y en el borde de los límites interno y externo de la médula externa. Cuando la lesión es más extensa, sólo los túbulos adyacentes a la vasa recta

(vasos sanguíneos que atraviesan la médula externa), fuente de reoxigenación en la reperfusión, se salvan del daño (Fig.7).

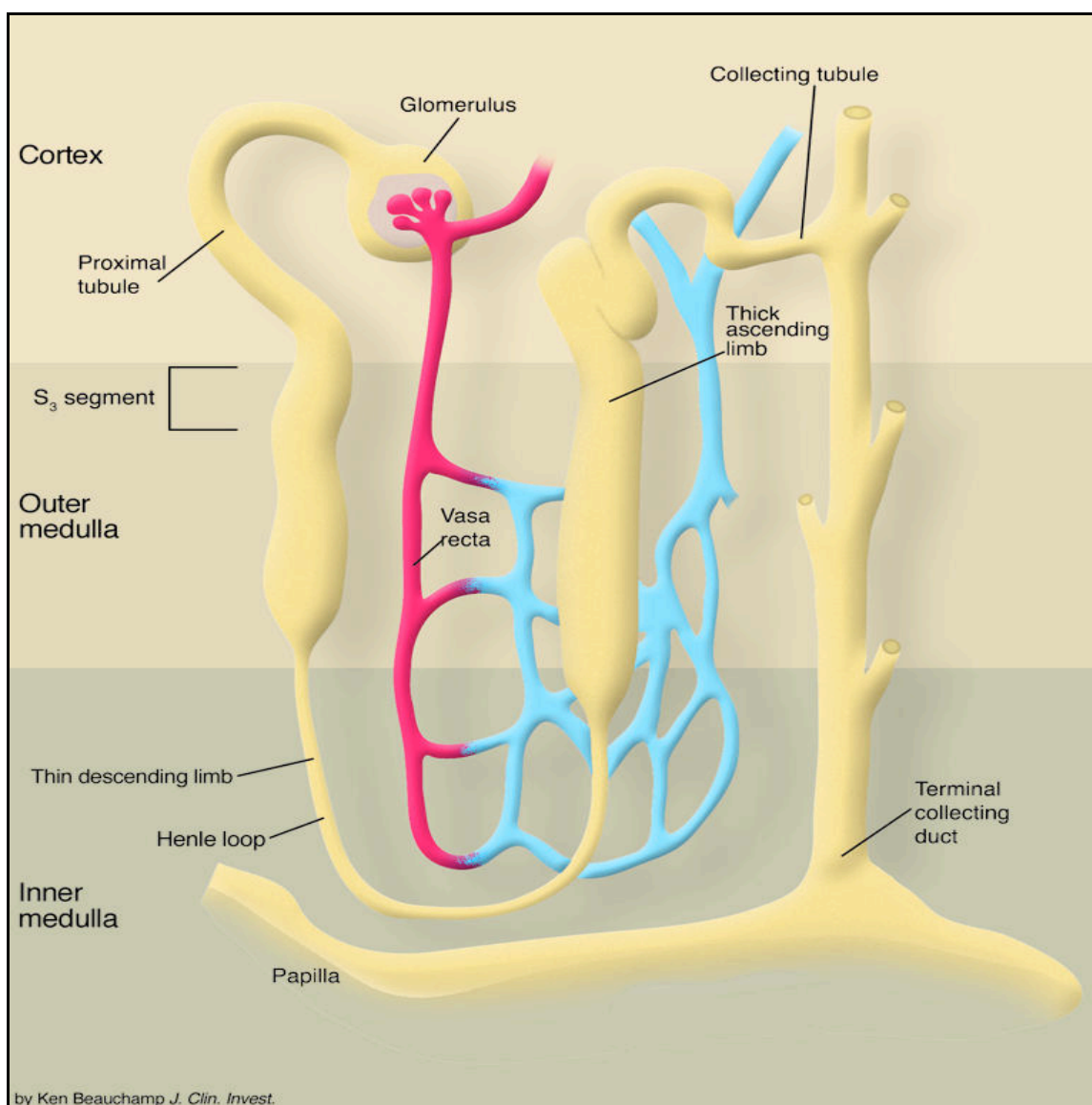


Figura 7. Mecanismo de daño en el segmento S3. La hipoxia relativa en la médula externa predispone al daño isquémico en el segmento S3 del túbulo proximal. La rama ascendente del asa de Henle, que se localiza en esta región hipóxica del riñón, y, dependiendo la demanda de reabsorción tubular, también puede sufrir daño isquémico. Sin embargo, estaría más protegida contra la isquemia dado que posee una maquinaria para la síntesis de ATP mayor que la del segmento S3 (Scribe y cols.).

La hiperemia medular sería el resultado del impacto de los glóbulos rojos en los capilares medulares. El hecho de que esta acumulación de eritrocitos no es secundaria a trombosis de los capilares medulares, se deduce puesto que no

se ha podido demostrar la presencia de plaquetas o fibrina y que la heparinización previa a la isquemia no previene estos depósitos.

Un rasgo importante de la patología anteriormente descrita es que los cambios morfológicos varían entre diferentes animales sometidos a periodos similares de isquemia. La necrosis vista en el segmento S3 es a menudo desigual y la hiperemia en la médula externa puede variar desde leve a severa, a pesar de condiciones experimentales aparentemente idénticas. Sin embargo, existe una correlación estructural y funcional, en tanto que los tejidos que evidencian daños morfológicos severos también muestran disturbios funcionales severos.

Queda claro de lo antes dicho, que la lesión postisquémica del riñón no resulta en un daño difuso de todo el parénquima. Las áreas de riesgo dentro del riñón son: el segmento S3 del túbulo proximal y los capilares cercanos al límite interno de la médula externa. Las consecuencias funcionales de estos cambios son: una dramática disminución de la TFG y una moderada reducción del flujo sanguíneo medular.

5. SISTEMAS ANTIOXIDANTES

5.1. ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

5.1.1. *Enzima superóxidodismutasa (SOD)*

El anión O_2^- es rápidamente transformado en **peróxido de hidrógeno** (H_2O_2) mediante la **enzima superóxidodismutasa (SOD)**. Las SOD son la

primera línea de defensa contra el daño oxidativo. Forman una familia de metaloenzimas, en la que se describen tres isoformas:

a) Cobre-Zinc SOD (Cu-Zn SOD), presente en el citoplasma, dimérica y con un peso molecular de 30 kDa;

b) Manganeso-SOD (Mn SOD) presente en la mitocondria, producida en la matriz y en la cara interna de la membrana mitocondrial, tetramérica y con un peso molecular de 80kDa (Fridovich, 1995);

c) SOD Extracelular (ECSOD) que se encuentra en el intersticio, plasma, linfa y líquido sinovial, dimérica (Vaziri, 2003).

En la reacción, una molécula de O_2^- se oxida dando lugar a O_2 molecular, mientras que otra se reduce para dar lugar a H_2O_2 .



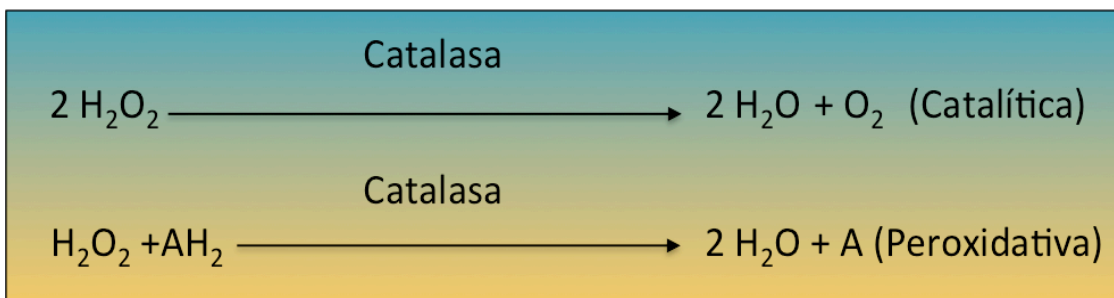
5.1.2. Peróxido de hidrogeno (H_2O_2)

Una vez formado el H_2O_2 , gracias a la SOD, esta molécula oxidante puede encaminarse hacia cuatro senderos: **a.** metabolizarse a O_2 y agua (H_2O) gracias a la actuación de la enzima catalasa; **b.** Vía glutatión; **c.** A través de la reacción de Fenton/Haber-Weiss, en presencia de hierro, da lugar a unamolécula de radical hidroxilo, y **d.** Entrar en el campo del sistema enzimático de la mieloperoxidasa leucocitaria.

5.1.2. a. Metabolización a O₂ y H₂O.

Esta reacción está catalizada por la enzima **catalasa**, hemo-enzima tetramérica que contiene 4 grupos ferroprotoporfirínicos por molécula, que realizan el intercambio redox (Matés y Sánchez-Jiménez, 1999). Se encuentra en los peroxisomas y está presente también en la mitocondria cardíaca (no ha sido encontrada en mitocondrias de otros tejidos, incluido músculo esquelético) (Turrens, 2003). Es la enzima más detoxificante para la eliminación de H₂O₂ cuando la concentración está aumentada. Debido a sus características enzimáticas, no se satura a ninguna concentración.

Interviene en dos tipos de reacciones: una *catalítica*, en la que una molécula de H₂O₂ se oxida a O₂, y la otra se reduce a dos moléculas de H₂O; y otra *peroxidativa*, en la que una molécula de H₂O₂ se convierte en H₂O valiéndose de un substrato no específico portador de H⁺ como reductor -metanol, etanol, fenol, ácido fórmico, etc.- (Matés y Sánchez-Jiménez, 1999).



5.1.2. b. Vía Glutación

La isquemia celular conduce a la depleción de glutación. El glutación es el mayor sulfhidrilo no proteico intracelular, es un tripéptido de ácido glutámico, cisteína y glicocola (Barja de Quiroga, 1997) que participa en variedad de

procesos metabólicos, de transporte y detoxificación (Fig. 8). Juega un importante rol en el mantenimiento de las proteínas y lípidos celulares en su estado funcional. Actúa primariamente para proteger estas importantes estructuras contra la amenaza de la oxidación, siempre presente en un ambiente anaeróbico. Sus acciones forman parte de la protección frente al daño oxidativo (mediante la capacidad reductora del grupo thiólico de la cisteína), regulación de la síntesis de proteínas y modificación de actividad enzimática.

Podemos encontrarlo en forma oxidada (GSSG) y reducida (GSH). Los equivalentes reducidos del glutati6n son transformados, a expensas de su propia oxidaci6n, a su forma conjugada GSSG. El glutati6n es luego regenerado por NADPH. Cuando se induce experimentalmente un d6ficit de glutati6n (por ejemplo, por un d6ficit proteico o con dietilmaleato) se exacerban los efectos t6xicos del estr6s oxidativo (Patterson y Rhoades, 1988).

Se describen cuatro isoenzimas de GPx que comparten como características comunes (Rotruck y cols., 1973):

- a. Actividad enzimática dependiente de selenio.
- b. Residuo de seleno-cisteína que se inserta durante la traslación proteica y que da lugar a la actividad enzimática.
- c. Reacción enzimática en la que el selenio (que compone la seleno-cisteína) reduce los peróxidos.
- d. Oxidación de selenio seguida de una reducción mediada por el glutatión.

Encontramos por tanto las siguientes **isoenzimas**:

I. **GPxcitosólica y mitocondrial (cGPx)**: parece encontrarse en todos los tejidos, pero predomina en eritrocitos, riñón e hígado. Reduce H_2O_2 y peróxidos orgánicos -derivados de ácidos grasos- (Matés y Sánchez-Jiménez, 1999).

II. **GPx fosfolipídica (PLGPx)**: capaz de reducir hidroperóxidos fosfolipídicos y se encuentra en la membrana y el citosol. Se expresa en mayor cantidad en células epiteliales renales y testes (Ursini y cols., 1985; 1999).

III. **GPx extracelular (eGPx)**: ha sido encontrada en plasma sanguíneo, leche materna y en lavado alveolar (Matés y Sánchez-Jiménez, 1999; Whittin y cols., 2002). Reduce hidroperóxidos orgánicos, hidroperóxidos fosfolipídicos y H_2O_2 .

IV. **GPx gastrointestinal (giGPx)**: se encuentra en células epiteliales del tracto gastrointestinal, con propiedades similares a cGPx (Chu y Esworthy, 1995).

La glutatión reductasa (GR) es una flavoenzima dependiente del NADPH que cataliza la reducción del GSSG a GSH, el cual será utilizado por la GPx para la reducción del H_2O_2 y de lipoperóxidos (LOOH-). Se encuentra en todos los

organismos aeróbicos así como en algunas plantas superiores por lo que aparenta ser una enzima cuasi universal.

La GR permite mantener concentraciones de GSH en la célula no sólo para ser utilizado por la GPx en la eliminación del H_2O_2 ; este GSH es de utilidad en la recuperación de las vitaminas C (ácido ascórbico) y E (alfa-tocoferol) luego de participar en la eliminación de radicales libres generados *in situ* o a distancia. El GSH interviene además en la detoxificación de compuestos xenobióticos, el almacenamiento y transporte de cisteína, la regulación del balance redox de la célula, el metabolismo de los leucotrienos y las prostaglandinas, la síntesis de los desoxirribonucleótidos, la función inmunológica y la proliferación celular.

Todos estos mecanismos de defensa intracelulares frente a la generación de RLO disminuyen en situaciones de isquemia-hipoxia (Li y Jackson, 2002).

Durante la isquemia, la acidosis resultante favorece la producción de anión O_2 -capaz de oxidar los ácidos grasos libres de la membrana celular. Para evitarlo, la célula pone en marcha enzimas como la SOD reduciendo éste a H_2O_2 . Seguidamente, mediante catalasas o por el sistema del glutatión todas estas especies acaban generando H_2O . La isquemia y la reperfusión alteran esta homeostasis: con la isquemia las defensas antioxidantes se ven dañadas, se acumula el H_2O_2 y se genera un exceso del radical hidroxilo que es altamente lesivo (Becker, 2004). Además, en situaciones de I/R, los citocromos mitocondriales se reducen y transfieren directamente electrones al oxígeno por medio de la reducción de ubiquinona a ubisemiquinona mediante la ubiquinol citocromo C reductasa (Logue y cols., 2005).

Los RLO tienen un papel importante regulando la producción de energía, la activación de quinasas implicadas en la supervivencia celular, la regulación de los canales iónicos, la señalización de la apoptosis, las respuestas inflamatorias o la regulación del tono vascular, entre otros (Becker, 2004).

5.1.2. c. Reacción de Fenton-Haber Weiss

En esta vía el hierro va a ser el catalizador del proceso seguido por el H_2O_2 .

Una molécula de hierro en forma férrica (Fe^{3+}) se reduce a forma ferrosa (Fe^{2+}) por mediación del O_2^- .



La forma ferrosa a su vez reduce al H_2O_2 dando lugar al radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), radical libre altamente reactivo.



Al mismo tiempo, H_2O_2 y anión O_2^- reaccionan, obteniendo como resultado también radical $\text{OH}\cdot$.



El hierro puede ser sustituido por el cobre cambiando entre valencias 2^+ y 1^+ .

5.1.2. d. Mieloperoxidasa leucocitaria

La enzima mieloperoxidasa (MPO) es una hemoproteína de unos 150 kDa, tetramérica, glicosilada. Está compuesta por dos protómeros, cada uno de los cuales posee una subunidad pesada protoporfirínica de 59-64 kDa, y otra ligera de 14 kDa (Nauseef y Malech, 1986). Está presente en neutrófilos y monocitos. Se almacena en gránulos azurófilos primarios de leucocitos y se secreta en espacio extracelular y en fagolisosomas tras la activación de los fagocitos (Klebanoff y Clark, 1978).

La activación fagocitaria y la secreción de MPO se acompaña de un aumento en la formación de anión O_2^- , a partir de la NADPH oxidasa, y del siguiente paso en la reducción univalente del oxígeno, el H_2O_2 . La MPO amplifica el potencial oxidante del H_2O_2 y lo utiliza como co-substrato en la formación de oxidantes a través de un ciclo peroxidasa (Babior, 1978).

La actividad de la MPO está regulada por:

- a) la tasa de producción de anión O_2^- .
- b) la disponibilidad de H_2O_2 y otros co-substratos (Klebanoff y Clark, 1978; Kettle y Winterbourn, 1997)
- c) la concentración de antioxidantes (Kettle y Winterbourn, 1997; Márquez y cols., 1990)
- d) la presencia de óxido nítrico (NO) (Abu-Soud y Hazen, 2000), participante en la cadena de procesos inflamatorios, en especial en la regulación de las propiedades pro-inflamatorias del endotelio y en estados precoces de la migración de la célula inflamatoria a los lugares de inflamación; y se entrelaza con el efecto oxidativo, siendo intermediario en el mismo como se verá posteriormente.

La MPO presenta gran cantidad de estados intermedios, influenciados por la disponibilidad para reducir anión O_2^- , H_2O_2 y NO (Abu-Soud y Hazen, 2000). Su estado basal es la forma férrica, y dependiendo del sustrato cambiará su estado iónico. El sustrato más importante es el Cloro, dando lugar a *ácido hipocloroso* ($HOCl$) (Foote y cols., 1983; Weiss y cols., 1982). Esta capacidad de producir oxidantes derivados del cloro es única de MPO en mamíferos.



La reactividad de oxidantes clorinados como el $HOCl$ provocan modificación en determinadas moléculas susceptibles, y así encontramos:

- a. cloración de aminas ($R-NH_2$) dando lugar a cloraminas (Thomas y cols., 1982)
- b. cloración de lípidos insaturados (Winterbourn y cols., 1992)
- c. oxidación de grupos thiol y ésteres de thiol (Kettle y Winterbourn, 1997)
- d. oxidación de grupos hemo y grupos hierro-sulfurados (Albrich y cols., 1981)
- e. la interacción con H_2O_2 da lugar a oxígeno singlete (Krinsky, 1974)
- f. la actuación sobre O_2^- desemboca en liberación de OH^- (Candeias y cols., 1993).

La MPO cataliza el paso de *tirosina* a especie reactiva (Tyr) que participará en

procesos de peroxidación lipídica y formación de productos derivados de la misma (ditirosina, tritirosina, etc.), así como la formación de clortirosina, que parece ser el marcador más estable de la acción mieloperoxidativa en relación con la aterosclerosis (Hazen y Heineke, 1997), ya que muchos de los productos

intermediarios clorados son muy lábiles (p.e.cloraminas), y otros se producen también en otras vías distintas a MPO (ditirosina, productos de peroxidación lipídica, etc.), lo que hace difícil el estudio de la acción mediada por MPO.

La tercera gran vía de la MPO en el proceso oxidativo es la generación de *especies reactivas de nitrógeno* (RNS) que es el paso previo a la producción de nitrotirosina, molécula que está presente en la íntima de la arteria aterosclerótica y recubre la fracción lipoproteica de baja densidad (LDL) en la placa de ateroma (Leeuwenburg y cols., 1997). Las RNS generadas por MPO son consecuencia de la acción directa de MPO sobre nitritos (molécula estable producto del metabolismo del óxido nítrico, NO_2^-), que los oxida dando lugar a una molécula reactiva (NO_2 , dióxido de nitrógeno) (Eiserich y cols., 1998; Hazen y cols., 1999; Van der Vliet y cols., 1997; Fig. 9).

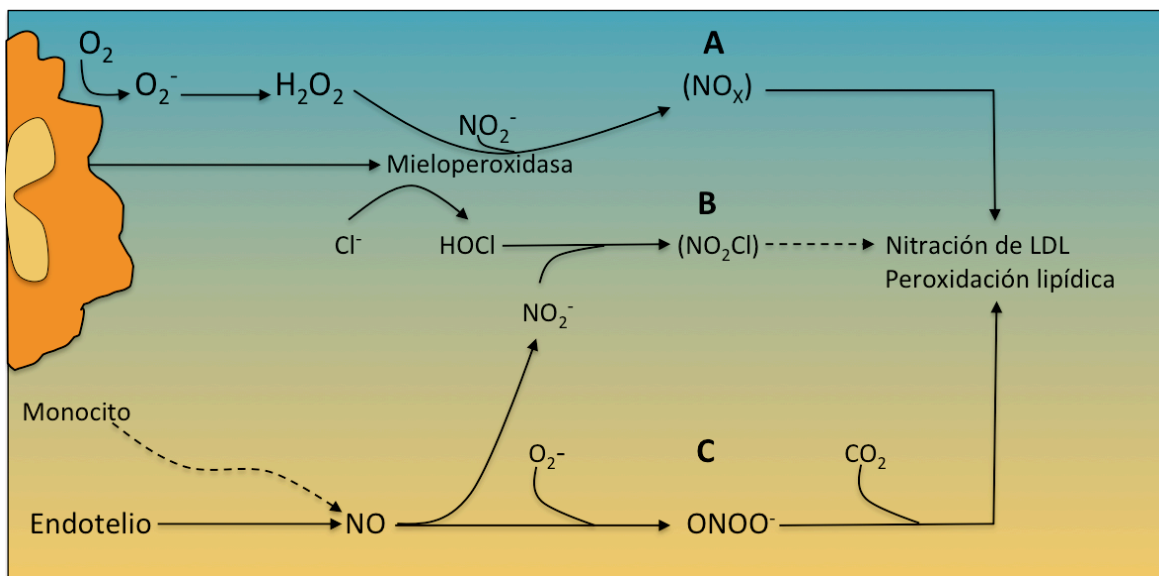


Figura 9. Potenciales vías disponibles de los monocitos para la generación de oxidantes derivados del $\bullet\text{NO}$ (Hazen y cols., 1999).

El otro mecanismo de oxidación de NO_2^- se produce por la acción del ácido hipocloroso (HOCl) generado por MPO (Eiserich y cols., 1996). La reacción de estas especies descritas y peroxinitritos, RNS formados por la reacción de NO y anión O_2^- , con la tirosina libre o constituyente de proteínas tiene como resultado nitrotirosina.

5.2. ANTIOXIDANTES NO ENZIMATICOS

Son moléculas no proteicas de pequeño peso y se dividen en: antioxidantes hidrosolubles y liposolubles.

5.2.1. Antioxidantes hidrosolubles

5.2.1. a. Flavonoides y polifenoles

Proceden de la dieta y tienen beneficios importantes sobre la función vascular (Duffy y cols., 2001), pero se absorben poco y son metabolizados rápidamente, presentando una modesta actividad antioxidante in vitro.

5.2.1. b. Vitamina C (ascorbato)

La mayor parte de los animales pueden sintetizar ascorbato a partir de la glucosa, pero algunos primates y el hombre perdieron la enzima para el último paso de la biosíntesis (L-gulonolactona oxidasa).

El ascorbato es cofactor para gran cantidad de enzimas participantes en reacciones de hidroxilación. Actúa como agente reductor capaz de aumentar la actividad enzimática con el mantenimiento del hierro en estado ferroso, sin embargo, esta acción que in vitro es pro-oxidante (Halliwell, 1996), in vivo, no se observa, ya que se demuestra cómo protege biomoléculas incluso después de la suplementación de hierro (Carr y Frei, 1999; Berger y cols., 1997). Es necesario para la biosíntesis de colágeno a través de la prolina y lisina hidroxilasas, en su

ausencia el colágeno formado está insuficientemente hidroxilado, dando lugar a vasos sanguíneos frágiles.

El ascorbato en plasma es considerado el antioxidante hidrosoluble más efectivo (Frei y cols., 1990). Su acción antioxidante se basa en la anulación de radicales libres a través de la donación de un electrón seguido de un protón, para dar lugar a un producto no radical reducido, y por otra parte radical ascorbil, que rápidamente se convierte en ascorbato y ácido dehidroascórbico. Ambos son reducidos vía glutatión para mantener la biodisponibilidad de la vitamina C (May, 1997; Mendiratta y cols., 1998), que a su vez mantiene la forma reducida protectora GSH (acción sinérgica) (Tamba y O'Neill, 1991). La vitamina C inhibe la peroxidación de LDL. Esto lo consigue gracias al bloqueo de H_2O_2 (Barclay y cols., 1989) y radicales proteicos (Deterding y cols., 1998) que inician la oxidación de LDL, así como co-actuando como antioxidante junto con el α -tocoferol de la LDL (Frei y cols., 1990). Presenta a su vez la capacidad de reducción de tocoferol (α -TO \cdot) a hidrotocoferol (α -TOH). El ascorbato también neutraliza en parte la oxidación producida por el ácido hipocloroso (HOCl) (Carr y cols., 2000), esta protección es menor incluso frente a peroxinitritos (ONOO $-$) (Kurz y cols., 2003).

Por otra parte esta vitamina aumenta la vida media y la concentración de la tetrahidrobiopterina, con la consiguiente estabilización de eNOS y la disminución en la síntesis de O_2^- (Huang y cols., 2000).

5.2.1. c. Ácido úrico

Es producido por la oxidación de hipoxantina y xantina catalizada por la Xantina-O y D. Se presenta como urato a pH fisiológico y puede bloquear directamente RLO, como el oxígeno singlete, $-OH$ y radicalesperoxil (Ames y

cols., 1991) así como CO_3^- y $-\text{NO}_2$ derivados de peroxinitritos (Squadrito y cols., 2000). Se une a metales de transición, hecho que influye en la peroxidación de LDL en la pared vascular.

La reacción de urato con oxidantes con un electrón negativo da lugar a radical urato que puede ser reducido por ascorbato.

5.2.1. d. Bilirrubina

La bilirrubina libre o unida a proteínas reduce $\alpha\text{-TO}\cdot$ e inhibe la peroxidación lipídica en LDL y en plasma (Neuzil y Stocker, 1994). Protege frente a la oxidación proteica (Neuzil y Stocker, 1993) y el daño oxidativo celular (Wu y cols., 1991; 1992).

5.2.2. Antioxidantes liposolubles

5.2.2. a. Vitamina E

Vitamina E y α -tocoferol ($\alpha\text{-TOH}$) son términos que se utilizan incorrectamente de formasimilar, ya que $\alpha\text{-TOH}$ es sólo una de las ocho formas de los tocoferoles. $\alpha\text{-TOH}$ se localiza en membranas y lipoproteínas y es el mayor antioxidante que contiene la LDL. Inactiva al radical peroxil ($\text{LOO}\cdot$) mediante una reacción que da lugar a productos no reactivos. Reacciona a su vez con oxígeno singlete, derivado de HOCl y peroxinitritos.

El $\alpha\text{-TO}\cdot$ es reducido por el ascorbato de forma rápida así como por otros agentes reductores como ubiquinoles (Mukai y cols., 1990), bilirrubina (Neuzil y Stocker, 1994), ácido cafeico, 2-hidroxiestradiol y epinefrina que permiten el paso a $\alpha\text{-TOH}$ (Witting y cols., 1996).

5.2.2. b. Coenzima Q10

Pertenece a la familia de las ubiquinonas. Se encuentra en todas las membranas celulares y en las lipoproteínas (Ernster y Dallner, 1995). Es un agente fundamental en la producción de ATP mitocondrial y en el mantenimiento del pH lisosomal (Crane, 2001). La forma reducida puede inhibir la oxidación lipídica y proteica en las membranas celulares (Forsmark-Andrée y cols., 1995).

6. MECANISMOS DE REPARACIÓN DE DAÑO POR I/R

La I/R a través de los RLO produce daño en el ADN, esto hace que se active la enzima Poli-ADP-ribosa-polimerasa (PARP-1) produciendo la reparación del ADN. La activación de la PARP-1 produce un consumo de NAD (+) intracelular que se restituye consumiendo ATP; dado que en la I/R severa el ATP está disminuido, la expresión de PARP-1 produce el efecto contrario, provocando la necrosis celular.

Nuestro grupo ha estudiado la expresión de PARP-1 en biopsias de trasplantes con FRA, encontrando una alta expresión de esta enzima en los injertos con mayor tiempo de isquemia y una baja expresión en injertos con tiempo de isquemia menor, hecho que predice la recuperación de la función renal durante el primer mes (O'Valle y cols., 2004).

6.1. Poli ADP-ribosapolimerasa (PARP)

PARP-1, también denominada ADP-ribosa transferasa (ADPRT) o Poli-ADP ribosa sintetasa (PARS), cataliza la transferencia de unidades de ADP-ribosa procedentes del sustrato NAD⁺ sobre los residuos carboxílicos de glutámico y aspártico de una serie de proteínas nucleares (D'Amours y cols., 1999). Esta modificación transitoria de proteínas nucleares, entre las cuales se encuentra la propia PARP-1, constituye un tipo de modificación postraducciona necesaria para la activación de una serie de procesos celulares.

PARP-1 se activa principalmente en respuesta a daños en el ADN generados por diferentes agentes genotóxicos, tales como radiación ionizante, agentes alquilantes y/o radicales libres; aunque recientemente se han descrito estímulos diferentes al daño en el ADN, como infección, estrés y hormonas derivadas de esteroides, que son también activadores de la enzima en lugares muy específicos de los cromosomas (Shall y De Murcia, 2000; Tulin y cols., 2002).

La poli-ADP ribosilación de proteínas mediadas por PARP-1 es, por tanto, una modificación covalente de proteínas nucleares que se realiza de una forma rápida (menos de 1 minuto) pero transitoria, y permite a estas proteínas modificar su función biológica en un momento determinado. Esta enzima se encuentra altamente conservada en la escala filogenética, aunque no existen evidencias de su presencia en levaduras (D'Amours y cols., 1999).

La formación del polímero requiere de tres etapas básicas (O'Valle y cols., 2004; Fig. 10): primero, una de mono-ADPribosilación del sustrato; segundo, de una etapa de elongación del polímero, y tercero, de una ramificación del mismo (Álvarez-González y cols., 1999). Para ello, PARP-1 posee estas tres actividades

enzimáticas. La degradación del polímero sintetizado se lleva a cabo por la enzima Poli-ADP-ribosa Glicohidrolasa (PARG) y la Poli-ADP ribosa liasa. La primera de ellas es la responsable de la hidrólisis de los enlaces glicosílicos, mientras la segunda hidroliza los enlaces éster (D'Amours y cols., 1999). Una vez detectado el daño, PARP-1 se une al ADN, activándose e iniciándose la síntesis del polímero y ocasionando la modificación postrasduccional de una serie de proteínas implicadas en la reparación del mismo.

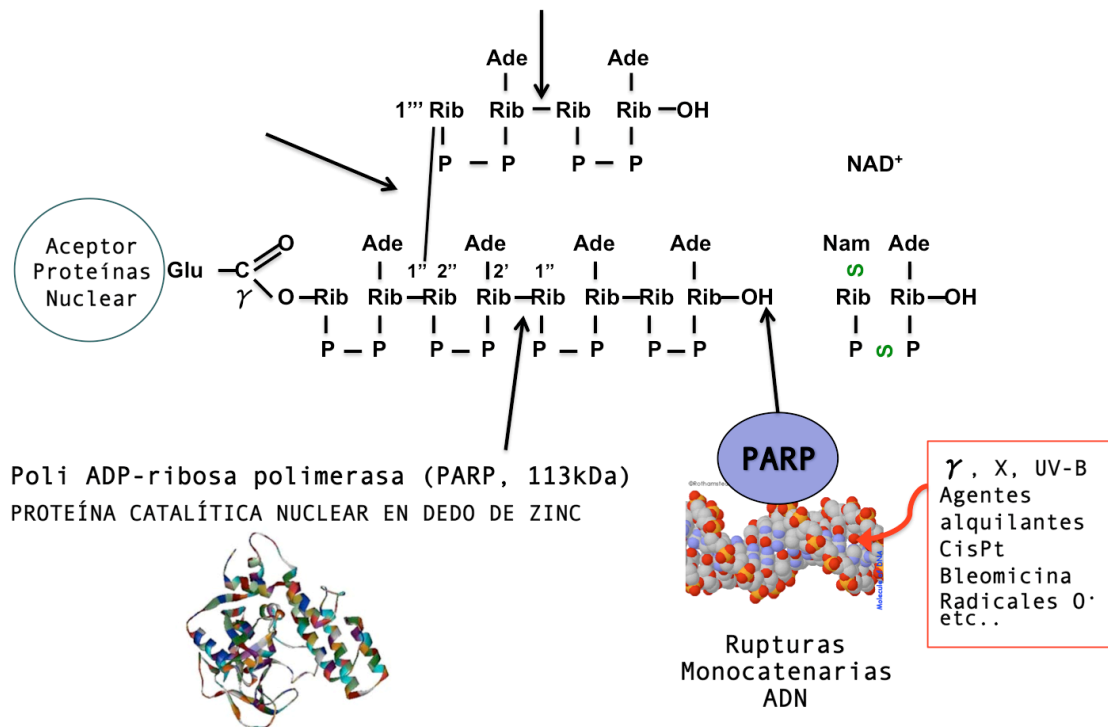


Figura 10. Proceso de síntesis y degradación de PARP-1.

Los niveles constitutivos del polímero son normalmente muy bajos en células sin estimular; en presencia de daño del ADN los niveles pueden aumentar entre 10 y 500 veces sobre su nivel basal. La automodificación que sufre la propia PARP-1 regula su actividad enzimática y su unión al ADN. Se ha propuesto un modelo para explicar la disociación de la proteína de las zonas de unión al ADN

tras su automodificación (100). El modelo se basa en la repulsión electroestática ocasionada por automodificación de la propia PARP-1 mediante el polímero, lo que le confiere una gran carga negativa a la enzima, produciendo su inactivación y la electro-repulsión entre PARP-1 y el ADN. A continuación, la enzima PARP llevaría a cabo la degradación del polímero, esto permite de nuevo que la enzima PARP-1 esté lista para otro ciclo de activación en respuesta a daños en el ADN.

6.2. Estructura de la PARP-1

Esta proteína funcionalmente se divide en tres dominios, aunque estructuralmente se ha dividido en seis dominios (A, B, C, D y F). El dominio estructural A o dominio de unión al ADN, situado en el extremo amino terminal, es a través del cual se produce la interacción de PARP-1 con el ADN, lo cual estimula la actividad catalítica de la enzima (Lindahl y cols., 1995). Esta interacción se realiza a través de dos estructuras en dedos de zinc denominadas FI y FII.

El dominio C-terminal o dominio catalítico F es el más conservado de la escala filogenética, revelando relaciones evolutivas con otras enzimas ADP-ribosiltransferasas. Posee estructuras laminares en donde se une a NAD⁺.

6.3. Funciones de la PARP-1

Gracias al desarrollo de inhibidores farmacológicos de PARP-1 y de ratones deficientes en esta proteína se ha podido demostrar que la enzima PARP-1 está involucrada en diversos procesos tales como la reparación y replicación del ADN, transcripción génica, muerte celular y respuesta inflamatoria (Figs. 11 y 12).

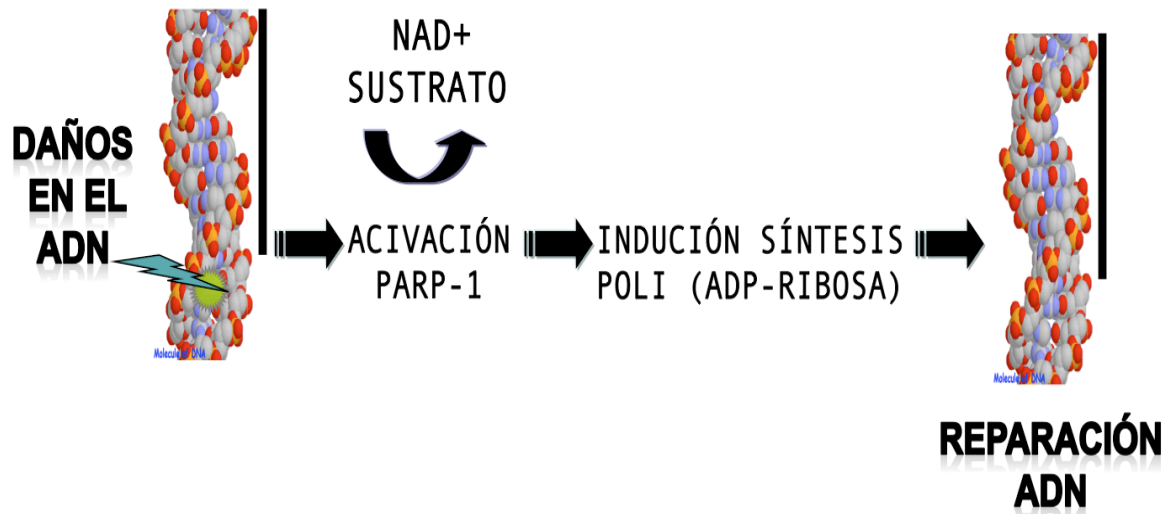


Figura 11. Proceso de activación de PARP-1

En una célula las concentraciones de NAD⁺ y ATP son cruciales para que la muerte celular se produzca por apoptosis o por necrosis (Virág y Szabó, 2002). La diferencia más importante entre apoptosis y necrosis quizá sea la desintegración precoz de la envoltura celular o membrana plasmática, de tal forma que en la necrosis todo el contenido celular escapa a los tejidos ocasionando una respuesta inflamatoria a su alrededor.

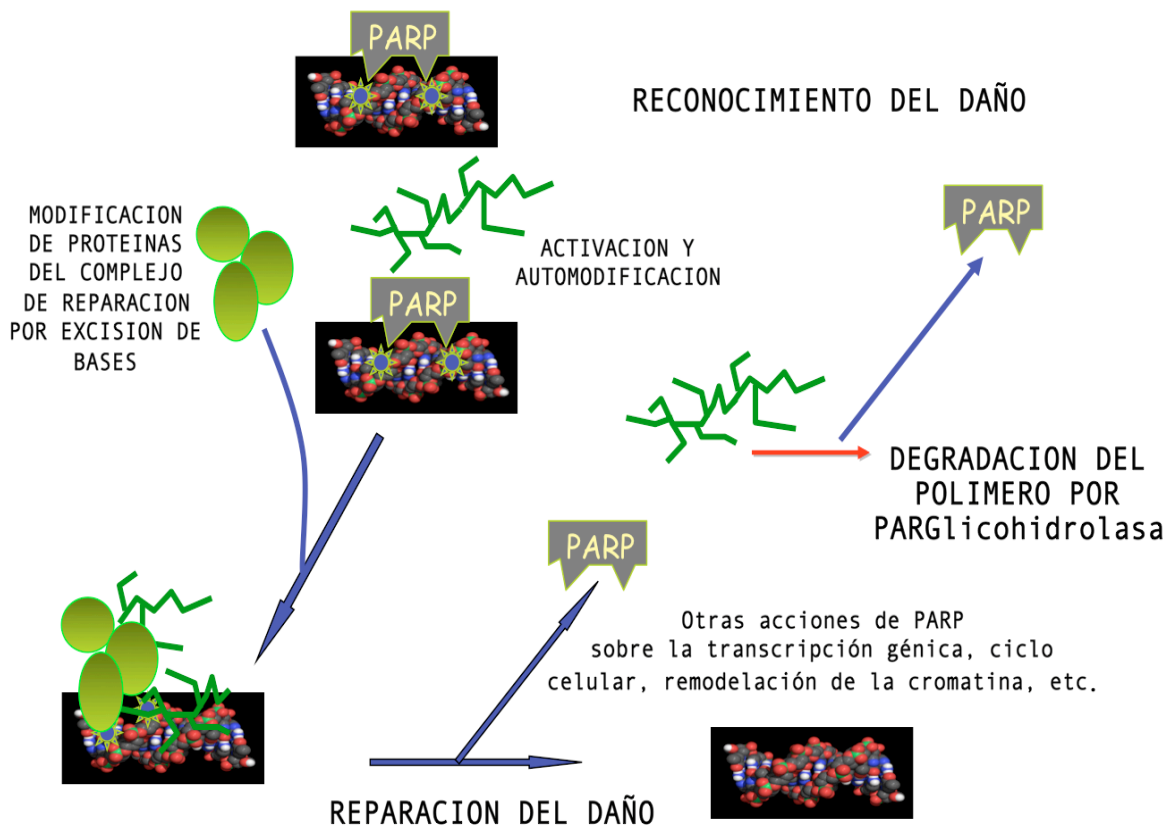


Figura 12. Funciones de PARP-1.

Con niveles leves o moderados de daño en el ADN, PARP-1 actúa como un factor de supervivencia implicado en la detección del daño en el ADN y en su reparación, sin el riesgo de arrastrar genes mutados. Por el contrario, con grandes niveles de daño en el ADN, PARP-1 promueve mecanismos de muerte celular (Burkle 2001). Así, la intensidad del estímulo genotóxico, determinará el destino celular (Jagtap y Szabó 2005) (Fig. 13).



Figura 13. La intensidad del estímulo de daño del ADN determina el destino celular: supervivencia, apoptosis o necrosis. Dependiendo de la intensidad del estímulo, PARP-1 regula tres rutas diferentes. En el caso de daño leve en el ADN, la poli(ADP-ribosil)ación facilita la reparación del ADN y por lo tanto, la supervivencia (ruta 1). Estímulos genotóxicos más intensos activan la apoptosis para eliminar células con ADN dañado (ruta 2). Un daño en el ADN muy grave puede causar sobreactivación de PARP-1, lo que agota los niveles celulares de NAD⁺ y ATP, bloqueando la apoptosis y favoreciendo la necrosis (ruta 3). La inhibición de PARP-1 en células que entran en la ruta 1 impide la reparación y, por tanto, las desvía a la ruta 2 (flecha discontinua de la izquierda). La inhibición de PARP-1 en células que entran en la ruta 3 conserva los niveles de energía celular y permite el proceso de apoptosis (flecha discontinua de la derecha). Adaptado de Jagtap y Szabó 2005.

6.4. PARP-1 en la inflamación

En los procesos patológicos derivados de diferentes respuestas inflamatorias, la inhibición farmacológica de PARP-1 o bien su bloqueo genético confiere protección frente a estos fenómenos. Esto se ha comprobado en numerosos modelos experimentales, tales como aquellos derivados de daños por

I/R, shock séptico o hemorrágico, diabetes y procesos inflamatorios crónicos (Virág y Szabó, 2002; Szabó y Dawson, 1998; Oliver y cols., 1999). Una característica común a todos estos procesos relacionados con la inflamación es la liberación de mediadores proinflamatorios y la formación de radicales libres. Consecuencia de ello, es la formación de radicales superóxido (O_2^-) e hidroxilo (OH^-) que interaccionan con el óxido nítrico sintetizado (producto de la actividad de la isoforma inducible de la Oxido Nítrico Sintasa, iNOS) dando lugar a peroxinitrito ($ONOO^-$). Este compuesto es un potente activador de PARP-1 que ocasiona depleción energética en la célula y por tanto necrosis, favoreciendo los procesos inflamatorios (Fig. 14). Simultáneamente, este agente genotóxico activa también diversos factores de transcripción, tales como NF- κ B y AP-1, dando lugar a un aumento de expresión de genes dependientes de estos factores implicados en diversos procesos tales como inflamación, angiogénesis, respuesta inmune, estrés oxidativo, además de controlar la expresión de genes que codifican para proteínas antiapoptóticas, moléculas de adhesión celular, proteínas de señalización celular, entre otros. La expresión de mediadores proinflamatorios dependientes de la anterior expresión génica, a su vez, recluta más células (PMN neutrófilos) al foco inflamatorio, aumentando los efectos del estrés oxidativo, de manera que se produce una retroalimentación positiva que amplifica enormemente este estado.

En esta cascada inflamatoria ocasionada por la sobreactivación de PARP-1 hay que tener en cuenta también el efecto que esta proteína tiene sobre la activación de los mencionados factores de transcripción. Por tanto, es un hecho demostrado que los ratones deficientes en la proteína PARP-1 muestran un

mayor grado de protección frente a patologías asociadas con procesos inflamatorios debido al menor status oxidativo ofrecido ante este estímulo y a una disminuida activación de factores de transcripción dependientes de PARP-1 e implicados en estos procesos (Szabó y cols., 1997; Conde y cols., 2001).

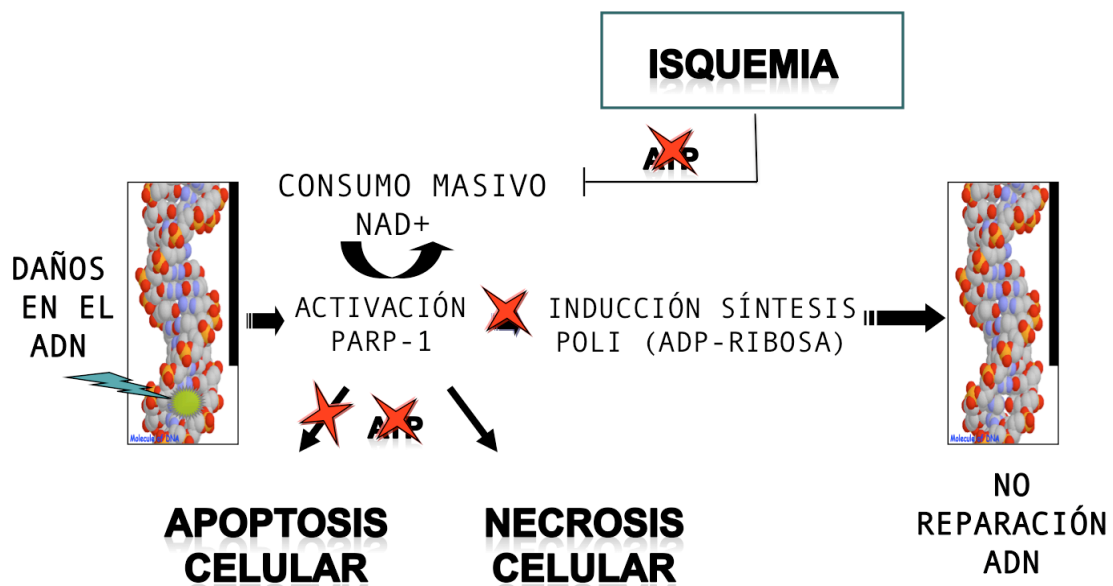


Figura 14. Papel de PARP-1 en la inflamación. Respuesta celular a los daños en el ADN

7. INHIBICION DEL DAÑO RENAL MEDIADO POR RADICALES LIBRES

7.1. USO DE PRECONDICIONANTES DE ISQUEMIA

Con el objetivo de evitar los procesos de I/R se han descrito múltiples estrategias, como la administración de sustancias antioxidantes, así como el uso de preconditionantes isquémicos, descrito como un fenómeno de adaptación de los tejidos al estrés oxidativo, potenciando los mecanismos de defensa intrínsecos

al producir un estado de resistencia de los tejidos ante la I/R. Este preconditionamiento pueden realizarse mediante cortos periodos de isquemia seguidos por reperfusión, con el objetivo de proteger ante una gran I/R. Otro mecanismo sería administrar sustancias previas a la isquemia que produzcan por ellas mismas liberación de radicales libres.

7.1.1. Inhibición de la Xantina-O

El interés en el alopurinol en la prevención de la lesión isquémica antecede a la hipótesis de los radicales libres de la I/R. Vasko y cols. (1972) estudiaron el efecto del alopurinol en perros callejeros sometidos a 90-120 min de isquemia. El alopurinol fue administrado tanto antes como después de la isquemia en dosis variables. El grupo fue capaz de demostrar una marcada reducción de la mortalidad. Se ha hipotetizado que el alopurinol inhibe la Xantina-O y, de esa forma, incrementa los niveles de precursores disponibles para la síntesis de ATP tras la reperfusión. En un intento por confirmar esta hipótesis, Owensy cols. (1974) administraron alopurinol y alopurinol/hipoxantina a riñones caninos, previo a la isquemia y a la reperfusión, para ver si el incremento de estos nucleótidos en el pool podía conducir a un incremento de la síntesis de ATP y mejorar la supervivencia tras la isquemia. En este estudio, sin embargo, no se observó un mayor efecto beneficioso de alopurinol/hipoxantina sobre hipoxantina sola, aunque hubo una diferencia significativa en la supervivencia de los grupos tratados con respecto a los controles. Con la intención de determinar cómo el alopurinol era beneficioso en el trasplante renal humano, Toledo-Pereyra y cols. (1977) estudiaron el efecto de adicionar alopurinol en el líquido de perfusión de

riñones humanos preservados para trasplante. En este estudio 34 parejas de riñones fueron preservadas mediante perfusión hipotérmica, con la excepción de que el alopurinol (250 mg/l) fue adicionado en un riñón de cada pareja. No se hallaron diferencias significativas entre ambos grupos con respecto a función renal a corto y largo plazo. Sin embargo, existían varios factores que deberían haber sido tenidos en cuenta al evaluar los resultados. Primero, el grupo control tenía una media de isquemia fría (25 h) menor que el grupo con alopurinol (32 h). Segundo, las dosis utilizadas de alopurinol eran la mitad de las usadas en modelos animales.

No fue hasta 1982 con la publicación de Hansson y cols. (1982) que el rol del alopurinol en la prevención del daño renal por I/R fue reevaluado. Estos investigadores fueron capaces de demostrar que el alopurinol impedía la acumulación de eritrocitos en el límite externo de la médula externa observada en los riñones isquémicos tras la reperfusión. Además, los riñones tratados con alopurinol presentaban un flujo sanguíneo renal incrementado. Esto probablemente se deba a una mejora de la circulación medular profunda. Paller y cols. (1984) también confirmaron el efecto beneficioso de alopurinol en la protección del riñón contra la lesión por I/R. En este estudio, el alopurinol, en una dosis de 40 mg/Kg demostró un efecto protector contra el deterioro funcional renal, cuando era administrado previo al periodo de isquemia renal. Baker y cols. (1985) demostraron que el alopurinol, en dosis de 100 mg/Kg, reducía la mortalidad de ratas sometidas a 45 min de isquemia caliente de 44% a 0% cuando era administrado en bolo inmediatamente antes de la reperfusión.

En resumen, el alopurinol se ha mostrado efectivo en estudios experimentales en ratas, conejos y perros en la mejora de la función renal y reduciendo la mortalidad de la isquemia caliente. Con la excepción del trabajo de Baker y cols., se ha visto que en el riñón, el alopurinol necesita ser administrado antes del periodo de isquemia. La inhabilidad del alopurinol para afectar la función renal a corto y largo plazo en humanos no ha sido firmemente establecido debido al hecho de que el estudio de Toledo-Pereyra mostró una ventaja de las ratas no tratadas sobre las tratadas y a que se utilizaron dosis inadecuadas de alopurinol.

7.1.2. Inhibición de RLO por SOD

En 1983, Hansson y cols. (1983) demostraron que la SOD (20 mg/Kg) en administración intravenosa 10 min antes de la reperfusión, tuvo un efecto equivalente al alopurinol, previniendo la acumulación de eritrocitos en la médula externa. Paller y cols. (1984) también investigaron los efectos de SOD (8 mg/Kg) en ratas sometidas a 60 min de isquemia caliente. En este estudio la SOD fue administrada intravenosa 8 min previos al clampaje de la arteria renal y 8 min antes de remover el clamp vascular. La creatinina sérica se redujo significativamente en los animales tratados con SOD. Además, las ratas tratadas mostraron menor daño morfológico tubular que el grupo no tratado. Ouriel y cols. en 1985, estudiaron el efecto de la SOD administrada intra-arterial 5 min previo a la reperfusión en perros callejeros sometidos a 60 min de isquemia caliente comparados con controles tratados con albúmina. Los riñones fueron evaluados morfológica y funcionalmente a los 30 min de reperfusión. La TFG y el flujo urinario fueron significativamente mayores en los grupos tratados con SOD. Finalmente Baker y cols. (1985) estudiaron el efecto de SOD tras 45 min de

isquemia caliente en la rata usando varias concentraciones de SOD y tiempos de administración. La SOD (6.5 mg/Kg) administrada justo antes de la reperfusión resultó en una mejora significativa de la supervivencia en el día 7 tras el periodo de isquemia. Cuando fue administrada antes del periodo de isquemia, la SOD no tuvo efecto e incluso incrementó la mortalidad de estos animales tratados comparados con los controles isquémicos no tratados. Cuando el periodo de isquemia fue aumentado a 60 min, la SOD en iguales dosis continuó mejorando la supervivencia de los animales tratados comparado con los no tratados, pero fue menos efectiva. Estos estudios demuestran claramente que la SOD es efectiva en la mejora de la función renal a corto plazo y posiblemente en la supervivencia en general de ratas, conejos y perros. Está claro que la SOD debe estar presente al momento de la reperfusión para ser efectiva.

Además de la SOD, otros agentes depuradores de radicales libres se han mostrado efectivos en la prevención del daño de la I/R.

7.1.3. Vitamina E

La vitamina E forma parte del grupo de las vitaminas liposolubles y se la considera la vitamina más antioxidante de las membranas celulares.

Debido a su gran lipofilidad y, por tanto, a la imposibilidad de su administración IV, se han desarrollado análogos, como el Trolox, con actividad hidrofílica, que pueden administrarse por vía intramuscular o intravenosa.

Fue uno de los primeros compuestos que se utilizó experimentalmente como preconditionante de la lesión en la I/R hepática.

Tal y como han demostrado numerosos estudios, produce un aumento de la resíntesis de ATP, una disminución en la producción de los lipoperóxidos y un

aumento del GSH durante la reperfusión, aminorando de esta forma la lesión por I/R (Codoñer-Franch y cols., 2008; Wu, 1991).

7.1.4. Captopril

Es, de todos los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA), el que posee mayor actividad antioxidante. Su efecto *scavenger* de RLO se debe a la presencia en su estructura de un radical sulfhidrilo (SH). Aumenta la producción de óxido nítrico (NO) por parte de la célula endotelial en situación de estrés y las defensas antioxidantes en corazón, médula renal e hígado. También aumenta la actividad de la SOD y de la GPx hepática, lo que podría deberse a un efecto directo sobre la síntesis de éstas. La actividad SOD humana está regulada por péptidos de bajo PM, considerándose al captopril un análogo de éstos (De Cavanagh y cols., 1995).

7.1.5. N-Acetilcisteína (NAC)

Derivado tiólico, precursor de la L-cisteína, se caracteriza por su eficacia antioxidante, mediada tanto por efectos directos como por medio de la estimulación de la vía del glutatión. La molécula de N-acetilcisteína presenta un grupo sulfhidrilo; la oxidación de estos grupos da lugar a puentes disulfuro, los cuales permiten enlazar dos moléculas del fármaco. Estos complejos, al igual que el glutatión reducido, actúan mediante la reducción de radicales como el peróxido de hidrógeno, el anión hidroxilo y el ácido hipocloroso. Mientras que la acción inhibitoria de la N-acetilcisteína sobre el oxígeno molecular es casi nula, la reducción de los aniones hidroxilo es rápida y eficaz. La capacidad reductora de la N-acetilcisteína es máxima para este anión, en comparación con sus efectos sobre el ácido hipocloroso y el peróxido de hidrógeno.

En altas concentraciones protege a las células del daño oxidativo mediante dos mecanismos: a) por su efecto antioxidante directo neutralizando el H₂O₂, y b) aumentando las reservas citoplasmáticas de glutatión (Chavez-Cartaya y cols., 1999).

De todos estos scavengers sólo se ha demostrado un efecto beneficioso sobre la microcirculación hepática durante la reperfusión con SOD y tocoferol. El resto sólo demostró efecto protector bioquímico.

7.2. PRECONDICIONAMIENTO RENAL

En lo que respecta al riñón, uno de los primeros estudios sobre preconditionamiento isquémico (IP) surge hacia finales de 1980 cuando Yoshioka y cols. (1990) producen un aumento tardío de resistencia contra la lesión isquémica a través de la inducción de enzimas antioxidantes intrínsecas mediante un episodio corto de isquemia previa. Se trata de un mecanismo dependiente de proteínas similar al de la fase tardía de preconditionamiento descrito en el corazón (Bolli, 2000).

Un ciclo de isquemia caliente de 15 min seguido de un periodo de reperfusión de 10 min parece ser la maniobra más conveniente para inducir protección contra la isquemia caliente a través de la producción local de óxido nítrico -ON- (Torras, 2002). A partir del año 2000, varios estudios han corroborado la eficacia del IP en riñón tanto en fases tempranas como tardías, implicándose mediadores tales como el ON, SOD o iNOS (Chien y cols., 2000; Sindram y cols., 2002; Park y cols., 2003). Recientemente, se han publicado mecanismos más atractivos y vanguardistas de protección renal a través de IP en

relación con las células inmunitarias. Parece ser que las células inmunitarias son bloqueadas luego de una IP renal, y por lo tanto disminuye su capacidad de producir lesión renal en un segundo episodio de I/R (Burne-Taney y cols., 2006). La fase tardía de IP se ha asociado con la movilización de un “pool” esplénico de células progenitoras las que se acumulan a nivel de la zona medular y papilar renal (Patschan y cols., 2006).

Varias medidas farmacológicas y químicas como CsA (Ciclosporina A) o FK 506 (Tacrolimus) a bajas dosis (Yang y cols., 2003), sevoflurano (Obal y cols., 2006), vitamina D3 (Kim y cols., 2005), ozono (Barber y cols., 1999), o tinprotoporfirina IX (Kaizu y cols., 2003) son capaces de inducir tolerancia frente a isquemia. Se han utilizado como preconditionantes radicales nitroxilos estables, tales como el Tempol y el Tempone (Chatterjee y cols., 2000; Patel y cols., 2002). La administración intravenosa de Tempone, un minuto antes de inducir la isquemia renal, disminuyó significativamente la formación de nitrotirosina y PARP-1, reduciendo la disfunción renal y la lesión histológica, sin asociar los efectos cardiovasculares adversos (hipotensión) observados con Tempol. Chujo y cols. (2010) demostraron que la infusión continua de péptido natriurético atrial (PNA) era capaz de acelerar la recuperación renal tras el daño isquémico, reduciendo la afectación de las células renales productoras del factor de crecimiento epidérmico. El preconditionamiento con sildenafilo tuvo un efecto renoprotector, demostrado por cintigrafía (Tc 99) e histomorfometría renal, en ratas sometidas a I/R normotérmica (Medeiros y cols., 2010). El postcondicionamiento con ozono mostró un efecto protector en la preservación renal y un menor daño histológico tras la I/R (Fernández Iglesias y cols., 2011). En los últimos años, varios grupos

han utilizado sustancias vegetales (jugo de ajo, extracto de benincasa cerífera o calabaza blanca) como preconditionantes de isquemia, obteniendo diversos grados de renoprotección (Bagheri y cols., 2011; Bhalodia y cols., 2009). Sin embargo, la maniobra más destacada en la protección contra la isquemia a través del preconditionamiento es el uso de eritropoyetina (Yang y cols., 2003).

8. ISQUEMIA-REPERFUSIÓN Y HORMONAS TIROIDEAS

Las hormonas tiroideas desempeñan un papel esencial en el metabolismo energético en el organismo. El estado hipertiroideo en mamíferos conduce a un aumento del metabolismo basal, que incrementa el consumo total de oxígeno de los tejidos blanco, efecto conocido como **calorigénesis tiroidea**. El hipertiroidismo produce en ratas un incremento en la actividad de enzimas hepáticas involucradas en procesos de oxidorreducción a nivel mitocondrial, microsomal y peroxisomal, aumentando la generación de RLO, como el radical O_2^- y/o el peróxido de hidrógeno, y a nivel citoplasmático aumenta la generación de especies reactivas de nitrógeno (ERN), como el NO y el peroxinitrito (ONOO⁻). Concomitantemente con este incremento en la generación de RLO y de ERN, se produce una importante disminución de la actividad de algunos sistemas de defensa antioxidante, como la SOD, la catalasa y los contenidos totales de equivalentes de glutatión. Este aumento en el nivel de las moléculas prooxidantes junto a la disminución de la actividad antioxidante, condicionan un estrés oxidativo hepático que conduce a daño celular, mediante un incremento en la respuesta lipoperoxidativa.

Troncoso y cols. (1997), describe en ratas tratadas con triyodotironina (T_3) un aumento de la respuesta calorigénica lo cual conduce a un incremento transitorio del estado oxidativo en el hígado, este estado ocurre dentro de las 24 h de la administración de la hormona, con recuperación a las 48 h. A las 48 h se produce una sobreexpresión de glutatión. Basándose en estos resultados,

Fernández y cols. (2007) han descrito que la administración de T_3 48 h antes del periodo de I/R en el hígado protege al órgano de dicho proceso.

El estrés oxidativo debido a la calorigénesis inducida por la hormona T_3 provoca una sobreexpresión hepática de los mediadores que promueven la protección celular. La administración de T_3 en ratas (una dosis única de 0.1 mg/kg, intraperitoneal) induce una depleción significativa de glutatión hepática reducida (GSH), acompañado de una mayor oxidación proteica, consumo de oxígeno y de la función de las células de Kupffer (fagocitosis carbónica y la respuesta de oxígeno inducida por carbón).

Estos cambios ocurren dentro de un periodo de 36 h de tratamiento con T_3 en animales. La I/R hepática parcial (1 h de isquemia mediante clampaje vascular seguido de una reperfusión de 20 h) provoca un aumento de los niveles séricos de GOT y GPT, y cambios significativos en la histología del hígado, con una disminución del 36 % en el contenido hepático de GSH y un aumento del 133 % del de proteína carbónica. La administración de T_3 en una ventana de tiempo de 48 h actúa como protector contra la lesión hepática por I/R, con una reducción del 60% y del 90 % de la depleción hepática de GSH y de la oxidación proteica inducida por I/R, respectivamente.

9. ACCIONES DE LA HORMONA TIROIDEA SOBRE EL RIÑÓN

La primera acción directa de la hormona tiroidea sobre el riñón es, como era de esperarse, de tipo metabólica, y consiste en la estimulación de la reabsorción de Na⁺ (siempre por encima del 99%) en el túbulo proximal y en el asa de Henle (Bradley y cols., 1972 y 1974; Cohen, 1963; Ismail-Beigi, 1973; Katz y cols., 1973 y 1975; Schulte-Wisserman y Straub, 1973; Strauss, 1971) el cual bajo condiciones normales es el proceso de transporte tubular más importante. Aproximadamente el 60% del Na⁺ filtrado es reabsorbido activamente en el túbulo proximal el cual tiene más del 80% del consumo renal de O₂ (Deetjen y Kramer, 1961).

El efecto directo inducido por la hormona se manifiesta por hipertrofia e hiperplasia de las estructuras superiores de la nefrona, activación de una gran cantidad de enzimas del túbulo proximal, incremento en los valores T_m de glucosa (transporte máximo de la glucosa a nivel del túbulo proximal) e intensificación del consumo de O₂ en el epitelio de los ya mencionados segmentos tubulares (Stephan y Jahn, 1961; Hoch, 1962; Brasel y Winick, 1970; Holmes y Di Scala, 1970; Straub, 1971; Bradley, 1971; Davies, 1972; Bradley y cols., 1972 y 1974; Katz y cols., 1975; Schulte-Wissermann y cols., 1977). El hipotiroidismo, por el contrario, presenta característicamente hipotrofia e hipoplasia de las estructuras glomerulares superiores, baja actividad enzimática tubular, depresión de los valores T_m de glucosa y reducción del consumo de O₂ en el epitelio del túbulo proximal y el asa de Henle (Straub, 1971). Considerando el incremento de la reabsorción “obligatoria” de Na⁺ y H₂O debido a la

hiperactividad de L-tiroxina o L-triyodotironina debe postularse que un volumen de fluido tubular apropiadamente reducido alcanza la rama ascendente del asa de Henle, cuyo epitelio reabsorbe activamente Na^+ pero es impermeable al H_2O .

El cambio en la normal hipotonicidad distal, como resultado del enlentecimiento del flujo urinario y la prolongación del tiempo de contacto orina/epitelio, el refuerzo de la dilución urinaria antes de que llegue a la mácula densa, es seguido por una vasodilatación preglomerular, reacción fisiológica realizada a través del aparato yuxtglomerular. El flujo de perfusión renal (FPR) y el flujo glomerular renal (FGR) es autolimitado, desde un aumento en el propio volumen de filtrado que incrementa la entrada a la porción ascendente del asa de Henle, lo cual reduce nuevamente el contacto orina/epitelio. El nuevo estado recién conseguido se caracteriza por una aceleración absoluta de la reabsorción tubular de Na^+ (y de H_2O) así como también de la filtración glomerular de Na^+ (y de H_2O), por el cual el incremento del FPR y del FGR es determinado por la capacidad de reabsorción actual.

De acuerdo a esto, en el hipertiroidismo, las influencias son ejercidas sobre el mecanismo de retroalimentación del riñón, como si se tratara de una bajada de la presión arterial con riesgo de hipoperfusión del túbulo proximal, y debiera ser neutralizado. Es obvio que la rama ascendente del asa de Henle, cuya eficacia de dilución sirve como punto de orientación para el vasotonopreglomerular, no es capaz de distinguir entre la reducción en el filtrado glomerular y una retirada de fluido isotónico del túbulo proximal: en cualquier caso, el déficit registrado corresponde a un volumen disminuido en el túbulo proximal.

La importancia de un aumento de la reabsorción de agua libre y de Na^+ estaría que aquí un volumen relativamente más grande de fluido tubular puede ser diluido hasta el punto de cierta hipotonicidad distal y una cantidad relativamente más grande de orina pasa la mácula densa. Esta fuga adicional de orina, entrando al túbulo distal, es compensada –junto a una hiperreabsorción en el túbulo proximal- por un apropiado incremento del FGR a través de los mecanismos de retroalimentación intrarrenal anteriormente nombrados.

Los mecanismos de autorregulación del riñón demuestran una reacción exactamente opuesta en el hipotiroidismo, el cual se presenta primariamente con un déficit de reabsorción de Na^+ y H_2O en el túbulo proximal (y probablemente también de Na^+ en la rama ascendente del asa de Henle) (Holmes y Di Scala, 1970). Por medio del aparato yuxtaglomerular, el incremento consecutivo (relativo) de la concentración de Na^+ en la región de la mácula densa transmite impulsos vasoconstrictores a las arteriolas aferentes, pero al mismo tiempo la disminución del FGR limita la capacidad de dilución de la rama ascendente del asa de Henle: el nuevo estado recién conseguido se caracteriza por una reabsorción-filtración-circulación de Na^+ y H_2O muy enlentecida.

En el hipotiroidismo, por lo tanto, los mecanismos de retroalimentación intrarrenal de Na^+ se comportan como una hipertensión arterial que requiriera una vasoconstricción preglomerular adaptativa para evitar una sobrecarga de filtrado del sistema tubular.

10. USO DE LA HORMONA TIROIDEA EN EL FRA TÓXICO E ISQUÉMICO

Hace más de cuarenta años Straub (1971) demostró que las inyecciones de tiroxina (T_4) en animales (conejos y ratones) con fracaso renal nefrotóxico eran capaces de disminuir de forma significativa la mortalidad. Lo que hizo tan importantes estos estudios fue el hecho de que la T_4 fue administrada después del fracaso renal nefrotóxico inducido con cloruro de mercurio. Estudios posteriores de los mismos investigadores han intentado dilucidar los mecanismos subyacentes al efecto beneficioso de la T_4 . Demostraron en los estudios histoquímicos que el número de enzimas claves, como la NA-K-ATPasa, eran mantenidas en un alto nivel de actividad a través de las inyecciones de la hormona tiroidea (Brasel y Winick, 1970; Bradley, 1971). Otros investigadores retomaron el interés por este rol tan importante de la T_4 en el FRA tanto nefrotóxico como isquémico. Siegel y cols. (1984) fueron capaces de demostrar que el efecto beneficioso de la hormona era independiente de la inducción del incremento del flujo sanguíneo renal, mediante la perfusión de riñones aislados. El mismo grupo demostró que el contenido intracelular de ATP, el cual era deplecionado por el FRA isquémico, era restablecido cuando la T_4 se administraba a ratas con daño renal por I/R (Sutter y cols., 1988). Cronin y Newman (1985) demostraron que la administración simultánea de T_4 a ratas que recibían dosis nefrotóxicas de gentamicina resultó en una mejora del FRA. Los mismos investigadores demostraron que la T_4 tenía un efecto beneficioso a través de una disminución de la acumulación tubular de gentamicina (1989). En estudios de FRA por nitrato de uranilo, Cronin y cols. (1986; 1989) confirmaron el hecho de

que la T₄ estimulaba la actividad de la NA-K-ATPasa en la corteza renal. Michael y cols. (1991) confirmaron que la T₄ mejoraba la función renal en el FRA inducido por dicromato de potasio. La administración de la hormona se realizó tras 24 h de ocurrida la isquemia, por lo que se cree que el efecto beneficioso se debe a un aumento de la capacidad de reparación del daño tubular renal. La regeneración tubular renal después de un daño nefrotóxico o isquémico ya ha sido descrita, y la respuesta renal a la timidina del ADN se ha utilizado comúnmente como biomarcador de este proceso (Preuss, 1976; Humes y cols., 1989). Algunos investigadores han medido la regeneración tubular como un indicador de la severidad del daño tubular (Laurent y cols., 1983). Varios estudios han investigado la influencia de fármacos, hormonas y factores de crecimiento sobre la tasa de regeneración renal y, asimismo, la recuperación renal en animales con grados similares de daño renal. Koizumi y Yamane(1988) describieron un aumento de la regeneración y mejoría de la función renal con el tratamiento de molibdato de sodio en ratas con FRA inducido por cloruro de mercurio. Asimismo, la hidrocortisona ha demostrado que retrasa la regeneración renal tras la administración de gentamicina, sin observarse que influya sobre los niveles de urea y creatinina séricas (Beachamp y Pettigrew, 1988). Humes (1989), Coimbra(1990) y cols. encontraron que la administración de factor de crecimiento epidérmico (EGF) después del daño renal nefrotóxico e isquémico aumentó la timidina renal, lo cual se asoció claramente a una aceleración de la recuperación de la función renal. Es bien conocido el papel de la T₄ como factor de crecimiento renal, la cual es esencial para una normal maduración de los riñones (Hammet, 1927). El hipotiroidismo perjudica la capacidad del riñón de aumentar el factor de

crecimiento renal tras una nefrectomía parcial, en tanto que el exceso de T_4 aumenta el factor de crecimiento en estos casos (Stephan y cols., 1982). La recuperación renal depende de la liberación parácrina de factores de crecimiento que estimulan la regeneración de las células tubulares renales. Se ha postulado que existe una activación de los receptores del EGF tanto por EGF o por otros factores de crecimiento. Estudios in vitro de Johnson y colaboradores mostraron que el pretratamiento de células tubulares proximales de conejos con T_3 incrementó su respuesta al EGF, evaluado por incorporación de timidina. Demostraron que el pretratamiento con T_3 produjo un incremento del número de receptores de EGF en las células epiteliales renales (Johnson y cols. 1989).

II. PLANTEAMIENTOS Y OBJETIVOS

La lesión por isquemia/reperfusión (I/R) renal es la mayor causa de fallo renal agudo (FRA). Esto puede resultar de la hipoperfusión sistémica o de una interrupción temporaria del aporte sanguíneo renal en diversos procedimientos clínicos, entre ellos el trasplante renal.

La isquemia desencadena una secuencia de eventos complejos que culmina en el daño y eventual muerte de las células renales, manifestándose a nivel histológico como una necrosis tubular aguda (NTA) (Lameire y Vanholder, 2001). La reoxigenación del tejido isquémico, aunque es indispensable para la supervivencia celular, ocasiona un daño adicional que se conoce como lesión por reperfusión y cuya patogénesis se basa esencialmente en la generación de radicales libres del oxígeno (RLO) (Grace, 1994; Paller, 1994; Weight y cols., 1996; Nath y Norby, 2000).

El incremento en el estrés oxidativo puede dañar los componentes celulares tales como el ADN, proteínas, y lípidos (Bayrak y cols., 2008; Legrand y cols., 2008; Li y Jackson, 2002) comprometiendo así directamente la integridad del epitelio glomerular y tubular, un evento conocido por contribuir al desarrollo de la NTA (Senturk y cols., 2008).

En los años '70 Straub y cols. (1971) demostraron que la administración de tiroxina (T_4) en animales (ratones y conejos) con fallo renal nefrotóxico provocaba una marcada reducción en la tasa de mortalidad. Estudios posteriores en ratas con FRA inducido por distintos agentes nefrotóxicos encontraron que la T_4 mejoraba la morfología renal acelerando la reparación de los túbulos renales dañados, conduciendo a una recuperación más rápida de la función renal (Schulte-Wissermann y cols., 1977; Cronin y cols., 1985 y 1986; Michael y cols.,

1991). En un estudio in vitro, Humes y cols. (1992) observaron que el pretratamiento de las células tubulares proximales de conejo con 3, 3, 5 triyodotironina (T_3) incrementaba su respuesta al factor de crecimiento epidérmico y aceleraba la regeneración tubular. En estudios in vivo, se ha reportado que la administración post-isquémica de T_4 mejora la función renal y la morfología celular, con una mayor recuperación del contenido de ATP intracelular renal, el cual está disminuido en el FRA isquémico (Sutter y cols., 1988). Asimismo, Fernández y cols. (2007) observaron que el pretratamiento con T_3 protegía al hígado contra el daño por I/R en ratas.

Estudios previos de nuestro grupo demostraron que el daño por I/R causa sobreexpresión de Poly(ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP-1), lo cual se ha asociado con una alta incidencia de NTA y función retrasada del injerto (O'Valle y cols., 2009). Por otra parte, es conocido que la lesión por I/R renal activa mediadores celulares de la inmunidad, tales como células dendríticas, neutrófilos, macrófagos, células natural killer T y células B y T, lo cual contribuye a la patogénesis del daño renal (Jang y cols., 2010).

Así, la hemo-reperfusión pobre en leucocitos mejoró la función renal post-isquémica y el daño túbulo-intersticial en un modelo porcino (Yang y cols., 2010); y se ha demostrado que la respuesta inmune, y más específicamente, los linfocitos (T y B) y las células dendríticas, participan como mediadores del daño por I/R renal (Parra y cols., 2010).

En base a lo anterior, diseñamos un estudio para comprobar la hipótesis de que el preconditionamiento con T_3 puede proteger al riñón contra el daño por I/R

corrigiendo el desequilibrio asociado del estado oxidativo y la expresión de moléculas pro inflamatorias que intervienen en las lesiones renales.

Con estos antecedentes los objetivos del presente trabajo son:

- Determinar los efectos de la isquemia-reperfusión sobre el riñón y los factores que contribuyen a las lesiones.
- Evaluar los efectos delprecondicionamiento con 3, 3, 5 triyodotironina (T_3) sobre la función renal, estrés oxidativo y citoquinas inflamatorias.
- Evaluar los efectos delprecondicionamiento con 3, 3, 5 triyodotironina (T_3) en tejido renal: NTA,expresión de PARP-1, e infiltración leucocitaria en la lesión por I/R.
- Valorar si la administración de hormona tiroidea como preconditionante pre-isquémico previene estas lesiones.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. DISEÑO DEL ESTUDIO Y GRUPOS

Animales y distribución

Para los experimentos realizados en la elaboración de este trabajo de Tesis Doctoral se emplearon ratas macho de la cepa Wistar nacidas y criadas en el Servicio de Animales de Experimentación de la Comisión de Servicios Técnicos de la Universidad de Granada (Fig. 1). Los experimentos fueron realizados de acuerdo a las Guías europeas para el cuidado ético de animales y fueron aprobados por el comité ético de la Universidad de Granada. Las ratas, que inicialmente pesaban entre 280-310 g, fueron mantenidas con comida estándar y agua de grifo *ad libitum*.

Los animales (n=120) fueron divididos en cuatro grupos: **IR-T₃**, ratas sometidas a isquemia renal bilateral pretratadas con triyodotironina; **IR-P**, ratas sometidas a isquemia renal bilateral pretratadas con placebo; y dos grupos de ratas sometidas a laparotomía (sham-operated) y pretratadas con triyodotironina (**SO-T₃**) o placebo (**SO-P**). Los animales (n: 10 en cada grupo) fueron examinados a las **4, 24, o 48 h** de la reperusión.

De acuerdo con los objetivos establecidos previamente los animales fueron distribuidos de la siguiente forma:

- **Grupo IR-T₃ 4 h**(n= 10). Isquemia/reperusión triyodotironina 4 h. 45 min de isquemia caliente y reperusión de 4 h.
- **Grupo IR-P 4 h**(n= 10). Isquemia/reperusión Placebo 4 h. 45 min de isquemia caliente y reperusión de 4 h.

- **Grupo SO-T₃ 4 h** (n= 10). Control triyodotironina 4 h. Laparotomía y sacrificio a las 4 h.
- **Grupo SO-P4 h** (n= 10). Control Placebo 4 horas. Laparotomía y sacrificio a las 4 h.
- **Grupo IR-T₃ 24 h** (n= 10). Isquemia/reperfusión triyodotironina 24 h. 45 min de isquemia caliente y reperfusión de 24 h.
- **Grupo IR-P 24 h** (n= 10). Isquemia/reperfusión Placebo 24 h. 45 min de isquemia caliente y reperfusión de 24 h.
- **Grupo SO-T₃ 24 h** (n= 10). Control triyodotironina 24 h. Laparotomía y sacrificio a las 24 h.
- **Grupo SO-P 24 h** (n= 10). Control Placebo 24 h. Laparotomía y sacrificio a las 24 h.
- ❖ **Grupo IR-T₃ 48 h** (n= 10). Isquemia/reperfusión triyodotironina 48 h. 45 min de isquemia caliente y reperfusión de 48 h.
- ❖ **Grupo IR-P 48 h** (n= 10). Isquemia/reperfusión Placebo 48 h. 45 min de isquemia caliente y reperfusión de 48 h.
- ❖ **Grupo SO-T₃ 48 h** (n= 10). Control triyodotironina 48 h. Laparotomía y sacrificio a las 48 h.
- ❖ **Grupo SO-P48 h** (n= 10). Control Placebo 48 h. Laparotomía y sacrificio a las 48 h.

2. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS EMPLEADOS

2.1. Protocolo del experimento

2.1.1. Precondicionamiento

Todos los animales fueron precondicionados 24 h antes de la isquemia renal o de la laparotomía con una dosis única intraperitoneal de T₃ o de placebo, siempre a 37°C.

Grupos T₃ (IR-T₃, SO-T₃): triyodotironina (100 ug/Kg de rata) disuelta con 0.1N de sosa (NaOH) en 0,5 mL de suero salino isotónico.

Grupos P (IR-P, SO-P): 0.1N de sosa (NaOH) en 0,5 mL de suero salino isotónico.

2.1.2. Preparación de la rata

Los animales fueron pesados y posteriormente anestesiados con una inyección intraperitoneal de equitensina (500mL contienen 43% w/v hidrato de cloral en 81 mL de etanol; 4,86 mg pentobarbital; 198 mL propilenglicol; 10,63 g MgSO₄; agua destilada) a razón de 0.30 mL/100 g peso (Fig. 1). Se rasuraron las regiones del dorso del cuello, ambas fosas renales y abdomen.

2.1.3. Cateterización de la arteria carótida

Se insertó un catéter de polietileno (PE-50) conteniendo 100 unidades de heparina en solución estéril de cloruro de Na isotónico, en la arteria carótida. El catéter fue introducido por vía subcutánea y extraído a través de la piel en la región dorsal del cuello. Se extrajo una muestra de sangre basal de aproximadamente 0,3 mL que fue almacenada en tubo heparinizado (heparina sódica a razón de 100 uL/5 mL de sangre).

2.1.4. Inducción de la isquemia/reperfusión renal

Se realizó una incisión abdominal a través de la línea alba para evitar pérdidas sanguíneas. Ambos pedículos renales fueron identificados y ocluidos con clamps microvasculares (Equipamientos sanitarios S.A Madrid, España) durante 45 min, luego de lo cual los clamps fueron removidos, permitiendo la reperfusión de los riñones (Fig. 1). Posteriormente se cerró el abdomen en dos planos y se inyectaron vía intraperitoneal 2,5 mL de suero salino a 37° C/100 g de rata. La oclusión se verificó visualmente por el cambio en la coloración renal, la cual era más pálida después de la oclusión y más azulada tras la reperfusión. Las ratas de los grupos control (sham-operated SO) fueron sometidas a un procedimiento quirúrgico idéntico al de los grupos de I/R, excepto que los pedículos renales no fueron clampados.

Todas las ratas fueron colocadas en jaulas metabólicas (Panlab, Barcelona, España) con comida y agua *ad libitum* durante el periodo de reperfusión.

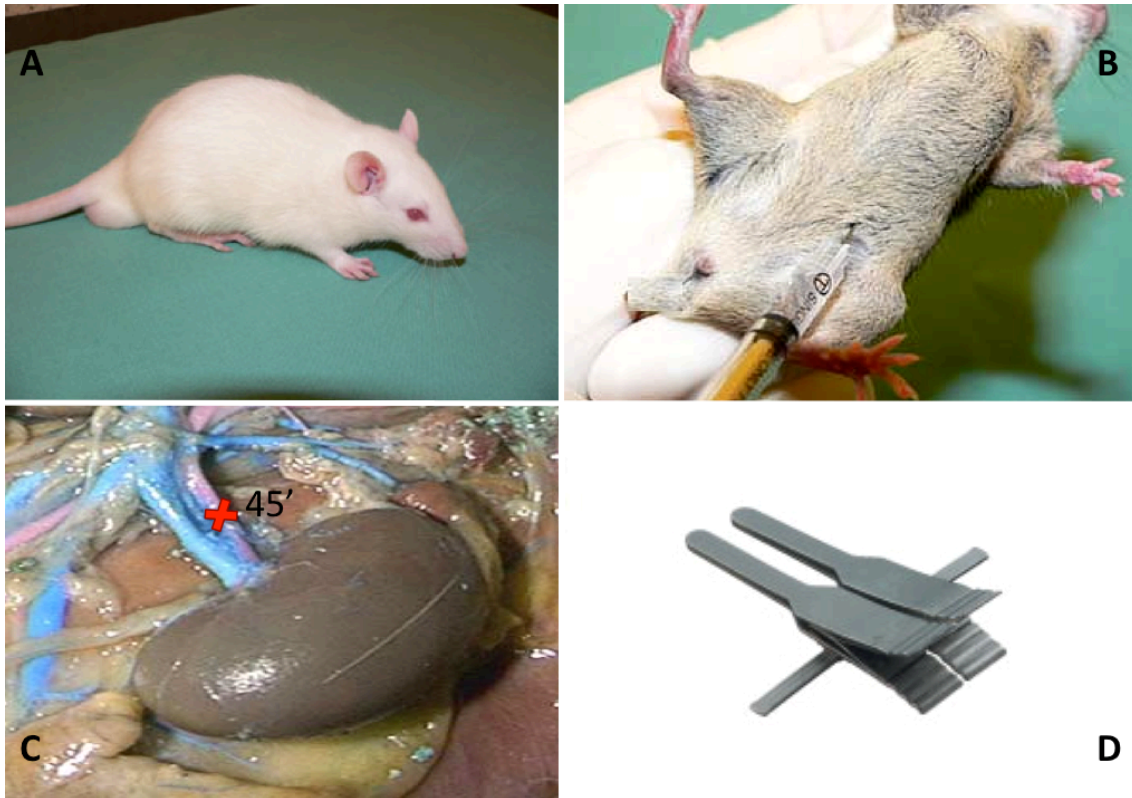


Figura 1. A. Rata Wistar macho. B. Anestesia intraperitoneal. C. Clampaje de arteria renal durante 45 min. D. Clamps microvasculares.

2.1.5. Extracción de muestras y sacrificio de los animales

Cumplido el tiempo de reperfusión correspondiente a cada grupo (4, 24 o 48 h) se extrajo una nueva muestra de sangre y se recogió la orina correspondiente a ese periodo. Acto seguido el animal fue sacrificado, mediante la inyección de pentobarbital sódico e hidroclicloruro de lidocaína, para la obtención de los riñones.

2.2. Procesamiento general de los riñones

El riñón derecho fue diseccionado para separar corteza y médula, y conservado en criotubos a -80°C en un arcón congelador. El riñón izquierdo fue

seccionado transversalmente en tres partes (como muestra la figura 2) y utilizado para el análisis histopatológico e inmunohistoquímico.

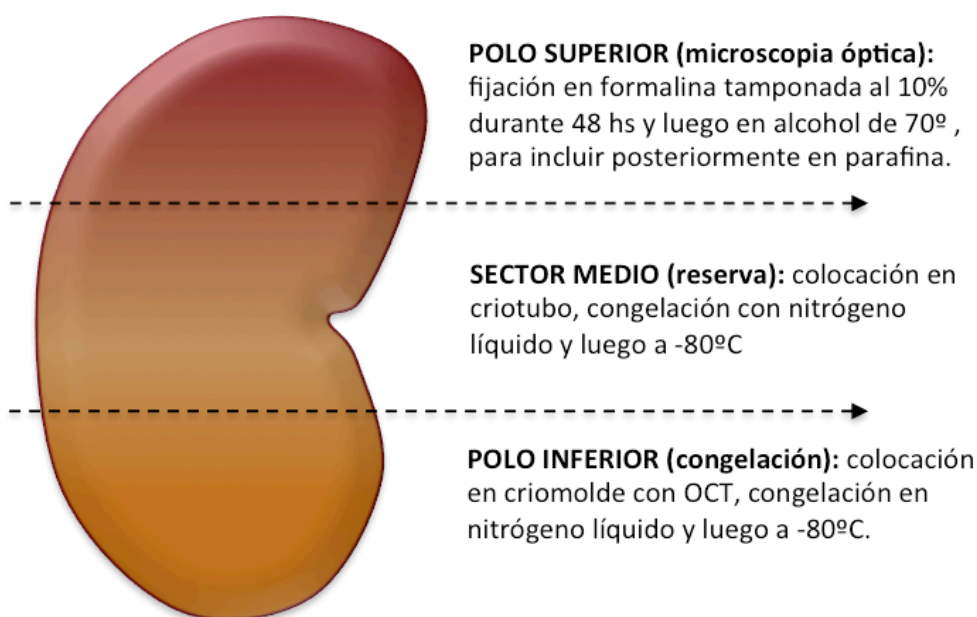


Figura 2. Procesamiento del riñón izquierdo

3. TIPOS DE MUESTRA Y PARÁMETROS EVALUADOS

Se obtuvieron muestras de sangre, orina y tejido renal, en los momentos predeterminados según grupo, para la evaluación de los parámetros que se detallan a continuación.

3.1. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS

3.1.1. *Parámetros metabólicos y de función renal:*

a-Generales: peso y diuresis (mL/100 g de rata).

b- Plasmáticos: electrolitos, urea y creatinina.

c- *Urinarios*: electrolitos, creatinina y proteinuria (mg/mL/ 100 g de rata).

d- *Tisulares*: morfología de la NTA.

3.1.2. Parámetros de estrés oxidativo

a- *Plasmáticos*: malondialdehído (MDA) y glutatión (GSH).

b- *Urinarios*: isoprostanos y peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

c- *Tisulares*: PARP-1, MDA y GSH.

3.1.3. Parámetros de inflamación

a- *Plasmáticos*: IL-6.

b- *Tisulares*: leucocitos totales, monócitos/macrófagos y granulocitos.

3.2. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS

3.2.1. Parámetros de función renal

Los electrolitos, la urea y la creatinina, en plasma y orina, fueron medidos con un auto analizador (Hitachi-912, Roche, España). La proteinuria se determinó utilizando un kit comercial (DC Protein Assay Kit, Vio-Rad, Madrid, España).

3.2.2. Parámetros de estrés oxidativo e inflamación

Malondialdehído (MDA)

Para su cuantificación en plasma y orina se utilizó el método espectrofotométrico del ácido tiobarbitúrico TBARS (Buega y Ajuste, 1978). Muestras de 0.5mL fueron mezcladas con 2 mL de una solución que contenía 15% (p/v) de ácido tricloroacético (TCA), 0.375% (p/v) de ácido tiobarbitúrico (TBA) y ácido clorhídrico (HCl) al 0.25 N, e incubadas a 95°C por 15 min a baño maría. Posteriormente las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente, y

se centrifugaron por 20 min a 2000 rpm. Después de la centrifugación, el sobrenadante fue medido espectrofotométricamente a 532nm.

Para la determinación tisular se siguió el protocolo de Ohanay cols.(1979).Se homogenizaron 50 ug de tejido (corteza o médula) junto con 500 uL de RIPA (Radio-Immunoprecipitation Assay) Buffer frío, durante un par de segundos en un mezclador tipo vórtice, para evitar el calentamiento y la desnaturalización del ADN. Este homogeneizado se introdujo en el Ultrasonido durante siete segundos y luego en hielo otros siete segundos, repitiendo la operación dos veces. Luego se centrifugó durante 10 min a 4°C y a1600 x g. Por último se extrajo el sobrenadante y se leyó su absorbancia a 532 nm en un espectrofotómetro.

Los resultados fueron expresados como nanomoles de sustancias reactivas al TBA (TBARS) producidas por mg de proteína (nmol/mg de proteína), y fueron calculados en base al coeficiente de extinción molar (ϵ) de malondialdehído de $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Glutación (GSH)

La determinación se realizó mediante un kit comercial suministrado por Cayman. Se lavó previamente el tejido a procesar con PBS (pH 7.4), a fin de eliminar restos de células. Se homogenizó el tejido (corteza o médula) junto con MES Buffer frío (relación 1/10, ej. 150 ug tejido + 1,5 uL buffer). Tras centrifugar el homogeneizado a 10.000 x g durante 15 min a 4° C, se recogió el sobrenadante, aproximadamente unos 600 uL, y se mezcló con igual cantidad de MPA (preparación 0,5 g MPA + 5 mL agua destilada) vorteando. Se dejó la muestra 5 min a temperatura ambiente para luego centrifugar nuevamente a 2500 x g

durante 3 min a 4°C. Se recogieron aproximadamente unos 500 uL de sobrenadante y se congeló a -80°C hasta su utilización.

Los resultados se expresaron en nmol/mg de proteína.

Interleuquina 6 (IL-6)

Se realizó la determinación mediante un kit comercial de EIA (R&D systems, Minneapolis, USA). Los resultados se expresaron en pg/mL.

Peróxido de hidrógeno en orina (H₂O₂)

Esta determinación se realizó mediante un Kit comercial de EIA suministrado por Cayman Chemicals Company (USA). Los resultados se expresaron en µmol/100 g de rata.

Isoprostanos en orina

Se utilizó un kit de inmunoensayo enzimático (8-isoprostano EIA Kit Cayman Ann Arbor, MI, EE.UU) para medirlos niveles urinarios de 8-isoprostanos y previamente se purificaron las muestras mediante un kit de purificación de afinidad (Cayman). Los resultados se expresaron en pg/mL.

3.3. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

3.3.1. *Procesamiento de las muestras*

El examen anatomopatológico se realizó con microscopio óptico Olympus modelo BX41 (Olympus Optical Company, Ltd., Tokyo, Japón). Las muestras biológicas para microscopia óptica fueron fijadas en una solución de formalina tamponada al 10% durante 24hs y posteriormente trasvasadas a alcohol etílico de 70% para su posterior inclusión automática en parafina en un procesador

Excelsior ES (Thermo Scientific Kalamazoo, MI). Las tinciones utilizadas para el estudio morfológico convencional fueron: Hematoxilina/eosina (H/E), Ácido Peryódico de Schiff (PAS) y Tricrómico de Masson (TM). La evaluación histopatológica de las lesiones renales se realizó a doble ciego en secciones de 4 µm, utilizando la tinción más adecuada para identificar cada lesión.

3.3.2. Valoración histopatológica de las muestras

3.3.2. a- Necrosis cortical: los cambios típicos de necrosis isquémica consisten, básicamente, en una marcada eosinofilia celular global con preservación de los límites celulares.

3.3.2. b - Túbulos

-Necrosis tubular aguda: Se manifiesta característicamente por edema en la región intersticial acompañado de un escaso infiltrado inflamatorio que no afecta a las células tubulares. Frecuentemente, los túbulos muestran lesiones leves y focales que consisten en dilatación de la luz tubular y adelgazamiento del citoplasma de las células epiteliales tubulares. El borde luminal “en cepillo” de las células tubulares se halla alterado, estando parcial o totalmente ausente. También puede observarse ruptura de la membrana basal y fenómenos de apoptosis en múltiples puntos de la nefrona. A diferencia de la necrosis cortical, no se observa afectación de los glomérulos y vasos. En ocasiones, se pueden apreciar fenómenos de regeneración tubular con aumento del tamaño nuclear y presencia de nucléolo evidente.

3.3.2. c –Criterios de evaluación

La presencia de descamación de células tubulares, la vacuolización de las células tubulares y la NTA fueron calculadas semicuantitativamente sobre una escala de 4 puntos (0: ausencia, 1: leve [$<10\%$ de túbulos, capilares o glomérulos afectados], 2: moderada [$10-25\%$], 3: severa [$>25\%$]). Las otras variables (lesión vascular [arteriopatía hialina], lesión glomerular, apoptosis, glóbulos hialinos, alteración o pérdida del borde en cepillo, cilindros tubulares, y signos regenerativos [mitosis y aumento de la basofilia]) fueron valoradas de forma dicotómica como presencia/ausencia. Fueron también estimadas la presencia de glomerulitis (presencia de dos o más leucocitos por glomérulo), capilaritis (presencia de dos o más leucocitos en capilares peritubulares dilatados) y tubulitis (presencia de dos o más linfocitos en células tubulares).

3.4. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO

El estudio inmunohistoquímico se realizó en colaboración con el Departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de Granada.

3.4.1. *Procedimiento de inmunohistoquímica para muestras incluidas en parafina*

- Montar sobre micrótopo de rotación el bloque de parafina enfriado a 4° C.
- Obtener secciones de tejido en parafina de $3\mu\text{m}$ de espesor.
- Recoger en baño de flotación sobre portaobjetos tratados con silene (Thermo Fisher Scientific) especiales para inmunohistoquímica.
- Secar en estufa a 37° C durante 16 h.

- Introducir las preparaciones en estufa a 60° C hasta el momento de comenzar la técnica (1-3 h a 60 °C).
- Montar sobre los rack específicos.
- *Protocolo de pretratamiento en módulo PT para desenmascaramiento antigénico en muestras parafinadas*
- Este procedimiento incluye la desparafinación, hidratación y desenmascaramiento antigénico por calor en un único paso de las secciones de tejido incluido en parafina.
- Rellenar el tanque con 1500 mL de solución de desparafinación/desenmascaramiento antigénico tampón EDTA pH: 8.0 1x (Master Diagnóstica, Granada, España).
- Programar en el dial del módulo PT (Thermo Fisher Scientific) la temperatura y tiempo de contacto, siempre evitando la ebullición.
- Precalentar el Tampón a 65° C.
- Introducir las preparaciones en el tanque del Módulo PT en los rack específicos colocando hacia abajo los portaobjetos.
- Comenzar el ciclo del Módulo PT: 20 min a 95° C.
- Extraer las preparaciones del Tampón cuando éste se ha enfriado hasta 65° C.
- Impedir que se sequen cubriendo las preparaciones con tampón de lavado.
- Continuar con la técnica de inmunotinción en inmunoteñidor automático (Autostainer 480) (Thermo Fisher Scientific).

- Programar el inmunoteñidor. seleccionando número de portas, protocolo a seguir y anticuerpos a realizar sobre la plantilla que ofrece el programa de ordenador.

3.4.2. Procedimiento inmunohistoquímico basado en polímeros conjugados con peroxidasa

Una vez colocados los portaobjetos de manera horizontal en el orden adecuado, seleccionados los anticuerpos prediluidos, los componentes del kit de visualización y revelado listos para uso se procede al inicio de la técnica inmunohistoquímica automatizada.

Reactivos necesarios:

- Tampón de lavado: Tampón TBS con Tween 20.
- Agua destilada/desionizada.
- Bloqueante de la peroxidasa endógena “listo para uso”
- Anticuerpos prediluidos “listos para uso”.
- Polímero conjugado con peroxidasa que detecta tanto anticuerpos primarios obtenidos en ratón (monoclonales) como en conejo (policlonales).
- Diaminobenzidina (DAB) “lista para uso”.
- Potenciador de la DAB.
- Todos los reactivos fueron adquiridos a Master Diagnóstica (Granada, España).

Procedimiento:

Todo el proceso se desarrolla a temperatura ambiente en el inmunoteñidor.

- Bloqueo de peroxidasa endógena con solución de peróxido de hidrógeno durante 10 min.
- Lavado con TBS Tween 20(un lavado de 1 minuto).
- Eliminación del reactivo por soplado automático sobre el portaobjetos.
- Incubación del anticuerpo primario:

Las secciones tisulares renales se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente con los siguientes anticuerpos: Ac. Policlonal frente a PARP-1 (Thermo Fisher Scientific); Ac. Monoclonal frente a CD45 (clon OX30) (sc-53047 Santa Cruz Biotechnology Inc. Heidelberg, Germany); Ac. Monoclonal frente a CD68 (clone ED1) (sc59103 Santa Cruz Biotechnology Inc.) y anticuerpo policlonal anti-mieloperoxidasa (Máster Diagnóstica, Granada, Spain).

- Lavado con TBS Tween 20.
- Eliminación del reactivo por soplado automático sobre el portaobjetos.
- Incubación con Polímero (anti-mouse+anti-rabbit) conjugado con Peroxidasa (Ultravision Quanto, Master Diagnóstica), durante 10 min.
- Lavado con TBS Tween 20.
- Eliminación del reactivo por soplado automático sobre el portaobjetos.
- Revelado de las muestras con solución DABdurante 5 min.
- Un lavado con agua destilada de 1 minuto.
- Intensificación de la DAB durante 2 min con potenciador listo para uso.
- Lavado con agua destilada.

Se extraen los portaobjetos y colocados en un rack se sumergen para su contraste en:

- Hematoxilina progresiva de Mayer durante 1 min.

- Eliminar el exceso de colorante mediante lavado en agua destilada.
- Lavar con agua del grifo durante 5 min para azulear la hematoxilina.
- Deshidratación con alcoholes de graduación creciente (30°, 70°, 80°, 2 baños de alcohol absoluto), y aclarado con 3 baños de xileno) de 3 min cada uno.
- Montaje de las preparaciones de forma rutinaria con EUKITT (O. Kindler GmbH, Freiburg, Alemania).

3.4.3 Cuantificación de los resultados inmunohistoquímicos

La positividad de la inmunotinción glomerular y tubular para PARP-1 se calculó semicuantitativamente en una escala de 4 (0, ausencia; 1: 1-9% núcleos tubulares positivos; 2: 10-49%; 3: $\geq 50\%$). Secciones renales incubadas con un anticuerpo isotipo IgG y secciones de bazo se utilizaron como controles negativos y positivos, respectivamente.

Se usó una gradilla milimétrica en el ocular de un microscopio BH2 (Olympus Optical Company, Ltd., Tokyo, Japan) con un objetivo de 40x para contar el número de células inflamatorias positivas por mm^2 .

Para cuantificar mediante inmunohistoquímica el número de células inflamatorias, leucocitos totales, monocitos/macrófagos y granulocitos por mm^2 en la corteza renal positivas para CD45, CD68 y MPO, respectivamente, se utilizó un ocular con escala milimetrada aplicada a un microscopio BH2 (Olympus Optical Company, Ltd.) con el objetivo de 40x.

4. MÉTODO DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

El análisis de los datos se realizó mediante la aplicación del programa estadístico IBM-SPSS versión 20.0 para Windows® (SPSS Inc., Chicago, IL). Las variables cuantitativas, plasmáticas, urinarias y tisulares, fueron analizadas con el diseño ANOVA de dos factores (grupos x tiempos) para probar la interacción grupo x tiempo. Cuando se obtuvo un resultado significativo se usó el test “post-hoc” de Tukey para hacer comparaciones por pares. Los datos fueron transformados logarítmicamente para alcanzar la normalidad y homogeneidad de las varianzas. Dado que los datos no seguían una distribución normal, se utilizó el test de Kruskal-Wallis para detectar diferencias en los puntajes histológicos y los datos inmunohistoquímicos entre los grupos, para cada uno de los tiempos, seguido de comparaciones por pares (test de Tukey) cuando el resultado fue significativo. Una $p < 0.05$ fue considerada significativa en todos los tests.

IV. RESULTADOS

1. VARIABLES METABÓLICAS GENERALES

El volumen de diuresis fue significativamente mayor en los grupos con tiempo de reperfusión superior, en relación directa a un mayor consumo de agua, aunque sin encontrar diferencias significativas entre los grupos precondicionados con la hormona tiroidea y los que recibieron placebo para un mismo tiempo de reperfusión. A las 4 h de la reperfusión los grupos a los que se les indujo la isquemia/reperfusión (tanto precondicionados como no) orinaron significativamente más que sus respectivos controles (SO). Sin embargo, el volumen de diuresis de ambos grupos I/R fue menor que la de los controles SO tanto a las 24 como a las 48 h de la reperfusión.

El peso de los animales fue bastante similar en todos los grupos, sin encontrarse diferencias significativas entre los mismos (tabla 1).

Tabla 1. Peso y diuresis de los animales

	Periodo de reperfusión (h)	SO-P	SO-T ₃	IR-P	IR-T ₃
Diuresis (mL/100g rata)	4	0,74±0,27	0,60±0,47	0,98±0,79*	0,98±0,72†
	24	7,36±3,46	6,71±3,05	5,56±1,85*	5,37±2,21†
	48	8,32±2,64	8,01±2,95	6,85±2,84*	6,81±2,63†
Peso (g)	4	292,07±8,15	292,98±7,17	300,27±8,7	297,05±8,91
	24	286,34±5,4	288,17±8,3	293,45±8,68	285,75±5,48
	48	300,86±8,18	301,85±8,3	298,6±8,25	300,59±7,21

SO-P=sham-operated, tratadas con placebo; SO-T₃= sham-operated, tratadas con T₃ (100 µg/kg); IR-P= isquemia-reperfusión, tratadas con placebo; IR-T₃= isquemia-reperfusión, tratadas con T₃. Los datos se expresan como media ± E.E.M., n= 10 en cada grupo. * p<0.01, ** p<0.001 comparada con el grupo SO-P. † p<0.01, ‡ p<0.001 comparada con el grupo SO-T₃. ‡ p<0.01, †† p<0.001 comparada con el grupo IR-P.

2. VARIABLES BIOQUÍMICAS EN PLASMA Y ORINA

Cómo se observa en la tabla 2, los niveles de creatinina plasmática fueron más altos en los grupos de isquemia/reperfusión precondicionados con placebo que en las ratas control (SO), a las 4, 24 y 48 h de la reperfusión. El grupo I/R pretratado con triyodotironina mostró una marcada reducción en la creatinina plasmática a las 48 h de reperfusión, en comparación con el grupo IR-P, siendo su valor similar al observado en ambos grupos SO (tratados con T₃ y no tratados). Encontramos similares resultados para los niveles de urea plasmática.

El aclaramiento de creatinina (ClCr), conforme a los niveles plasmáticos de creatinina, fue más baja en el grupo IR-P que en los grupos SO a las 4, 24, y 48 h de la reperfusión. En el grupo IR-T₃ a las 48 h de reperfusión los valores de aclaramiento alcanzaron niveles similares a los de los grupos SO.

La proteinuria fue mayor en ambos grupos I/R que en los controles a las 4, 24, y 48 h de reperfusión, pero se redujo a la mitad por la administración de triyodotironina en todos los tiempos de reperfusión, aunque sin llegar nunca a valores normales.

Tabla 2. Variables de función renal

	Periodo de reperusión (h)	SO-P	SO-T ₃	IR-P	IR-T ₃
Creatinina (mg/dl)	4	0,28±0,05	0,27±0,03	0,77±0,21**	1,03±0,33† †
	24	0,25±0,05	0,22±0,04	0,45±0,16**	0,62±0,21† †
	48	0,27±0,03	0,26±0,02	0,52±0,06**	0,28±0,04 ‡ ‡
Urea (mg/dl)	4	27,9±4,6	31,1±5,6	49,4±4,7**	61,7±7,8† †
	24	24,1±4,8	23,1±3,3	43,2±12,7**	68,1±14,3† †
	48	28,2±3,4	29,6±3,3	42,9±2,2**	35,4±3,6† † ‡
Proteinuria (mg/mL/100g rata)	4	0,43±0,11	0,47±0,11	5,41±0,38**	3,71±0,44† † ‡
	24	0,47±0,09	0,38±0,08	4,22±0,75**	1,81±0,44† † ‡
	48	0,36±0,1	0,32±0,04	2,79±0,26**	1,22±0,13† † ‡
CICr (mL/min/100g rata)	4	0,62±0,14	0,54±0,17	0,35±0,31**	0,15±0,13† †
	24	0,78±0,17	0,68±0,14	0,39±0,08**	0,35±0,09† †
	48	0,58±0,08	0,58±0,06	0,22±0,09**	0,57±0,15 ‡ ‡

CICr= aclaramiento de creatinina; SO-P=sham-operated, tratadas con placebo; SO-T₃= sham-operated, tratadas con T₃ (100 µg/kg); IR-P= isquemia-reperusión, tratadas con placebo; IR-T₃= isquemia-reperusión, tratadas con T₃. Los datos se expresan como media ± E.E.M., n= 10 en cada grupo. * p<0.01, ** p<0.001 comparada con el grupo SO-P. †p<0.01, † †p<0.001 comparada con el grupo SO-T₃. ‡p<0.01, ‡ ‡p<0.001 comparada con el grupo IR-P.

3. VARIABLES DE ESTRÉS OXIDATIVO E INFLAMACIÓN

Los niveles plasmáticos de GSH fueron más bajos en los grupos pretratados con triyodotironina (IR-T₃ y SO-T₃) que en los que recibieron placebo (IR-P y SO-P) a las 4 h de la reperusión; a las 24 h los niveles fueron similares entre todos los grupos; y fueron más bajos en el grupo IR-P y más altos en el grupo IR-T₃, que en cualquiera de los grupos controles (SO) a las 48 h de la reperusión (Fig. 1).

Resultados

Los valores de MDA plasmático fueron más elevados en los grupos I/R que en los grupos SO, y se redujeron de forma significativa por el preconditionamiento de triyodotironina en todos los tiempos de reperfusión, observando la mayor reducción a las 48 h (Fig. 1).

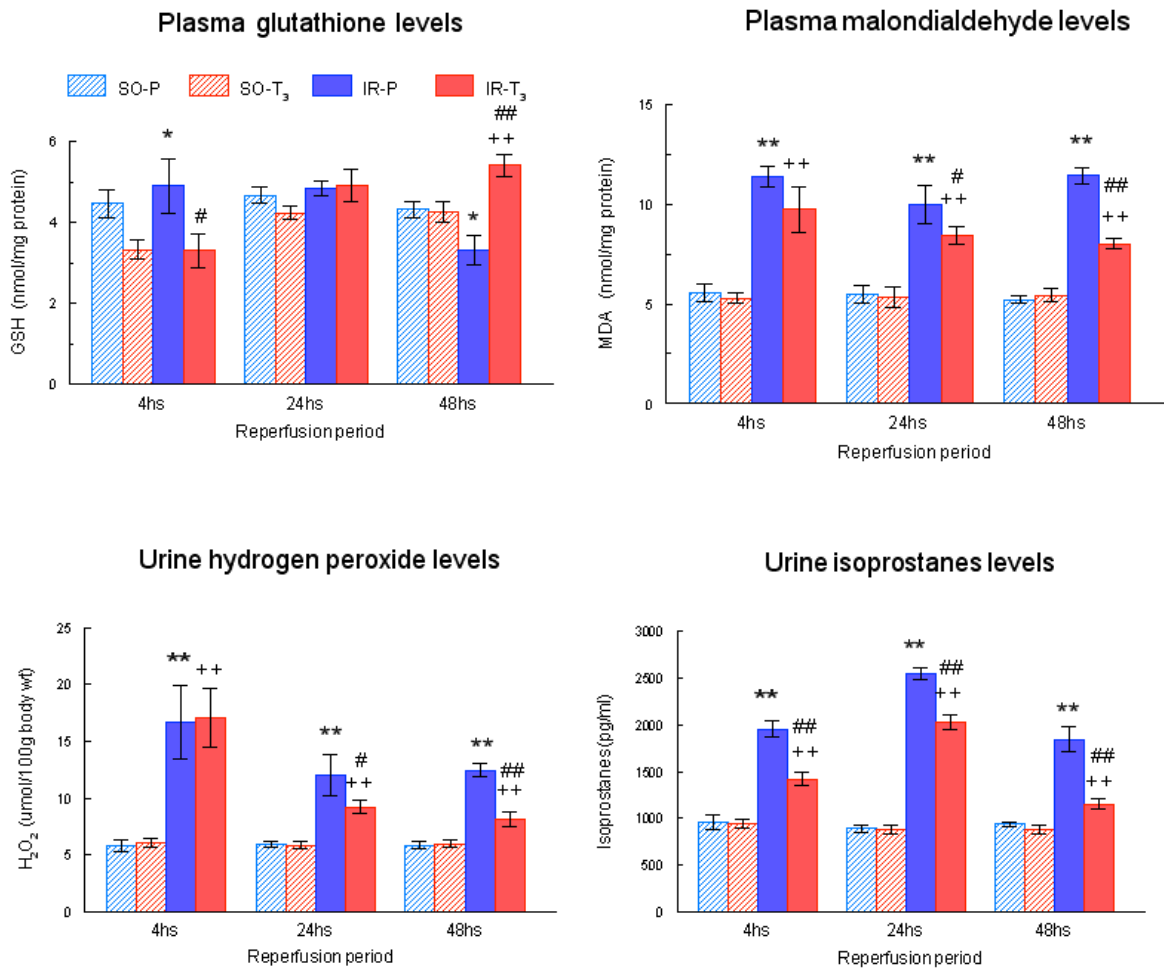


Figura 1. Niveles plasmáticos de glutatión y MDA, y excreción urinaria total de peróxido de hidrógeno e isoprostanos. (Paneles superiores) Niveles plasmáticos de glutatión y MDA, y (paneles inferiores) excreción urinaria total de peróxido de hidrógeno e isoprostanos en los grupos experimentales (n= 10 en cada grupo); SO-P= sham-operated, tratadas con placebo; SO-T₃= sham-operated, tratadas con T₃ (100 µg/kg); IR-P= ischemia-reperfusion, tratadas con placebo; IR-T₃= ischemia-reperfusion, tratadas con T₃. Los datos se expresan como media ± E.E.M. *p<0.05, **p<0.001 versus grupo SO-P. +p<0.01, ++p<0.001 versus grupo SO-T₃. #p<0.05, ##p<0.001 versus grupo IR-P.

Los niveles plasmáticos de IL-6 también fueron mayores en los grupos I/R que en los grupos SO, y disminuyeron por el tratamiento con T₃ a las 24 y 48 h de la reperfusión, con la mayor reducción a las 48 h (Fig. 2).

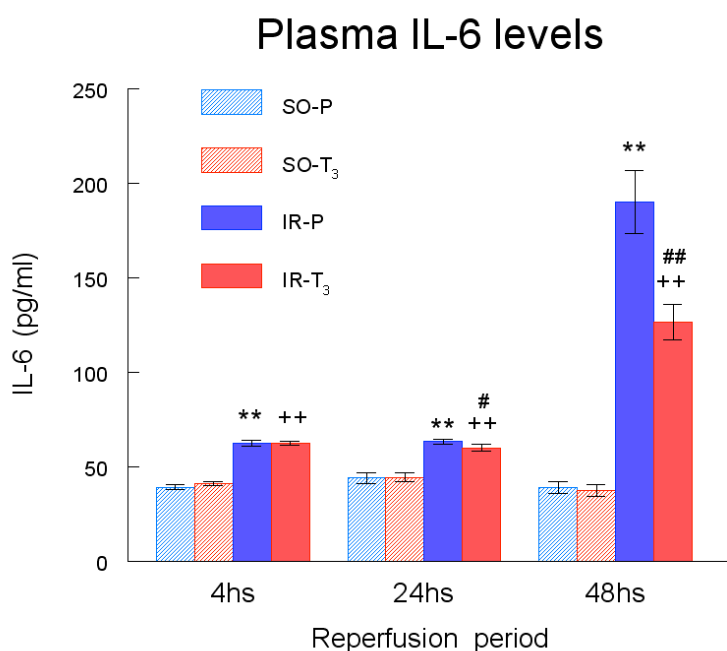


Figura 2. Niveles plasmáticos de IL-6 en los grupos experimentales. (n= 10 en cada grupo): SO-P=sham-operated, tratadas con placebo; SO-T₃= sham-operated, tratadas con T₃ (100 µg/kg); IR-P= isquemia-reperfusión, tratadas con placebo; IR-T₃= isquemia-reperfusión, tratadas con T₃. Los datos se expresan como media ± E.E.M. ** p<0.001 versus grupo SO-P. ++p<0.001 versus grupo SO-T₃. #p<0.05, ##p<0.001 versus grupo IR-P.

Al igual que los resultados obtenidos para las variables de estrés oxidativo en plasma, los niveles urinarios de isoprostanos y peróxido de hidrógeno fueron más altos en ambos grupos de I/R que en los grupos SO, y se redujeron significativamente por el tratamiento con triyodotironina a todas las horas de reperfusión, observándose la mayor reducción a las 48 h, a excepción del peróxido de hidrógeno, el cual no se redujo a las 4 h (Fig. 1).

Resultados

Los niveles tisulares de glutación (en corteza y médula) fueron similares en todos los grupos a las 4 h de la reperfusión, pero se incrementaron en los grupos I/R a las 24 h, siendo mayores en el grupo IR-T₃ que en el IR-P o que en cualquiera de los grupos SO a las 48 h (Fig. 3). Los valores de MDA tisular (en corteza y médula) se incrementaron en el grupo IR-P a las 24 y 48 h de la reperfusión, y esta elevación se atenuó de forma muy marcada en el grupo IR-T₃ (Fig. 3).

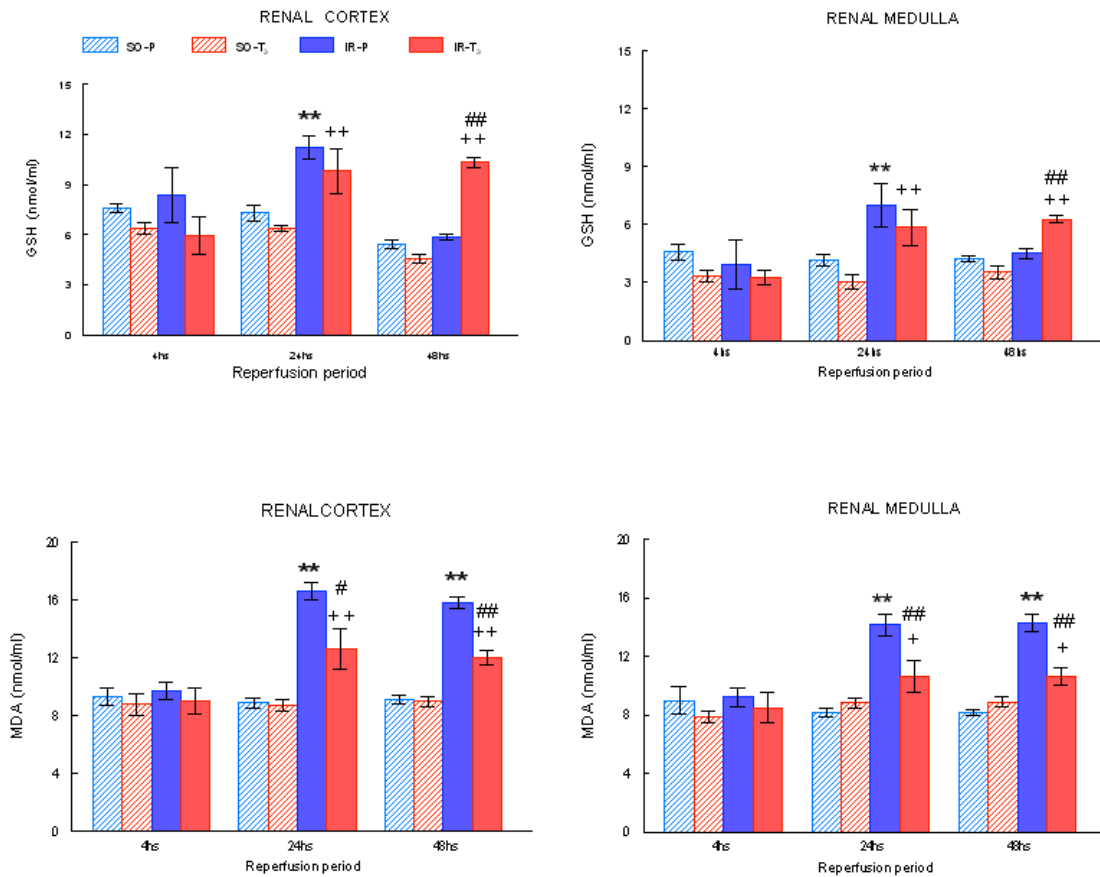


Figura 3. Niveles renales de glutación y MDA en los grupos experimentales. (n= 10 en cada grupo): SO-P=sham-operated, tratadas con placebo; SO-T₃= sham-operated, tratadas con T₃ (100 µg/kg); IR-P= ischemia-reperfusion, tratadas con placebo; IR-T₃= ischemia-reperfusion, tratadas con T₃. Los datos se expresan como media ± E.E.M. ** p<0.001 versus grupo SO-P. +p<0.05, ++p<0.001 versus grupo SO-T₃. #p<0.05, ###p<0.001 versus grupo IR-P.

4. HISTOPATOLOGÍA Y RESULTADOS INMUNOHISTOQUÍMICOS

La expresión de PARP-1 fue elevada en ambos grupos I/R a todas las horas de reperfusión, mostrando los niveles más altos a las 24 h de reperfusión, aunque el grupo IR-T₃ presentó valores significativamente más bajos tanto a las 24 como a las 48 h (Figs. 4 y 5).

La extensión y la intensidad de la expresión tubular nuclear de PARP-1 coincidió con la presencia de necrosis tubular aguda (Fig. 6). La expresión de PARP-1 fue elevada en los grupos I/R a todas las horas de reperfusión y se redujo de forma significativa en los animales tratados con triyodotironina a las 48 h (Figs. 4 y 7).

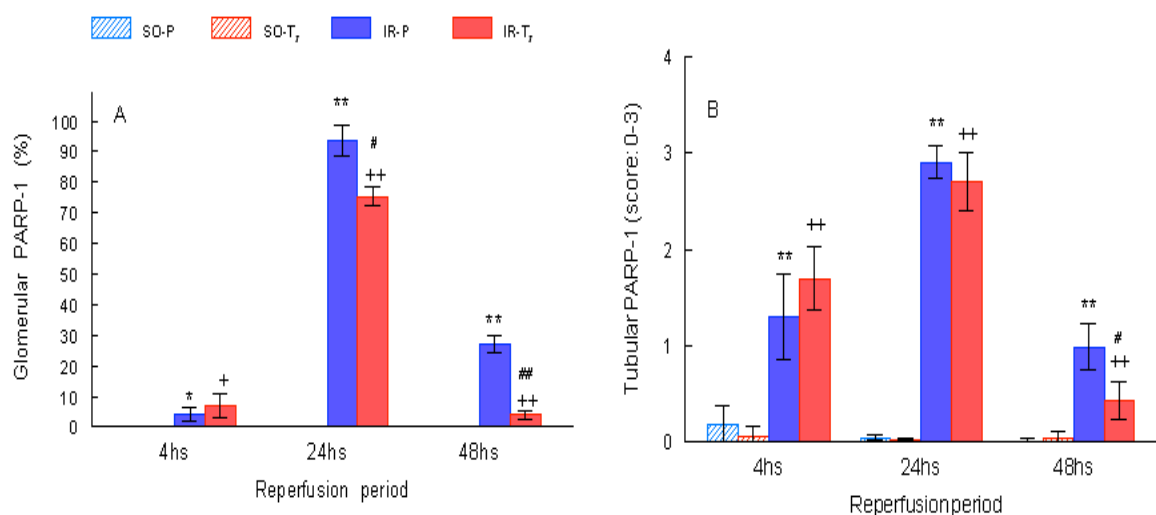


Figura 4. Expresión glomerular (A) y tubular (B) de PARP-1 en los grupos experimentales. (n= 10 en cada grupo): SO-P=sham-operated, tratadas con placebo; SO-T₃= sham-operated, tratadas con T₃ (100 µg/kg); IR-P= ischemia-reperfusion, tratadas con placebo; IR-T₃= ischemia-reperfusion, tratadas con T₃. Los datos se expresan como media ± E.E.M. * p<0.05, ** p<0.001 versus grupo SO-P. + p<0.05, ++p<0.001 versus grupo SO-T₃. #p<0.05, ##p<0.001 versus grupo IR-P.

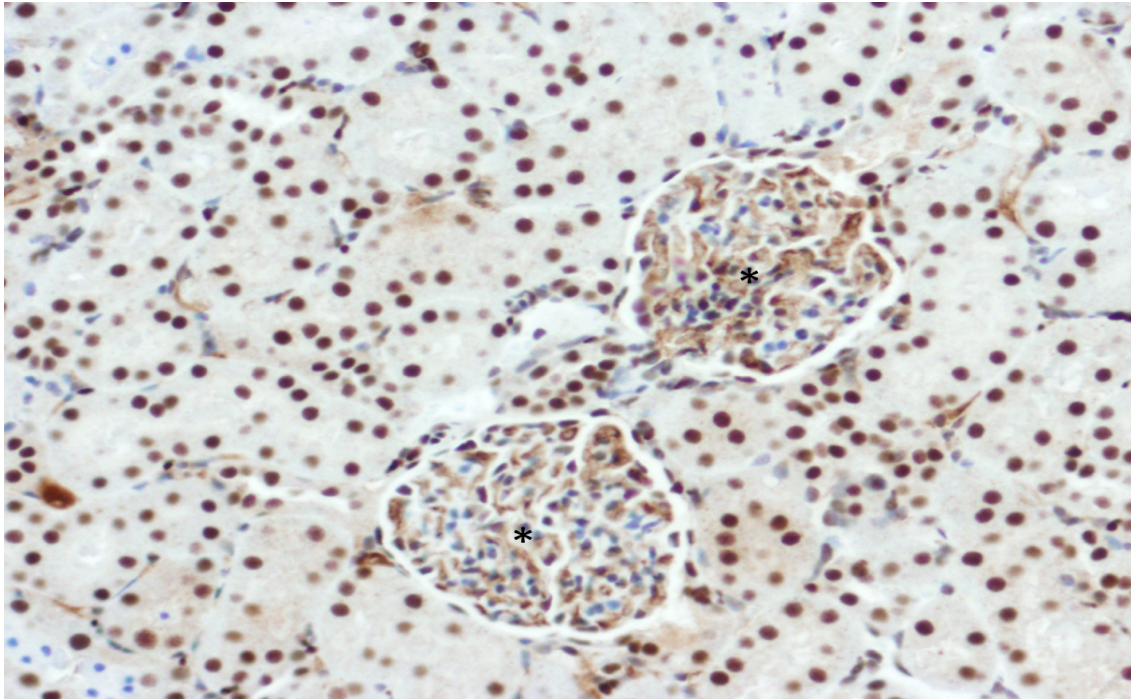


Figura 5. Microfotografía representativa del estudio inmunohistoquímico de la expresión de PARP-1 en la corteza renal de ratas Wistar macho pretratadas con placebo después de 24 h de isquemia-reperfusión. Positividad de PARP-1 a nivel glomerular (asteriscos).

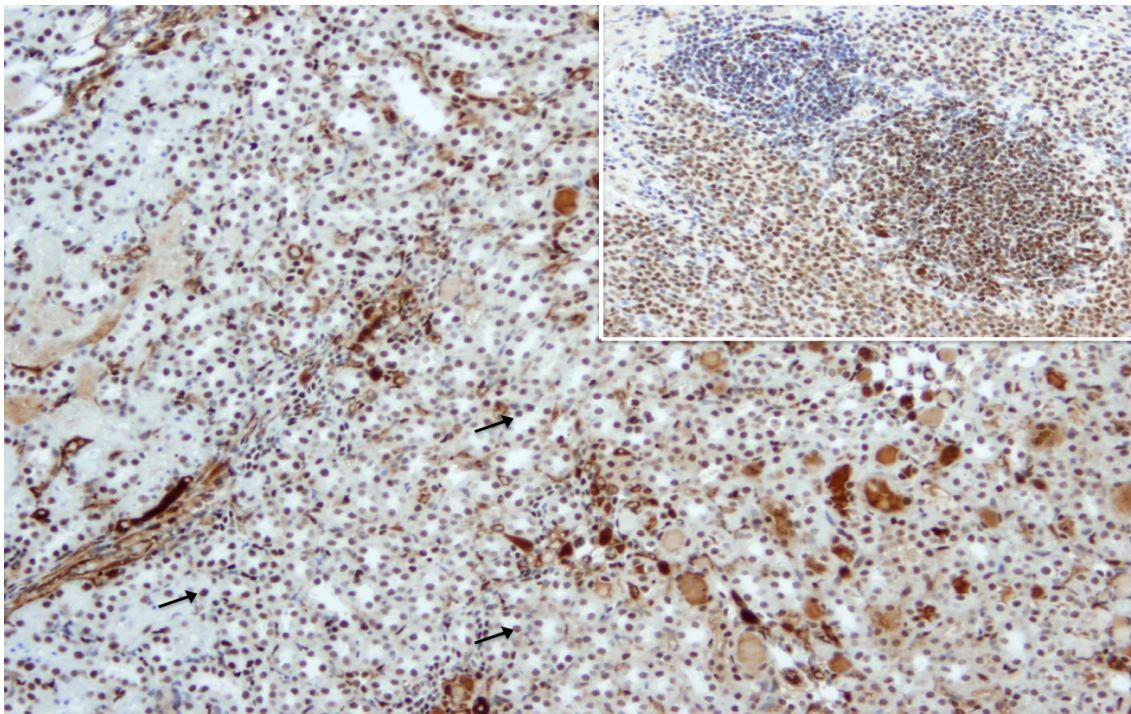


Figura 6. Microfotografía representativa del estudio inmunohistoquímico de la expresión de PARP-1 en la corteza renal de ratas Wistar macho pretratadas con placebo después de 24 h de isquemia-reperfusión. Positividad de PARP-1 a nivel tubular con una intensidad grado 3 (flechas). En el panel superior derecho se observa el control positivo utilizado correspondiente a una biopsia de bazo.

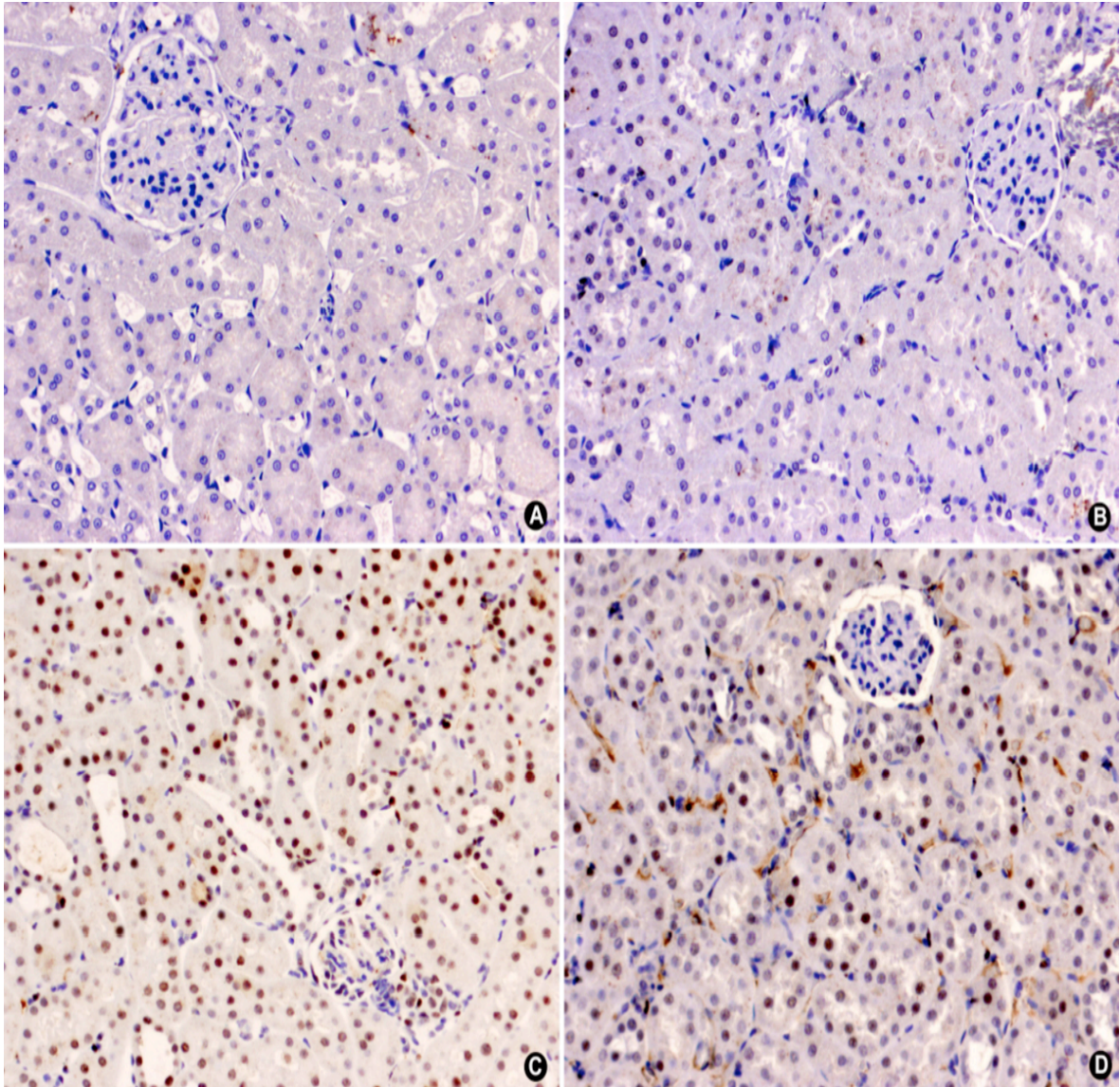


Figura 7. Microfotografía representativa del estudio inmunohistoquímico de la expresión de PARP-1 en la corteza renal de ratas Wistar macho después de 48 h de isquemia-reperfusión. Ausencia de expresión nuclear en los grupos SO-P (A) y SO-T₃ (B). El grupo IR-P (C) muestra una intensa expresión nuclear (depósitos marrones) en >80% de las células tubulares. El grupo IR-T₃ (D) muestra una moderada expresión nuclear en <20% de las células tubulares (micro polímero de peroxidasa conjugado, magnificación original x20).

La extensión y la intensidad de la NTA estuvo directamente relacionada con la duración del tiempo de reperfusión en los grupos I/R, y se redujeron significativamente en el grupo IR-T₃ a las 48 h (Figs. 8 y 9).

Resultados

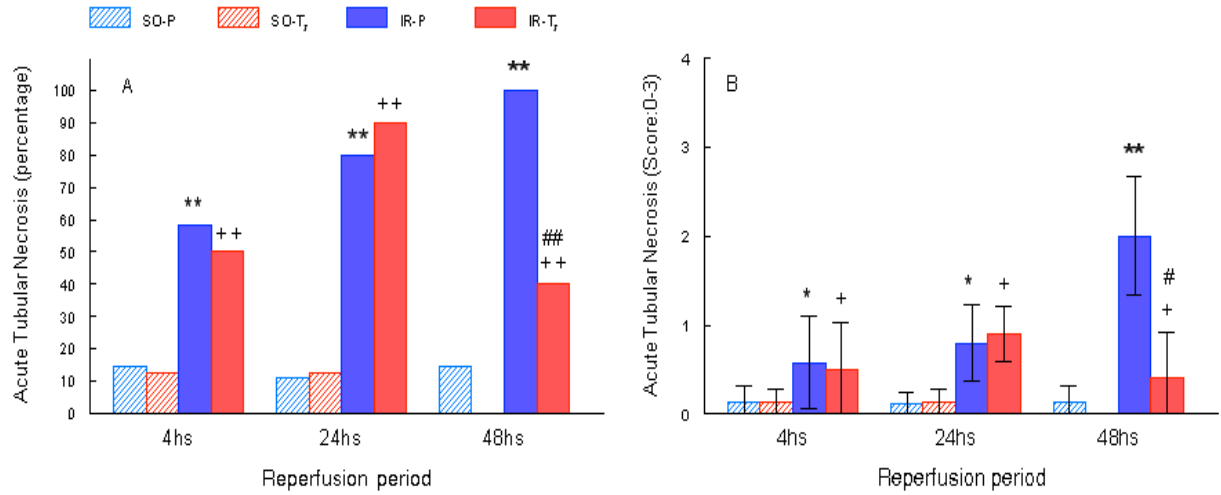


Figura 8. Porcentaje (A) y score (B) de la necrosis tubular aguda en los grupos experimentales. (n= 10 en cada grupo): SO-P=sham-operated, tratadas con placebo; SO-T₃= sham-operated, tratadas con T₃ (100 µg/kg); IR-P= isquemia-reperfusión, tratadas con placebo; IR-T₃= isquemia-reperfusión, tratadas con T₃. Los datos se expresan como media ± E.E.M. * p<0.05, ** p<0.001 versus grupo SO-P. + p<0.05, ++p<0.001 versus grupo SO-T₃.#p<0.01 versus grupo IR-P.

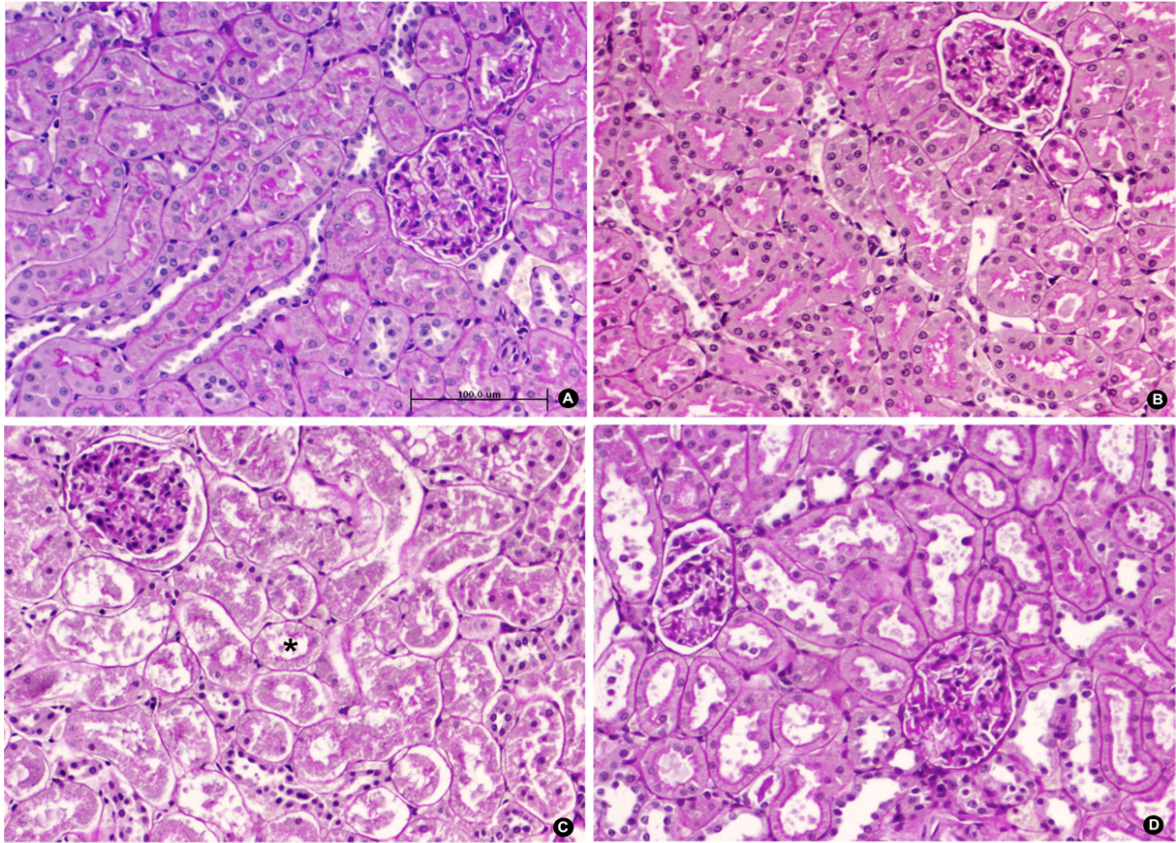


Figura 9. Microfotografía representativa de los cambios morfológicos en el parénquima renal de ratas Wistar macho después de 48 h de ischemia-reperfusión. Ausencia de daño glomerular o tubular en las secciones renales de ratas en los grupos SO-P (A) y SO-T3 (B). Las ratas expuestas a ischemia-reperfusión renal bilateral pretratadas con placebo, IR-P (C), muestran una intensa necrosis tubular aguda (asterisco) con severa descamación de las células epiteliales de la membrana basal, pérdida del borde en cepillo y cilindros intratubulares. El grupo IR-T3 (D) muestra una necrosis tubular leve y moderada descamación de células tubulares (PAS, magnificación original x20).

Las biopsias renales del grupo I/R pretratado con placebo mostraron áreas de intensa necrosis tubular aguda y grandes zonas de infarto a las 48 h de la reperfusión (Figs. 10 y 11).

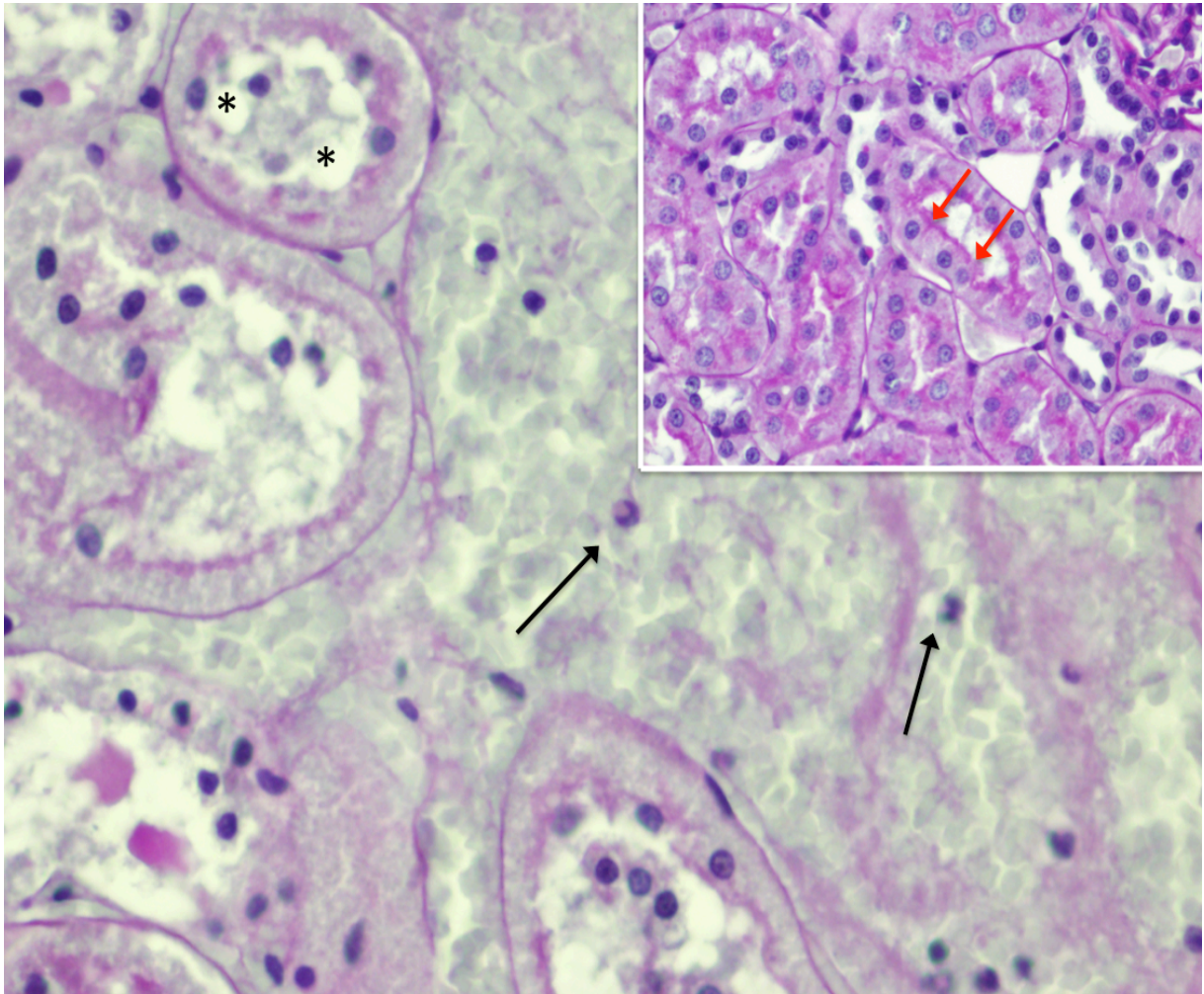


Figura 10. Microfotografía representativa de los cambios morfológicos en el parénquima renal de ratas Wistar macho pretratadas con placebo (IR-P) a las 48 h de la reperfusión. Se observan áreas de intensa necrosis tubular (flechas negras) y zonas de degeneración vacuolar (asteriscos). En el panel superior derecho se muestra el aspecto de túbulos normales, con conservación del borde en cepillo (flechas rojas).

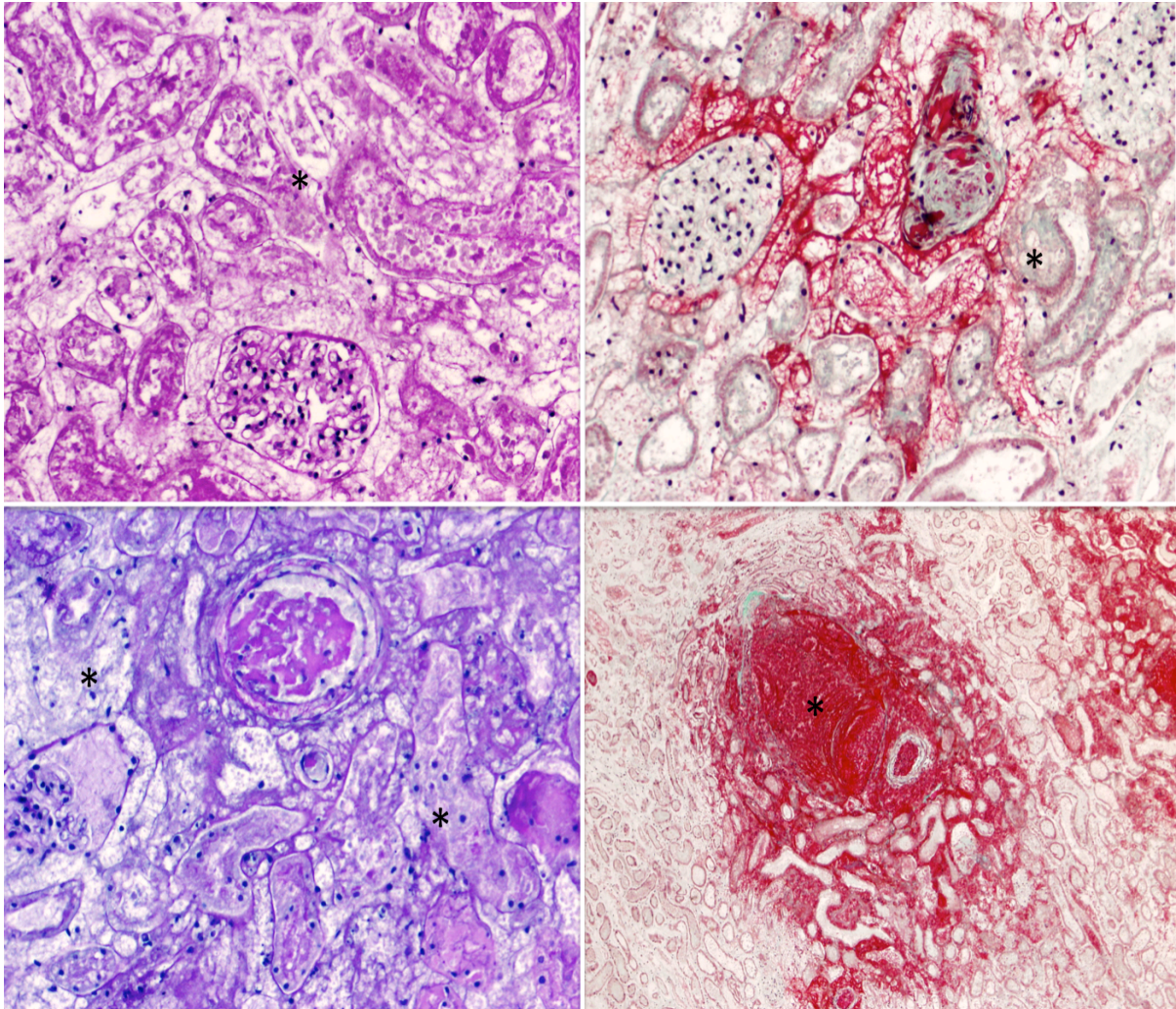


Figura 11. Microfotografía representativa de los cambios morfológicos en el parénquima renal de ratas Wistar macho pretratadas con placebo (IR-P) a las 48 h de la reperusión. Las ratas expuestas a isquemia-reperusión renal bilateral pretratadas con placebo, IR-P, muestran una intensa necrosis tubular aguda con grandes zonas de infarto (asteriscos). Tricrómico de Masson, magnificación original x20.

Se constató arteriopatía hialina grado 1 (presencia de hialina sin oclusión patente de luces en menos del 50% de las arteriolas) en los grupos I/R tanto a las 24 como a las 48 h de reperusión, sin hallar diferencias significativas entre el grupo pretratado con placebo y el pretratado con T₃ (Fig. 12).

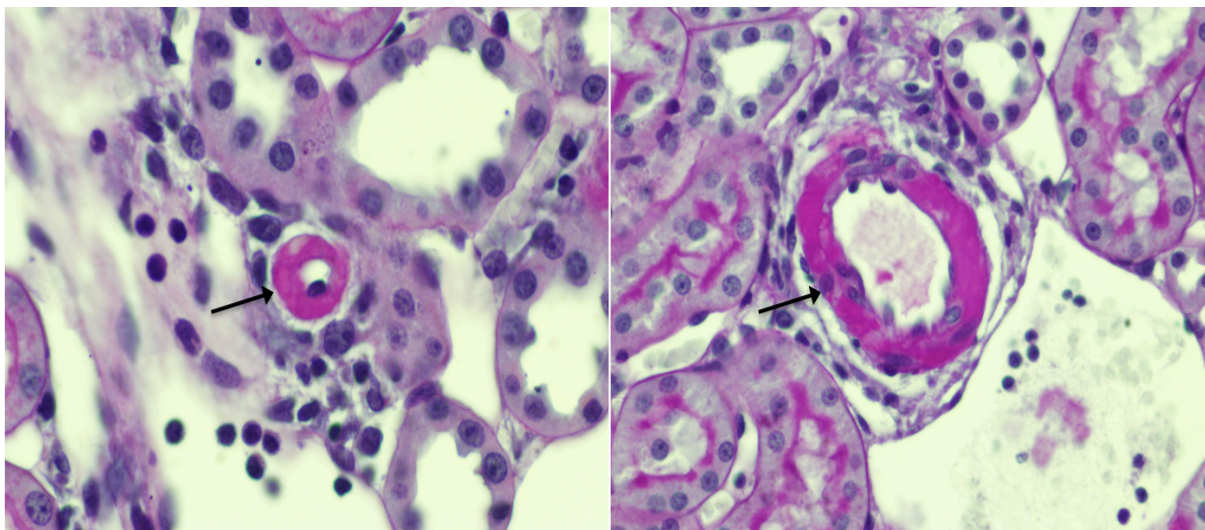


Figura 12. Microfotografía representativa de la arteriopatía hialina (flechas negras).

A las 48 h de la reperfusión, se observaron cambios regenerativos en el 80% de las ratas del grupo IR-T₃ *versus* un 20% en el grupo IR-P, detectándose hiperemia renal cortical y medular en los grupo pretratados con triyodotironina (43% en cada grupo). La extensión de los cilindros tubulares fue moderada (30%) en el grupo IR-T₃ y moderada/severa (60%) en el grupo IR-P (Fig. 13). No se observaron otras diferencias morfológicas entre los cuatro grupos (SO-P, SO-T₃, IR-P e IR-T₃).

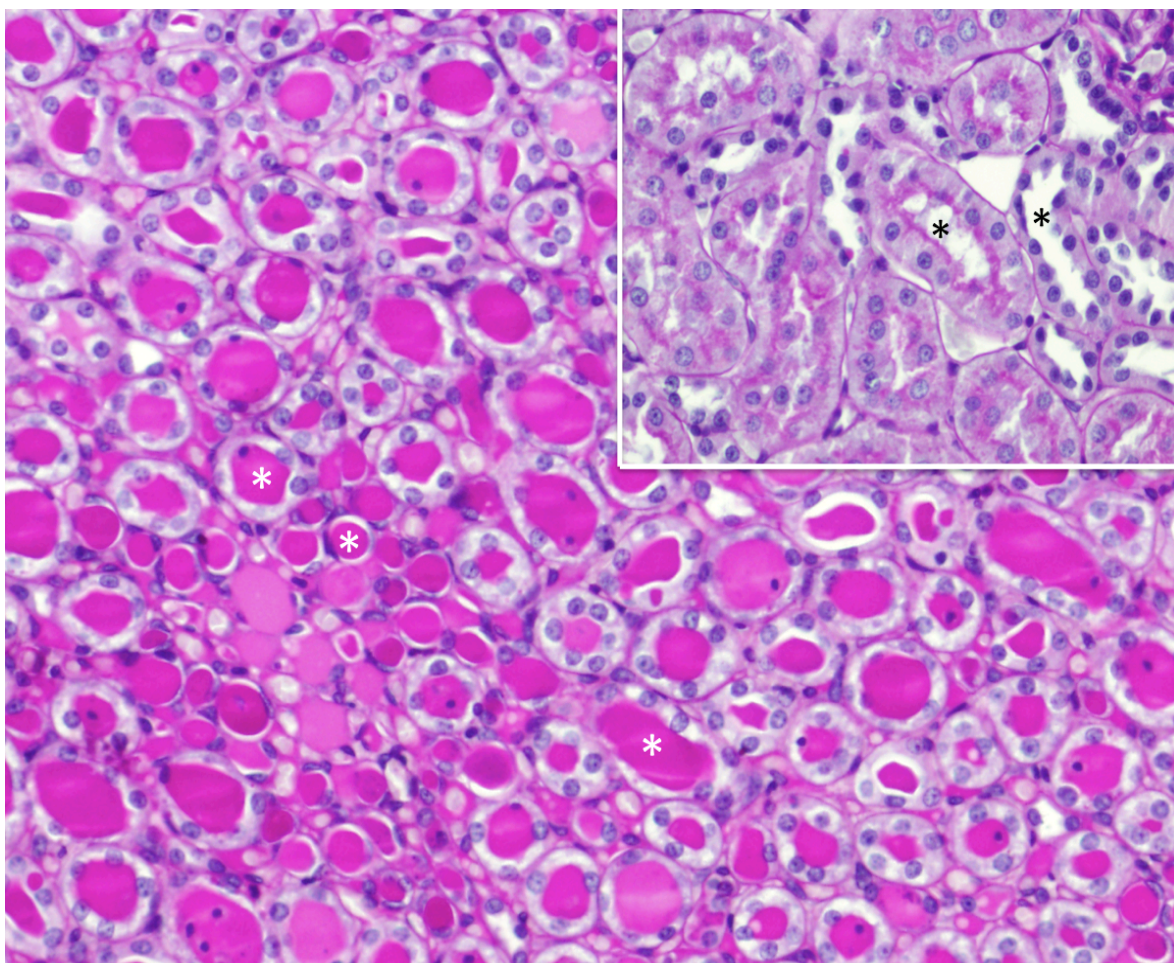


Figura 13. Microfotografía representativa de los cambios morfológicos en el parénquima renal de ratas Wistar macho pretratadas con placebo (IR-P) a las 48 h de la reperusión. Se observan abundantes cilindros intratubulares PAS+ (asteriscos blancos). En el panel superior derecho comparativa de luces tubulares normales (asteriscos negros).

No se encontraron diferencias en el infiltrado inflamatorio túbulo-intersticial (leucocitos CD45-positivos totales y macrófagos CD68-positivos) entre los grupos a ninguna hora de reperusión (4, 24 o 48 h). El número de granulocitos mieloperoxidasa-positivos fue también similar entre los cuatro grupos (tabla 3, Figs. 14 y 15).

Tabla 3. Evaluación de biopsias renales y cuantificación del infiltrado inflamatorio en los grupos de ratas control e isquemia/reperfusión a diferentes tiempos.

	Capilaritis	Tubulitis	Glomerulitis	CD45/mm ²	CD68/mm ²	PMN/mm ²
Control4h	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	16.06±5.3	12.62±4.4	6.08±0.5
IR- T ₃ 4h	0.50±0.5 [†]	0.04±0.5	0.30±0.4	23.99±10.1	22.08±14.5	8.14±0.8
IR-P 4h	0.25±0.4	0.08±0.2	0.0±0.0	21.97±8.3	14.26±6.4	8.56±0.6
Control24h	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	48.39±18.6	41.13±13.9	10.40±4.6
IR- T ₃ 24h	0.20±0.4	0.0±0.0	0.50±0.5	18.55±6.2 [†]	26.61±13.2	12.90±5.1.
IR-P 24h	0.40±0.5*	0.10±0.3	0.30±0.4*	11.60±3.6*	12.90±3.8*	12.09±5.5
Control 48h	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	21.36±3.3	20.96±5.7	8.06±3.9
IR- T ₃ 48h	0.50±0.7 [†]	0.0±0.0	0.0±0.0	24.19±9.7	32.09±19.5	12.72±14.5
IR-P 48h	0.50±0.5*	0.10±0.3	0.11±0.3	21.97±8.3	23.99±9.6	15.12±8.1

Control: ratas sham-operated tratadas con placebo (SO-P)+sham-operated tratadas con T₃ (SO-T₃); IR-P= isquemia-reperfusión, tratadas con placebo; IR-T₃= isquemia-reperfusión, tratadas con T₃. Los datos se expresan como media ± E.E.M. * p<0.05 IR-P vs. controles; [†] p<0.05 IR- T₃ vs. controles. U-Test de Mann Whitney.

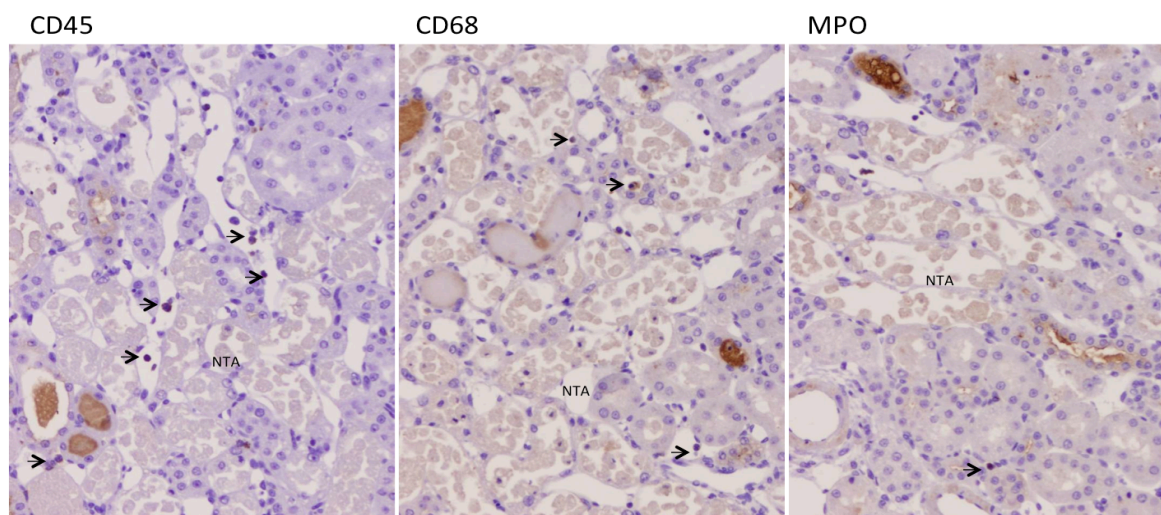


Figura 14. Infiltrado inflamatorio túbulo intersticial. Leucocitos CD45-positivos totales, macrófagos CD68-positivos y granulocitos mieloperoxidasa (MPO) positivos.

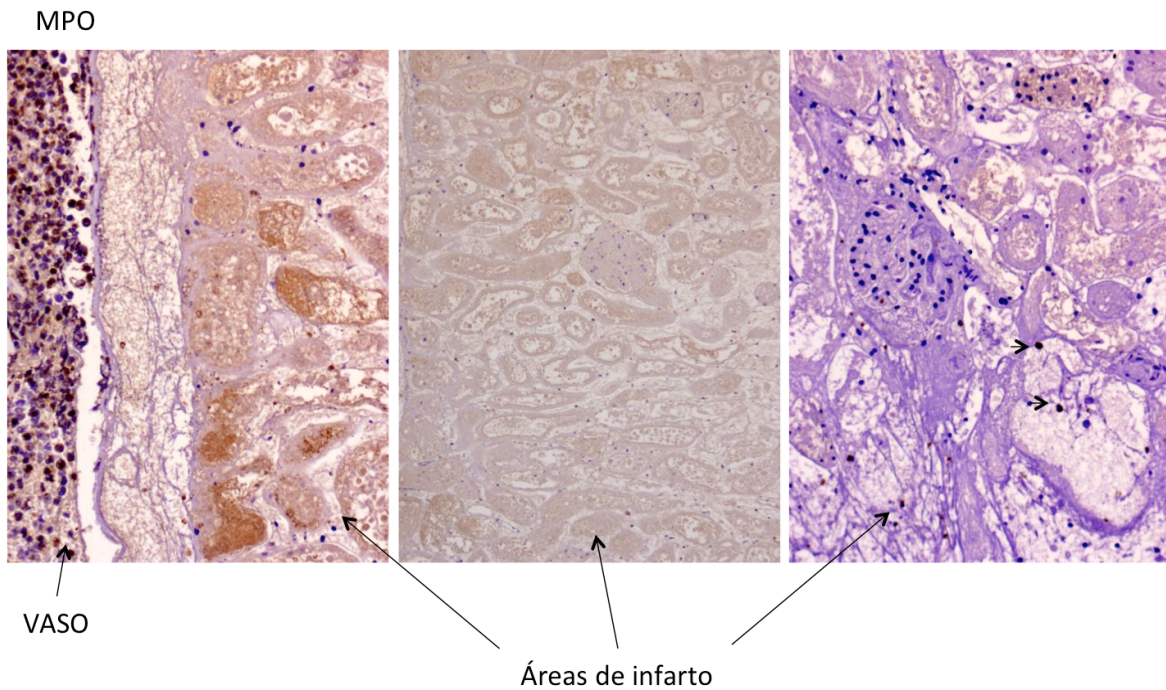


Figura 15. Infiltrado de granulocitos mieloperoxidasa positivos

5. CORRELACIONES ENTRE NTA Y VARIABLES DE FUNCIÓN RENAL, INFLAMACIÓN Y ESTRÉS OXIDATIVO

Comparamos los parámetros de función renal, inflamación y estrés oxidativo, en sangre, orina y tejido renal, entre los animales que presentaban NTA y los que no la presentaban, así como también con el grado de necrosis; independientemente del grupo al que pertenecieran las ratas.

5.1. PRESENCIA DE NECROSIS TUBULAR

5.1.1. Presencia de NTA y variables de función renal

Como se observa en la tabla 4, los animales con NTA presentaron valores significativamente mayores de creatinina plasmática y proteinuria, con respecto a aquellos sin necrosis tubular.

Tabla 4. Comparación de parámetros de función renal, inflamación y estrés oxidativo en riñones con NTA vs riñones sin NTA

	NO NTA	SI NTA
Creatinina (mg/dl)	0.27	0.49*
Proteinuria (mg/mL/100g peso)	0.46	2.76*
IL-6 (pg/mL)	63.43	134.99
MDA plasma (nmol/mg proteína)	5.56	10.148*
GSH plasma (nmol/mg proteína)	4.31	4.53
MDA cortical (nmol/mg proteína)	9.07	12.88*
MDA medular (nmol/mg proteína)	8.67	11.6045*
GSH cortical (nmol/mg proteína)	6.6	7.35
GSH medular (nmol/mg proteína)	4	4.689*
PARP-1 tubular intensidad (score 0-3)	0	1.3*
PARP-1 tubular extension (score 0-3)	0	3*
Peróxido de hidrógeno en orina (umol/100g peso)	6.13	11.75*
Isoprostanos en orina (pg/mL)	950	1875*

NO NTA= ratas sin necrosis tubular aguda; SI NTA= ratas con necrosis tubular aguda. Los datos se expresan como medianas. * $p < 0.05$ SI NTA vs. NO NTA. U-Test de Mann Whitney.

5.1.2. Presencia de NTA y variables de inflamación

Si bien la mediana de IL-6 fue superior en las ratas con NTA, la diferencia entre los valores no fue estadísticamente significativa (tabla 4).

5.1.3. Presencia de NTA y variables de estrés oxidativo

A nivel plasmático, los valores de MDA fueron significativamente superiores en los animales con NTA, sin embargo no se hallaron diferencias significativas

para el contenido de glutatión. En concordancia con estos resultados, el contenido tisular de MDA, tanto cortical como medular, fue significativamente superior en los riñones con necrosis tubular, pero no encontramos diferencias significativas en los valores de GSH tisular (medular y cortical) en las ratas que tenían NTA versus las que no tenían necrosis. La expresión tubular de PARP-1, tanto a nivel de intensidad como de extensión, fue significativamente mayor en los riñones con NTA.

La excreción urinaria de peróxido de hidrógeno e isoprostanos fue significativamente superior en los animales que tuvieron necrosis tubular (tabla 4).

5.2. GRADO DE NECROSIS TUBULAR

Analizamos el coeficiente de correlación entre el grado de necrosis tubular (0-3) y los valores de los parámetros de función renal, inflamación y estrés oxidativo.

5.2.1. Grado de NTA y variables de función renal

Los coeficientes de correlación positiva entre el grado de NTA y los niveles séricos de creatinina, por una parte, y entre grado de NTA y proteinuria, por otra, fueron moderados tal y como se observa en las figuras 16 y 17, respectivamente.

Resultados

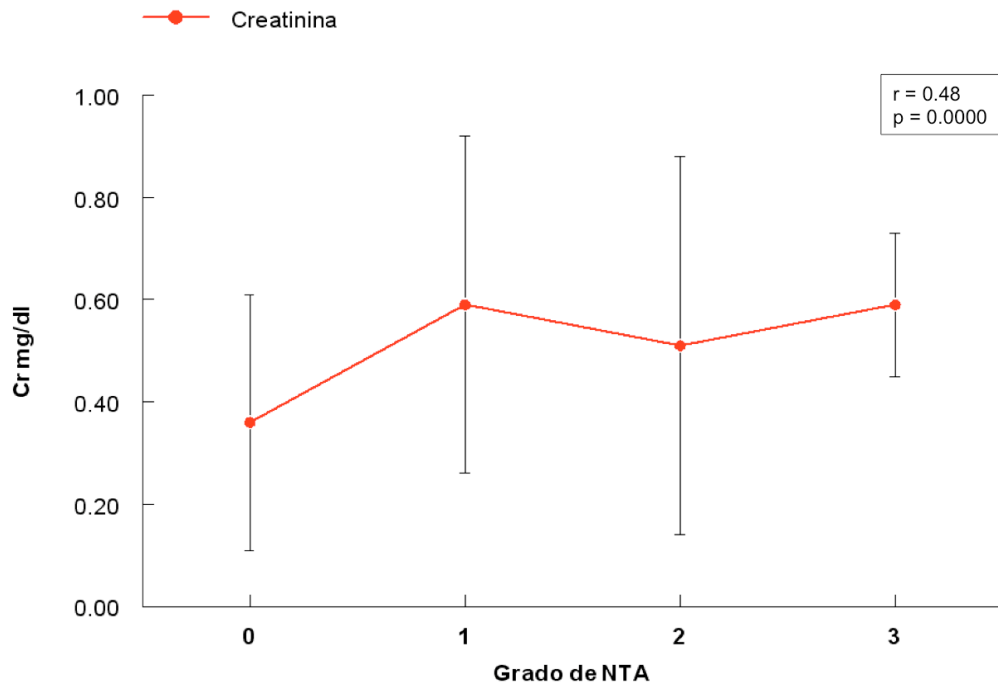


Figura 16. Correlación entre los niveles plasmáticos de creatinina y el grado de NTA (test de Spearman).

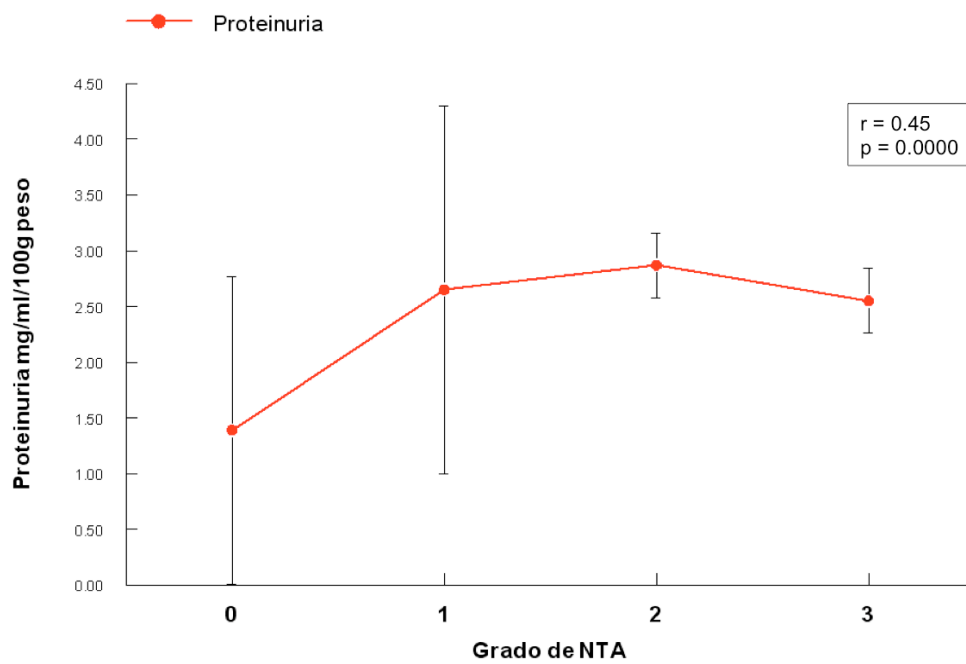


Figura 17. Correlación entre la proteinuria y el grado de NTA (test de Spearman).

5.2.2. Grado de NTA y variables de inflamación

No se pudo establecer correlación entre los niveles plasmáticos de IL-6 y el grado de NTA (figura 18).

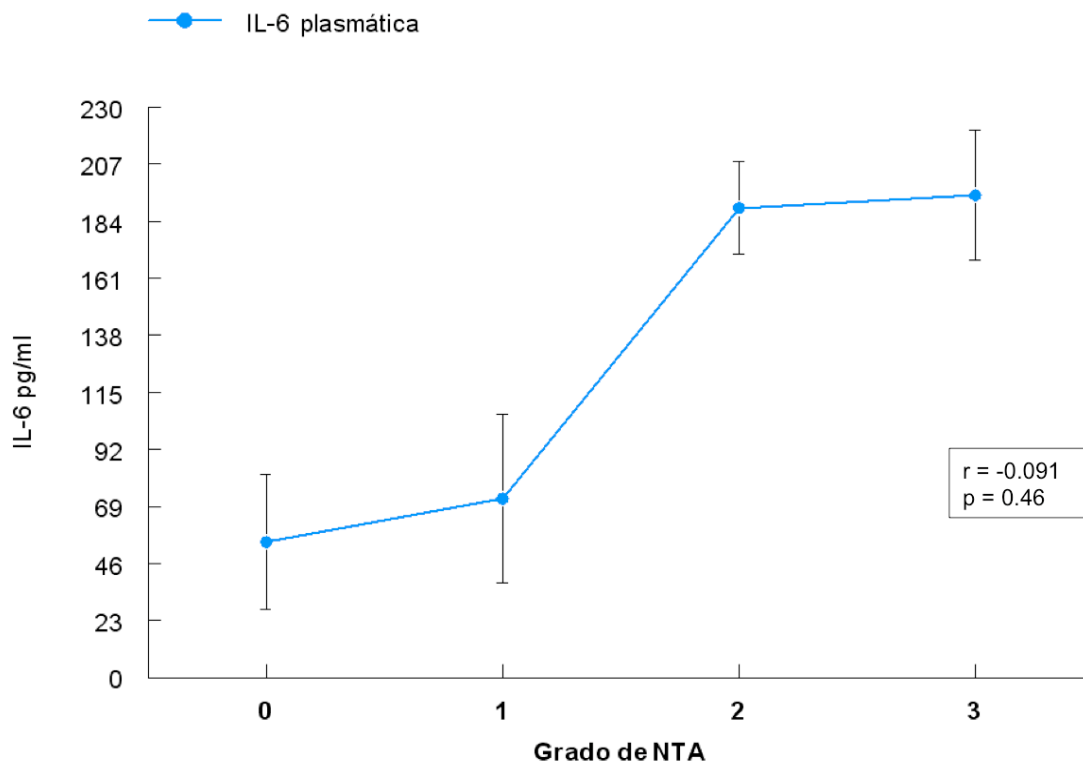


Figura 18. Correlación entre los niveles plasmáticos de IL-6 y el grado de NTA (test de Spearman).

5.2.3. Grado de NTA y variables de estrés oxidativo

El nivel de correlación positiva entre el grado de NTA y los valores plasmáticos de MDA fue alto (Fig. 19), sin embargo, en relación a la GSH plasmática no se pudo establecer correlación alguna (Fig. 20).

Resultados

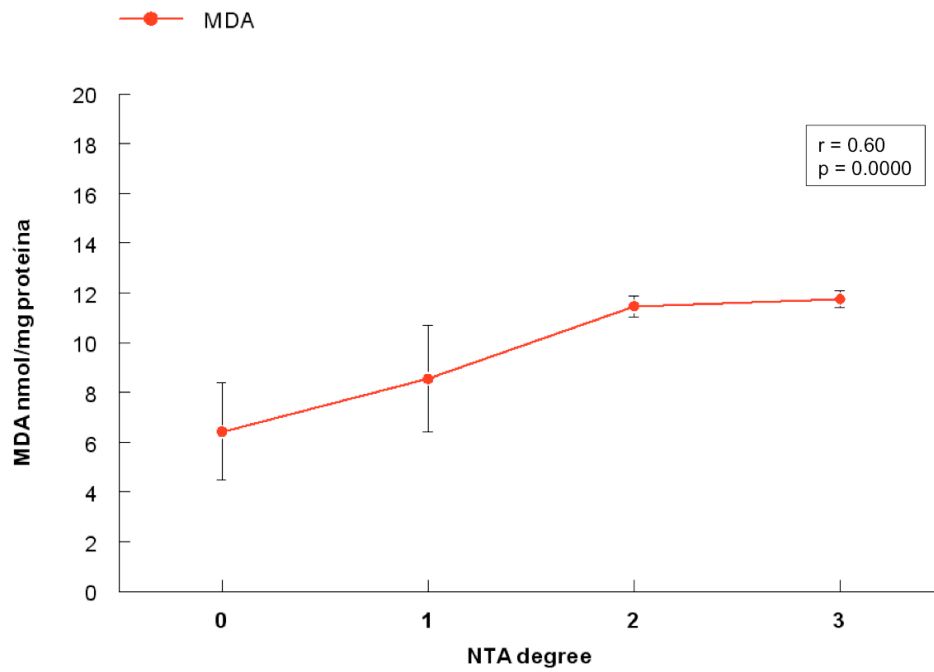


Figura 19. Correlación entre los niveles plasmáticos de MDA y el grado de NTA (test de Spearman).

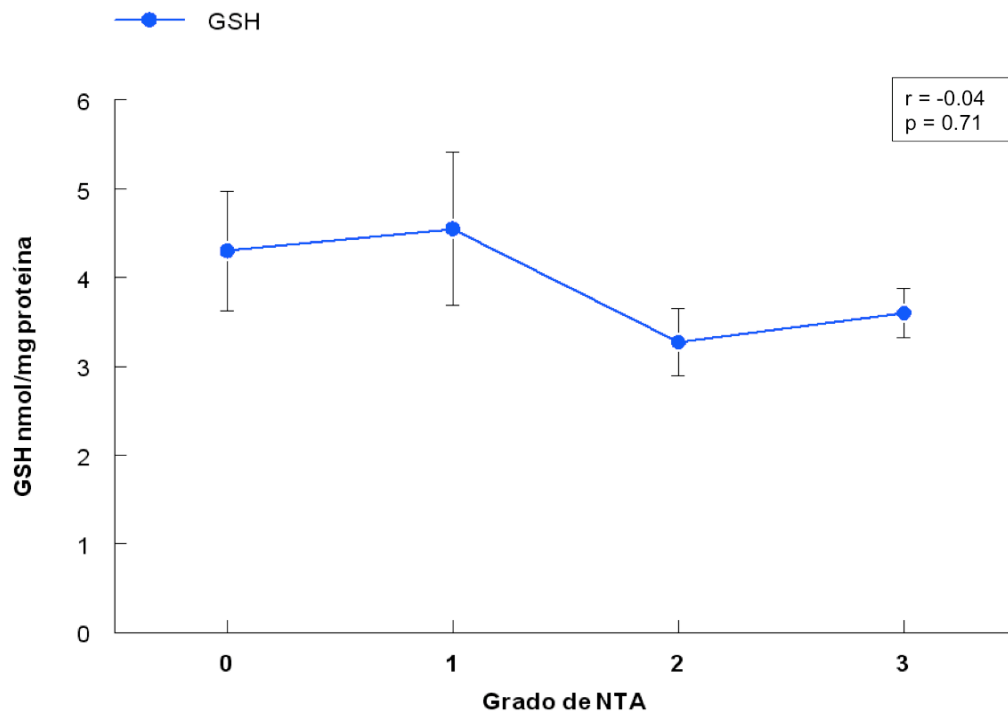


Figura 20. Correlación entre los niveles plasmáticos de GSH y el grado de NTA (test de Spearman).

En consonancia con los resultados anteriores, el grado de NTA se correlacionó de forma positiva con el contenido tisular de MDA, tanto cortical como medular (Fig. 21), pero no con el contenido tisular de GSH (Fig. 22).

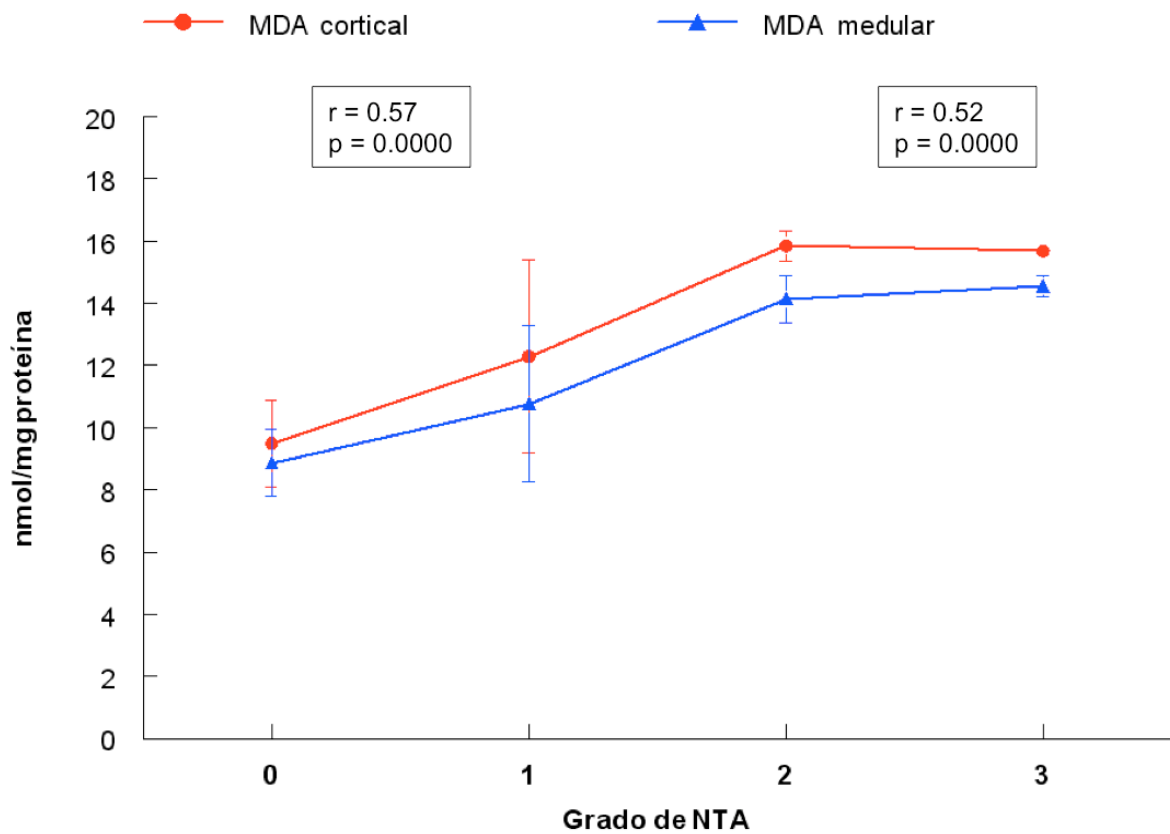


Figura 21. Correlación entre los niveles tisulares de MDA y el grado de NTA (test de Spearman).

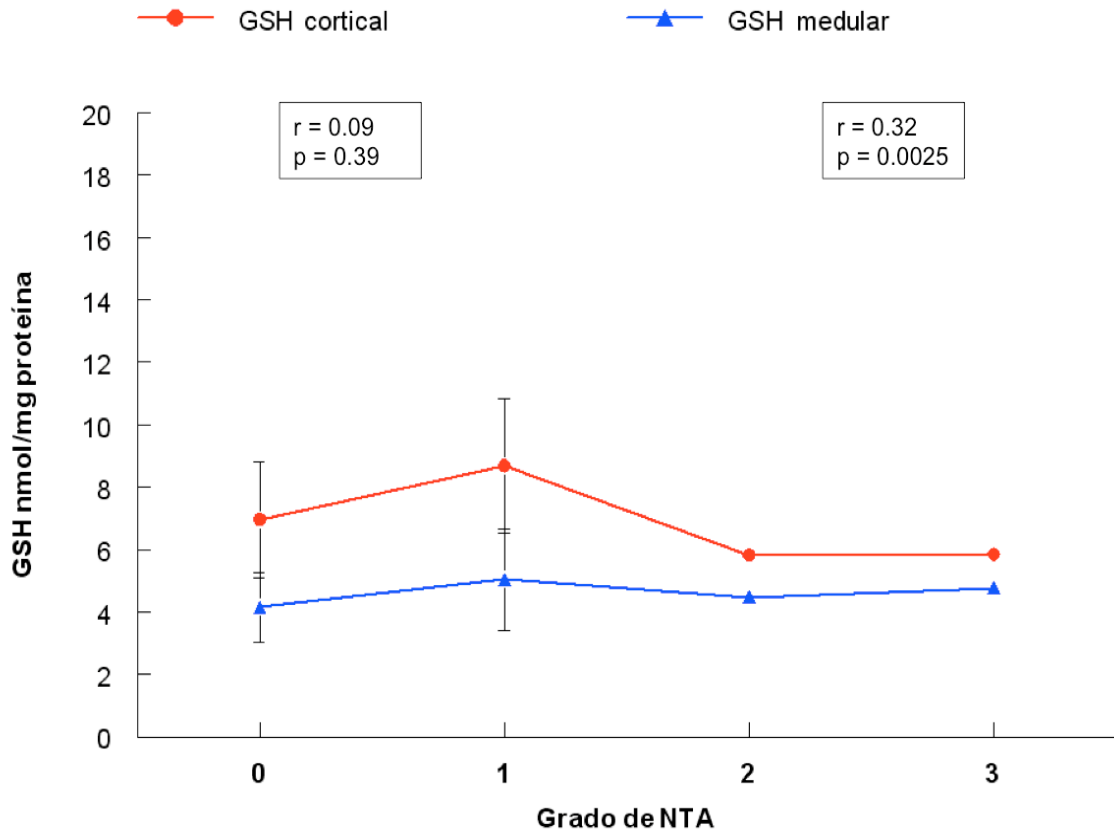


Figura 22. Correlación entre los niveles tisulares de GSH y el grado de NTA (test de Spearman).

Se observó una correlación positiva moderada entre grado de NTA y expresión de PARP-1 tubular, tanto a nivel de intensidad como de extensión (Fig. 23).

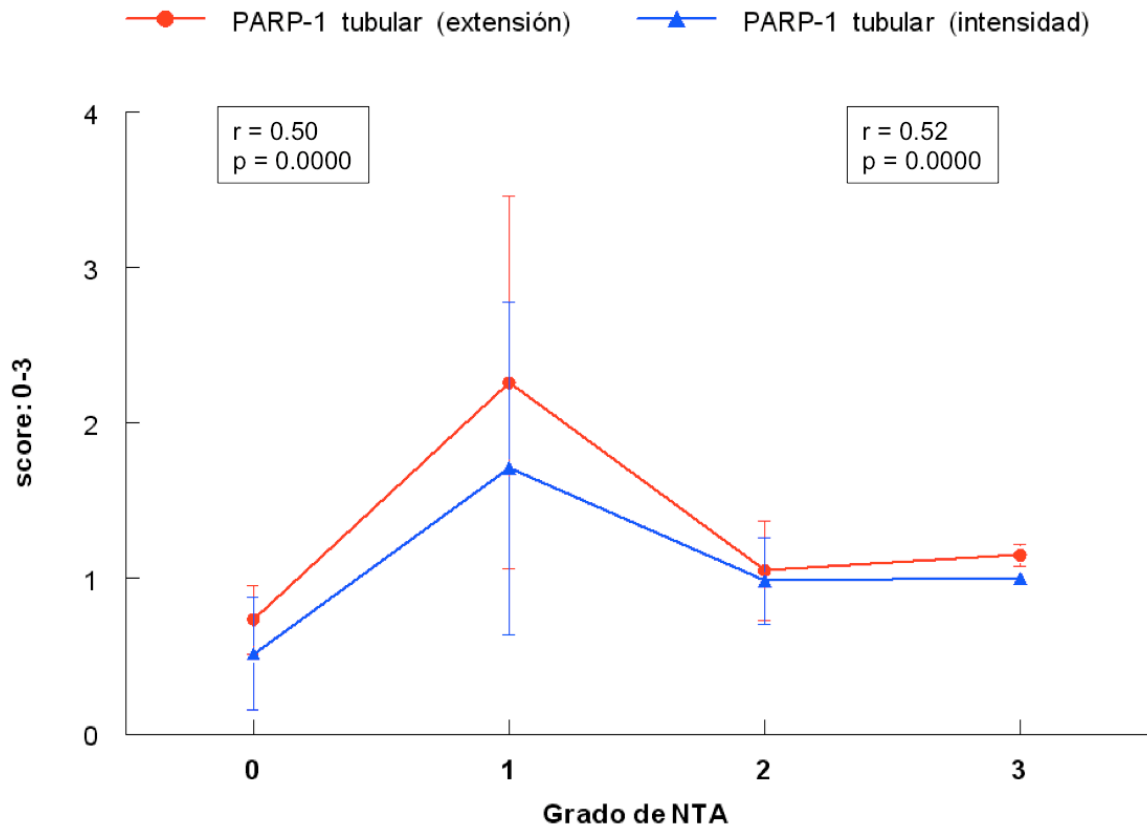


Figura 23. Correlación entre la extensión/intensidad de PARP-1 tubular y el grado de NTA (test de Spearman)

En cuanto al grado de NTA y la excreción urinaria de peróxido de hidrógeno e isoprostanos , hallamos una correlación positiva moderada en el primer caso (Fig. 24) y alta en el segundo (Fig. 25).

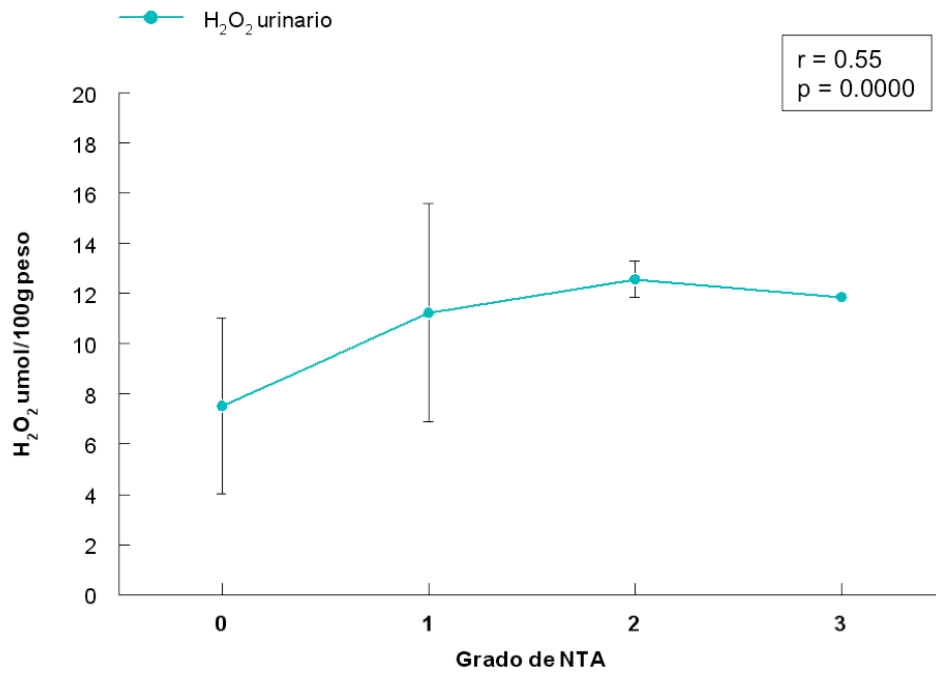


Figura 24. Correlación entre la excreción urinaria de peróxido de hidrógeno y el grado de NTA (test de Spearman).

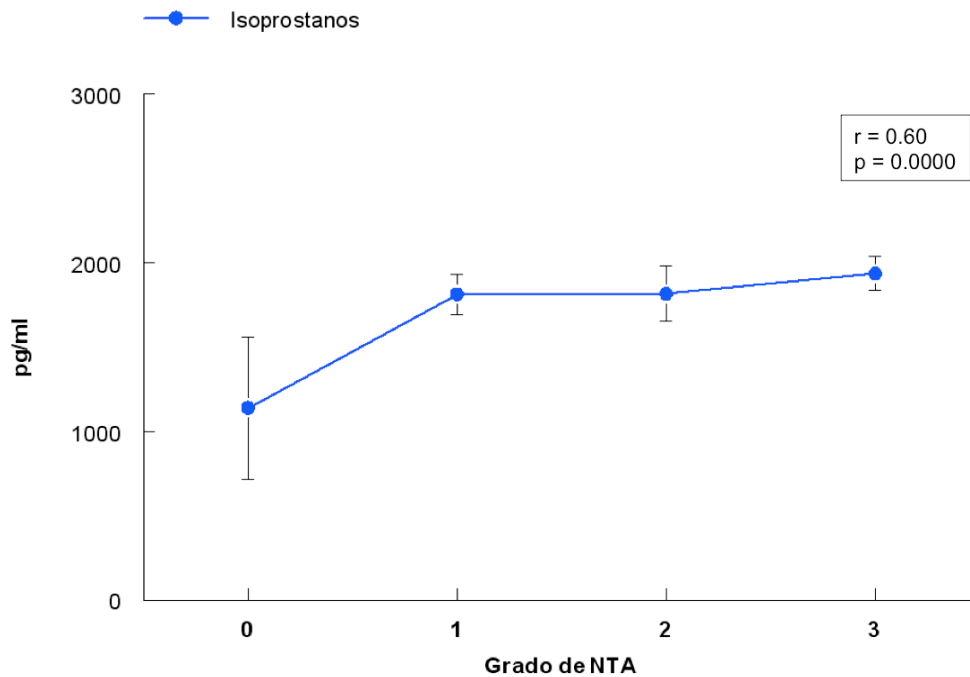


Figura 25. Correlación entre la excreción urinaria de isoprostanos y el grado de NTA (test de Spearman).

V. DISCUSIÓN

El preconditionamiento renal ha sido ampliamente explorado en los últimos años como una estrategia protectora para aumentar la resistencia de las células renales frente a eventos de I/R. Esto se ha logrado mediante la pre-exposición del riñón a condiciones que desencadenan un estrés oxidativo leve, tales como la isquemia transitoria (Zager y cols., 1984; Weber KE y cols. 2012), la oxigenación hiperbárica (Ramalho RJ y cols., 2012), hiperoxia (Wahhabaghai H y cols. 2009), ozono (Oztosun M y cols., 2012), la hipertermia (Delbridge y cols., 2007), o la irradiación (Kim J y cols., 2009).

La isquemia reperusión renal es un fenómeno muy complejo que involucra varios tipos de células (p.e células endoteliales, células inflamatorias y células dendríticas), el epitelio tubular dañado, disfunción vascular, y la infiltración leucocitaria. Además, muchos otros factores participan e interactúan en este evento, tales como los cambios en la hemodinámica renal (Rodriguez F y cols., 2013), edema (Herrler T y cols., 2012), cambios en el recambio de ácido hialurónico (Declèves AE y cols., 2012), inflamación (Ko GJ y cols., 2011), y la activación nerviosa simpática (Salman IM y cols., 2010).

El primer intento de utilizar hormonas tiroideas en el tratamiento del FRA fue comunicado por Straub en 1971. Él demostró que la mortalidad de conejos y ratones sometidos a FRA inducido por mercurio se reducía cuando los animales eran tratados con tiroxina (T_4), y que la administración a largo plazo de la hormona resultaba en una mejoría de la función renal. A partir de entonces, el uso de hormona tiroidea ha mostrado ser efectiva promoviendo la recuperación de la necrosis tubular en una amplia variedad de modelos de NTA isquémica y tóxica. Estos efectos beneficiosos parecen estar relacionados con un aumento de la expresión del factor de crecimiento epidérmico (FCE), esencial para la

regeneración de los túbulos renales tras la lesión por I/R. Estudios in vitro de Johnson y cols. (1989) mostraron que el pretratamiento de células tubulares proximales de conejo con triyodotironina (T_3) incrementó su respuesta al FCE y aumentó, al mismo tiempo, el número de receptores de FCE a nivel de las células epiteliales renales.

La hipótesis subyacente a la presente tesis es que la I/R renal causa lesión debido a un incremento en el estrés oxidativo y que el pre-tratamiento con triyodotironina (T_3) modula este desequilibrio en el estado oxidativo y, de esa forma, promueve una recuperación más rápida de la función renal.

El acondicionamiento con una dosis única de T_3 , disminuyó de forma significativa las lesiones histológicas derivadas de la isquemia y redujo las variables de disfunción renal, estrés oxidativo, los niveles plasmáticos de la citoquina inflamatoria IL-6, y la expresión tubular y glomerular de PARP-1.

Para este estudio utilizamos la hormona en su forma activa (T_3) puesto que creemos que representa la preparación ideal considerando una futura aplicación clínica de la misma.

Nuestros resultados contrastan con el antiguo trabajo de Sutter y Siegel (1988) donde el acondicionamiento con T_4 , administrándola inmediatamente antes de la isquemia, no mejoró el FRA en ratas, aunque la administración postisquémica inmediata de la hormona (a dosis de 10 y de 20 ug/100 g) sí fue efectiva acelerando la recuperación del epitelio tubular dañado. La razón por la cual el acondicionamiento con T_4 no tuvo un efecto protector no está claro y, probablemente, la ineffectividad del tratamiento se haya debido a un incremento de la demanda de O_2 y a la formación de RLO inmediatamente antes de la isquemia, lo cual haría al riñón más vulnerable a la misma. . Es posible que un

retraso de 24 h en la administración del agente, signifique que la hormona se recibe en el pico de la lesión renal, cuando el daño celular está plenamente manifiesto, impidiendo el efecto de preconditionamiento.

A diferencia de este estudio, en nuestro trabajo la triyodotironina fue administrada 24 h previas a la inducción de la isquemia, permitiendo, de alguna manera, un período de readaptación de las células renales y de los mecanismos compensadores. Además, muchas investigaciones recientes han contrarrestado la idea de que la T_4 es solamente una pro hormona de T_3 (Cheng S-Y y cols. 2010; Davis PJ y cols. 2010; Davis PJ y cols. 2011) (Fig. 1). Así, concentraciones de T_4 cercanas a los valores fisiológicos (10^{-10} m de T_4 libre) pueden interactuar con proteínas estructurales de la membrana plasmática, como la integrina $\alpha v \beta 3$, la cual contiene un dominio de unión para yodotironinas. La señal de la hormona tiroidea es transducida por MAPK (ERK1/2) en el endotelio (Bergh JJ y cols., 2005) y en otras células (Davis FB y cols., 2006). Además, los mecanismos por los cuales las células transducen las señales de T_4 y T_3 no necesariamente son los mismos. PI 3-K puede ser activado por T_3 pero no por T_4 mientras que ERK1/2 puede ser activado tanto por T_4 como por T_3 (Lin HY y cols., 2009).

La integrina transportadora de plaquetas $\alpha v \beta 3$, y la hormona tiroidea pueden actuar a través de esta vía para modificar la función plaquetaria (Mousa SS y cols., 2010). Las plaquetas humanas se aglutinan en respuesta a concentraciones fisiológicas de T_4 libre, secretando ATP como indicador biológico de aglutinación. Sin embargo, T_3 no causa aglutinación plaquetaria ni secreción de ATP. Éstas y otras diferencias no conocidas entre las acciones de T_4 con respecto a T_3 pueden explicar las discrepancias entre nuestros resultados y los de

Sutter. Así, la administración de T₄ antes de la isquemia podría impedir el efecto beneficioso del preconditionamiento debido a este efecto pro coagulante, que sería más activo en ausencia de flujo sanguíneo durante la isquemia.

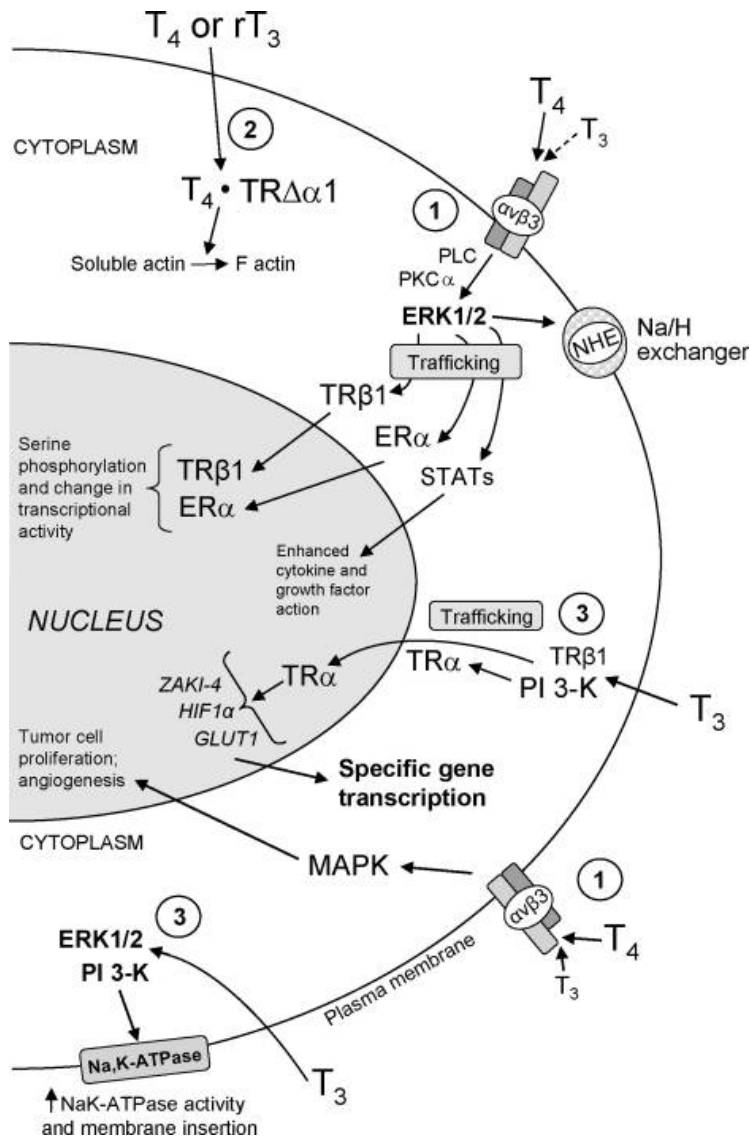


Figura 1. Acciones no genómicas de las hormonas tiroideas. La integrina $\alpha\beta3$, es un receptor de membrana plasmática de alta afinidad para la T₄, uniéndose T₃ con menor afinidad, a través de la cual T₄ activa la vía de la MAPK (ERK1/2) a través de la fosfolipasa C (PLC) y proteinquinasa C (PKC). ERK1/2 activado, promueve el transporte de proteínas específicas desde el citoplasma hacia el núcleo y la fosforilación de nucleoproteínas. Las proteínas fosforiladas por ERK1/2 activado por la hormona incluyen: receptor de estrógeno (ER)- α , TR- β 1, el transductor de la señal y activador de la transcripción (STAT)-1 α , y la proteína Trip230. Los eventos celulares inducidos desde el receptor de superficie incluyen: angiogénesis (endotelial y de células de músculo liso) y proliferación de células tumorales. En el citoplasma la T₃ activa a PI3K iniciándose la transcripción de genes específicos. GLUT1, transportador de glucosa-1. (Cheng y cols. 2010).

En el presente estudio demostramos que la I/R renal en ratas resulta en una significativa lesión y disfunción renal. La I/R renal produce una reducción significativa de la función renal, tal y como lo indican los niveles aumentados de urea y creatinina plasmáticas y la marcada reducción en el aclaramiento de creatinina. El daño renal ha quedado claramente documentado a través del análisis histológico de las biopsias por la presencia de NTA.

Nuestros datos indican que los animales preconditionados mostraron una recuperación acelerada y sostenida del FRA. Esto se apoya en la mejor función renal y los niveles de proteinuria más bajos a las 48 h post-isquemia de las ratas pre-tratadas con T₃.

El preconditionamiento con T₃ atenuó la disfunción renal, reduciendo los niveles plasmáticos de urea y creatinina e incrementando los valores de aclaramiento de creatinina.

Con la excepción de la proteinuria, la cual mejoró a las 24 h, el resto de variables, usadas como índice de función renal, se recuperaron a las 48 h de la isquemia. Una posible explicación para este fenómeno puede derivar de los estudios de Fernández y cols. (2007) y de Li y cols. (2011), quienes administraron T₃ y luego siguieron el curso temporal de las distintas variables que podrían participar en este efecto de preconditionamiento. Usando la misma dosis de T₃ que en nuestro estudio estos autores observaron que: a)- los niveles séricos de T₃ estaban marcadamente disminuidos a las 24 h, retornando a los valores de control a las 36 h; b)- El contenido de GSH hepático y renal comenzaba a aumentar a las 24 h, y c)- la carbonil proteína en hígado y el MDA en riñón retornaban a los valores control a las 24 h. Todos estos datos indican que el efecto pleno del preconditionamiento se alcanza a las 48 h después de la

administración de T₃ o a las 24 h después de la isquemia, como se observó usando nuestro protocolo.

Por otra parte, puesto que el daño celular de la agresión isquémica no está limitado al periodo de la oclusión vascular, es muy difícil determinar si la administración de T₃ actuó limitando la severidad del insulto inicial o ayudó a aumentar el proceso de recuperación. Varios estudios han demostrado que el daño tubular que sigue al insulto isquémico continúa produciéndose durante las primeras 24 h después de establecida la reperfusión (Reimer KA y cols., 1972; Glaumann B y cols., 1975; Glaumann B y Trump BF, 1975; Venkatachalam MA y cols., 1978).

Además, los cambios celulares morfológicos asociados a la isquemia fueron significativamente menores en los animales tratados con T₃, indicando que la hormona no sólo mejora la función renal sino que también acelera la reparación del epitelio tubular dañado.

El hecho de que a las 24 h de la reperfusión el grupo precondicionado tuviese niveles más elevados de creatinina y un porcentaje de NTA sin diferencias significativas con el grupo placebo, y que hacia las 48 h de la reperfusión los valores de creatinina plasmática fueran similares a los de los grupos control y la NTA fuera significativamente menor que las ratas placebo, sugiere que la hormona actúa mejorando los mecanismos de recuperación y no simplemente limitando la severidad del insulto inicial.

En base a estos resultados, parece más probable que los efectos beneficiosos de T₃ estén relacionados con un aumento y mejoría de los mecanismos celulares, lo cual resulta en la reparación y restauración del daño subletal del epitelio tubular.

Nuestros hallazgos están en la línea de observaciones previas de que el preconditionamiento con T₃ puede proteger al hígado del daño por I/R (Fernández y cols., 2007). Los mecanismos celulares y moleculares responsables de estos efectos saludables no están completamente claros y parecen ser multifactoriales.

El preconditionamiento con la hormona tiroidea tuvo un claro efecto anti-necrótico, el cual puede explicarse, al menos en parte, por el descenso in situ de la expresión tubular de PARP-1 y los signos de reducción del estrés oxidativo renal, p.e, descenso de los valores tisulares (corteza y médula) de MDA, incremento de los valores tisulares (corteza y médula) de glutatión, y la disminución de los niveles urinarios de peróxido de hidrógeno e isoprostanos. Estos cambios disminuyen la necrosis de las células epiteliales tubulares, mejorando así la función renal.

La extensión e intensidad de la expresión tubular y glomerular de PARP-1 se elevó en los grupos con isquemia después de todos los periodos de reperfusión en consonancia con reportes previos de una asociación entre daño renal secundario a isquemia renal y sobreactivación de PARP-1 (Noiri y cols., 2001; Yelamos y Oliver, 2002). La PARP-1 es una proteína nuclear que protege el genoma celular reparando las cadenas rotas de ADN (De Murcia y cols., 1995), catalizando la ADP-ribosilación de proteínas usando NAD⁺ como sustrato (Schraufstatter y cols., 1986). La sobreactivación de PARP-1 inducida por la isquemia conduce a un consumo masivo de NAD⁺ y a depleción del ATP (Lindahl y cols., 1995), produciendo necrosis celular (Thiemermann y cols., 1997). La PARP-1 se ha implicado en la patogénesis del daño por I/R en diferentes modelos experimentales. Así, las lesiones por I/R fueron reducidas por la inhibición

farmacológica de PARP-1 en ratas (Martin y cols., 2000) y en ratones knock-out para el gen *parp-1* (Zheng y cols., 2005).

En un estudio en humanos, la expresión nuclear tubular de PARP-1 precedió a los signos morfológicos de NTA, y se halló una relación positiva entre NTA y expresión de PARP-1 (O'Valle y cols., 2009). En el presente estudio, el tratamiento con triyodotironina redujo la expresión de PARP-1 a las 24 y 48 h de la reperfusión, probablemente relacionado con la recuperación del ATP renal (Sutter y cols., 1988), un mecanismo que puede contribuir a la mejora de la lesión renal por I/R.

Las hormonas tiroideas están probablemente involucradas en el control de la actividad de PARP-1. Cesarone y cols. (2000) demostraron un incremento de los niveles basales de la enzima hepática en ratas tiroidectomizadas hipotiroideas. Asimismo, la administración de T_3 en ratas eutiroideas como en tiroidectomizadas, resultó en una disminución rápida y transitoria de la actividad de PARP-1.

El presente estudio sugiere que el preconditionamiento con hormona T_3 puede mejorar el perfil oxidativo post-isquemia, conduciendo a una expresión tisular de PARP-1 significativamente menor, indicando que la T_3 puede reducir la peroxidación lipídica. En consonancia con estos hallazgos, el preconditionamiento con T_3 provocó una disminución significativa de MDA, H_2O_2 e isoprostanos, y un incremento significativo en la actividad de GSH a los dos días posteriores a la isquemia renal.

La aceleración del consumo de O_2 por T_3 aumenta la producción de RLO con la concomitante depleción de antioxidantes, induciendo por lo tanto un desequilibrio redox (Fernández V y cols. 2006). El preconditionamiento del estrés

oxidativo puede involucrar la reprogramación genética a través de la activación de factores de transcripción específicos que controlan la expresión de proteínas relacionadas con la protección y supervivencia celular (Cutrín JC y cols. 2002). La calorigénesis inducida por T_3 se acompaña de una sobrerregulación redox de citoquinas (Tapia G y cols. 2003), enzimas (Fernández V y cols. 2005), proteínas anti-apoptóticas (Fernández, Mora y cols. 2005) y proteínas de fase aguda (Tapia G y cols. 2006).

Estos representan mecanismos adaptativos para restablecer la homeostasis redox y promover la supervivencia celular bajo condiciones de toxicidad por RLO.

La administración de T_3 puede representar un estímulo de preconditionamiento que produce un desequilibrio redox a corto plazo y reversible.

En consonancia con esta estrategia, observamos en ambos grupos de ratas tratadas con una dosis única de T_3 (100 ug/kg) 24 h antes de la isquemia una reducción de los niveles plasmáticos de glutatión a las 4 h de la reperfusión. Estos resultados concuerdan con reportes previos. Fernández V y cols. (2007) trataron ratas con la misma dosis de T_3 y observaron una respuesta calorigénica evidenciada por un marcado incremento en la temperatura rectal de los animales (que duró unas 34 h) y por el estrés oxidativo en el hígado, caracterizado por una depleción de GSH a las 24 h y una carbonilación proteica aumentada a las 12 h, lo cual se revirtió a las 24 h. En un estudio posterior, Li y cols. (2011) reportó que la administración de T_3 a las mismas dosis que en nuestro estudio produjo una disminución del GSH renal y un incremento de MDA que fueron comparables con los valores de los controles después de 24 h. Estos cambios en las variables de

estrés oxidativo ocurren sin toxicidad hepática ni renal. Nuestros resultados corroboran que este efecto está desprovisto de toxicidad renal como se demuestra por los valores renales normales en el grupo SO-T₃ después de la administración de T₃.

El principal daño tubular y glomerular parece ocurrir durante el periodo de reperfusión post-isquemia, y la generación de RLO estaría implicada como el mayor factor contribuyente (Dröge, 2002; Nath y Norby, 2000). En nuestro estudio, el preconditionamiento con T₃ se asoció a una reducción en los componentes de estrés oxidativo inducidos por la I/R, como se evidencia por la disminución observada en los niveles de las variables de estrés oxidativo en plasma, orina y tejido renal. El mecanismo por el cual la triyodotironina atenúa el estrés oxidativo sistémico y local podría involucrar la prevención del deterioro oxidativo dependiente de RLO de biomoléculas, a través del restablecimiento de la homeostasis redox. Además, la T₃ podría revertir los cambios en la señal de transducción y expresión genética que subyace al daño inducido por la I/R (Dröge, 2002; Poli y cols., 2004).

Aparte de los efectos evidenciados en el presente estudio, se ha demostrado que el tratamiento con hormona tiroidea mejora la recuperación del ATP renal y reduce las alteraciones celulares asociadas a la lesión isquémica renal (Sutter y cols., 1988). Así, el impacto beneficioso de la hormona tiroidea puede ser explicado también por la activación de la Na-K-ATPasa renal, dada la demostración de Lo y Edelman (1976) de que la tiroxina (T₄) incrementa no sólo la actividad de la Na-K-ATPasa sino también el número de unidades de Na-K-ATPasa en la corteza renal. Además, otros investigadores (Schulte-Wissermann y cols., 1977) encontraron que la T₄ acelera la recuperación de la actividad de Na-K-

ATP pasa en varios modelos de FRA. Varios investigadores han demostrado que los niveles de ATP renal caen rápidamente después de la oclusión de las arterias renales (Vogt y Farber, 1968; Fernando y cols., 1976; Hems y Brosnan, 1970; Warnick y Lazarus, 1980). Además, la depleción del pool de adenina nucleótido ocurre y resulta en una recuperación retrasada de los niveles tisulares de ATP. Vogt y Farber en 1968, notaron que los niveles de ATP retornaban al 90% de los valores de control en 30 min si el intervalo de isquemia era de 20 min, mientras que una reperfusión de 60 min se acompañaba de una recuperación de sólo un 50% del ATP renal tras 40 min de isquemia. Induciendo un daño isquémico de 60 min, tanto Fernando y cols. (1976), como Collins y cols. (1981), notaron una recuperación incompleta de los niveles renales de ATP. En otro estudio de Sutter y Siegel, se demostró que hay una correlación lineal significativa entre la función renal 24 h después de la isquemia y el contenido renal de ATP tras 120 min de reperfusión. Otros estudios de mismo grupo mostraron que la infusión postisquémica de ATP-MgCl₂ o de AMP-MgCl₂ (Siegel y cols., 1984; Stromski y cols., 1986) mejoró la recuperación del FRA y que la administración postisquémica de estos agentes resultó en unos niveles de ATP significativamente más altos cuando se medían a los 120 min de la reperfusión. Así, parece que la función renal tras la isquemia se relaciona con la recuperación postisquémica de ATP y que las maniobras que aumentan los niveles de ATP pueden resultar en una mejoría de la función renal. Asimismo, estos investigadores demostraron que las ratas tratadas con T₄ incrementaban más rápidamente los niveles de ATP, alcanzando un 90% de los valores preisquémicos a los 120 min de la reperfusión frente al 64% de los animales tratados con suero salino. Por lo tanto, unos niveles postisquémicos de ATP

tisular aumentados en los animales tratados con hormona tiroidea puede explicar, en parte, la recuperación acelerada del FRA.

El mecanismo responsable del incremento de los niveles de ATP celular tras el tratamiento con hormona tiroidea podría estar relacionado con un mayor consumo de ADP por la mitocondria hepática (Hoch y cols., 1977). Barbior y cols. (1973) demostraron que el consumo de ADP de ratas tratadas con una dosis única de tiroxina fue significativamente mayor que en los animales eutiroideos y que había una correlación significativa entre el consumo de ADP dependiente de oxígeno y el transporte activo de ADP. El ADP, un sustrato de la fosforilación oxidativa, tiene que entrar a la mitocondria para ser refosforilado. Si por cada molécula de ADP que entra, una molécula de ATP sale, se puede especular que este aumento del consumo de ADP se acompañaría de la secreción de una cantidad equivalente de ATP desde la matriz mitocondrial.

Otro mecanismo que puede explicar el incremento de los niveles de ATP es la estabilización de las membranas celulares por las hormonas tiroideas. Ballard y cols. (1984) demostraron que la hormona tiroidea estimula la incorporación de fosfolípidos durante el desarrollo de los tejidos pulmonares de ratas y conejos. Los fosfolípidos son un componente importante de las membranas celulares y proveen de un armazón estructural indispensable para el mantenimiento de la integridad celular. Se desconoce de qué manera la hormona tiroidea tiene un efecto estimulante en la incorporación de fosfolípidos en la célula tubular renal. Este efecto estaría en consonancia con nuestros hallazgos de menor descamación celular, necrosis y pérdida del borde en cepillo, observada en el grupo preconditionado con T_3 .

Es conocido que la lesión por I/R renal involucra respuestas inmunes tanto innatas como adaptativas. Los mediadores celulares de la inmunidad, tales como las células dendríticas, neutrófilos, macrófagos, natural killer, linfocitos T y B, contribuyen a la patogénesis del daño renal tras la I/R (Jang y cols., 2009; Yang y cols., 2010; Parra y cols., 2010). Los leucocitos juegan un papel crucial en la lesión por I/R. Así, la hemo-reperfusión empobrecida en leucocitos mejoró la función renal y el daño túbulo-intersticial en un modelo porcino, acompañado por una reducción de la infiltración celular mieloperoxidasa+ de más del 91% (Yang B y cols., 2011).

La inflamación usualmente caracteriza la lesión por I/R en ratas (Fig. 2), pero encontramos muy pocas células inflamatorias a todos los tiempos de reperfusión (4-48 h), las cuales han sido detectadas en áreas de NTA o en algunos casos con infarto renal. En general, no se observaron diferencias morfológicas en glomerulitis, tubulitis, o capilaritis, y estos hallazgos fueron apoyados por los resultados inmunohistoquímicos. Utilizamos la inmunohistoquímica para cuantificar el número de células (leucocitos, monocitos/macrófagos y granulocitos MPO+) por campo milimétrico. Aunque encontramos algunas diferencias esporádicas en el número total de leucocitos (CD45) y macrófagos (CD68) detectados por inmunohistoquímica, no han habido diferencias en el conteo de granulocitos en ningún tiempo de reperfusión. La T₃ es protectora pero no reduce la extensión y duración del infiltrado inflamatorio, lo cual puede deberse a un número inadecuado de células inflamatorias para diferenciar (ver figuras 14 y 15 de Resultados). Las biopsias renales de los diferentes grupos no mostraron infiltrados inflamatorios en el túbulo-intersticio ni en el glomérulo, sólo la presencia de células inflamatorias circulantes dentro de los vasos.

Dado que el conteo de neutrófilos fue similar que en los controles, creemos que el efecto beneficioso de T₃ es atribuible a un efecto directo sobre las células renales a través de una reducción en el estrés oxidativo, fuertemente asociado con la I/R renal, lo cual induce una disfunción renal atenuada en las ratas, y no está mediado por una reducción en el número de PMN.

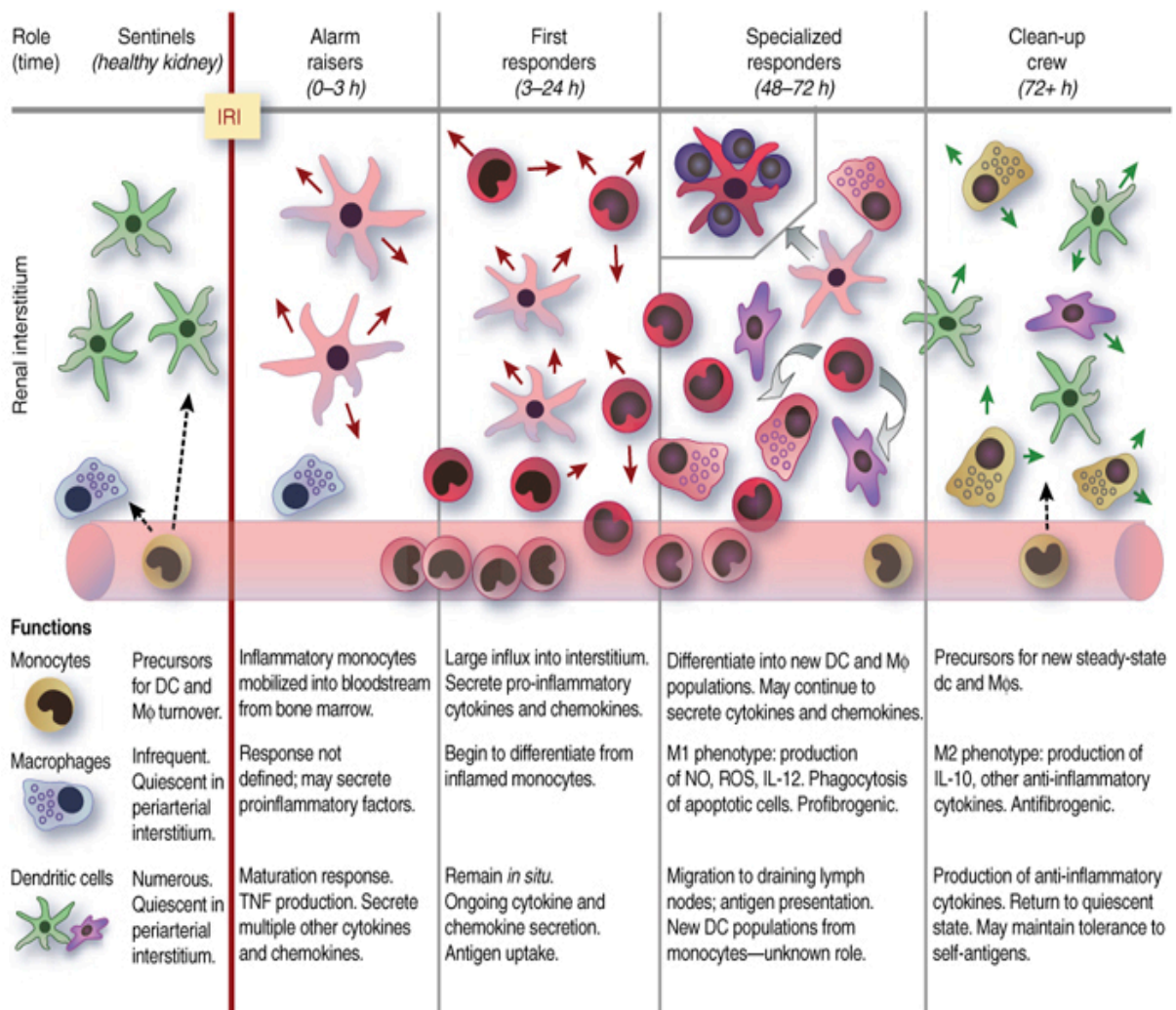


Figura 2. Respuesta inflamatoria en la I/R renal. Modelo de la participación de monocitos y líneas celulares derivadas de monocitos (macrófagos y células dendríticas) en la respuesta dinámica frente al daño por isquemia reperusión en el riñón. Abreviaturas: DC, células dendríticas, IL, interleuquinas; IRI, daño por isquemia/reperusión; M ϕ , macrófago; NO, óxido nítrico; ROS, especies reactivas del oxígeno; TNF, factor de necrosis tumoral (Swaminathan S., Griffin M, 2008).

VI. CONCLUSIÓN

- El acondicionamiento con Triyodotironina redujo los signos bioquímicos e histológicos del daño renal causado por isquemia/reperfusión y se asoció con una reducción de las variables de estrés oxidativo en plasma, orina y tejido renal, así como con una disminución tanto de los niveles plasmáticos de la citoquina inflamatoria IL-6 como de la expresión de PARP-1 a nivel glomerular y tubular. Estos resultados indican un importante papel para la secuencia de estrés oxidativo, inflamación, y sobreactivación de PARP-1 en el desarrollo del FRA inducido por I/R.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Abu-Soud HM, Hazen SL. Nitrid oxide modulates the catalytic activity of myeloperoxidase. *J. Biol Chem* 2000; **275**: 5425-30.

Albrich JM, McCarthy CA, Hurst JK. Biological reactivity of hypochlorous acid: Implications for microbicidal mechanisms of leukocyte myeloperoxidase. *Proc Natl Acad Sci* 1981;**78**: 210-14.

Allen JE, Goodman DB, Besarab A, Rasmussen H. Studies on the biochemical basis of oxygen toxicity. *Biochim Biophys Acta* 1973; **320(3)**: 708-28.

Alvarez-Gonzalez R, Watkins TA, Gill PK, Reed JL, Mendoza-Alvarez H. Regulatory mechanisms of poly(ADP-ribose) polymerase. *Mol Cell Biochem* 1999; **193(1-2)**: 19-22.

Ames BN, Cathcar R, Schwiers E, Hochstein P. Uric acid provides an antioxidant defence in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;**78**: 6858-62.

Arnold PE, Lumlertgul D, Burke TJ, Schrier RW. In vitro versus in vivo mitochondrial calcium loading in ischemic acute renal failure. *Am J Physiol* 1985; **248(6 Pt 2)**: F845-50.

Babior BM. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *N England J Med* 1978;**298**:659-68.

Bagheri F, Gol A, Dabiri S, Javadi A. Preventive effect of garlic juice on renal reperfusion injury. *Iran J Kidney Dis* 2011;**5(3)**: 194-200.

Baker GL, Corry RJ, Autor AP. Oxygen free radical induced damage in kidneys subjected to warm ischemia and reperfusion. Protective effect of superoxide dismutase. *Ann Surg* 1985; **202(5)**: 628-41.

Barber E, Menéndez S, León OS, Barber MO, Merino N, Calunga JL, Cruz E, Bocci V. Prevention of renal injury after induction of ozone tolerance in rats submitted to warm ischemia. *Mediators Inflamm* 1999; **8**: 37-41.

Barclay LR, Baskin KA, Locke SJ, Vinqvist MR. Absolute rate constants for lipid peroxidation and inhibition in model biomembranes. *Can J Chem* 1989; **67**: 1366- 9.

Barja de Quiroga. Radicales libres y antioxidantes. *Bioquímica y fisiopatología del estrés oxidativo. Real Academia de Farmacia. Madrid* 1997;21-44.

Batelli MG, Della Corte E, Stirpe F. Xanthine oxidase type D (dehydrogenase) in the intestine and other organs of the rat. *Biochem J* 1972; **126**:747-9.

Bayrak O, Uz E, Bayrak R, Turgut F, Atmaca AF, et al. Curcumin protects against ischemia/reperfusion injury in rat kidneys. *World J Urol* 2008; **26**: 285-291.

Beachamp D, Pettigrew M. Influence of hydrocortisone on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; **32**: 992-96.

Becker LB. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovasc Res* 2004; **61(3)**: 461-70.

Berger TM, Polidori MC, Dabbagh A, Evans PJ, Halliwell B, Morrow JD et al. Antioxidant activity of vitamin C in iron-overload human plasma. *J Biol Chem* 1997; **272**: 15656- 60.

Bergh JJ, Lin HY, Lansing L, Mohamed SN, Davis FB, Mousa S, Davis PJ. Integrin alphaVbeta3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology* 2005; **146(7)**: 2864-71.

Bhalodia Y, Kanzariya N, Patel R, Patel N, Vaghasiya J, Jivani N, Raval H. Renoprotective activity of benincasa cerifera fruit extract on ischemia/reperfusion-induced renal damage in rat. *Iran J Kidney Dis* 2009; **3(2)**: 80-5.

Bolli R. The late phase of preconditioning. *Circ Res* 2000; **87(11)**: 972-83.

Bradley SE, Bradley GP, Stéphan F. Role of structural imbalance in the pathogenesis of renal dysfunction in the hypothyroid rat. *Trans Assoc Am Physicians* 1972; **85**:344-52.

Bradley SE, Stéphan F, Coelho JB, Réville P. The thyroid and the kidney. *Kidney Int* 1974; **6(5)**:346-65.

Bradley SE. Renal function; in Werner, The thyroid 1971; **3rd ed.:** 757-62.

Brasel JA, Winick M. Differential growth in the organs of hypothyroid rats. *Growth* 1970; **34**:197-207.

Brawn K, Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases: threat and defense. *Acta Physiol Scand Suppl* 1980; **492**:9-18.

Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978; **52**:302-10.

Bulkley GB. The role of oxygen free radicals in human disease processes. *Surgery* 1983; **94(3)**:407-11.

Burne-Taney MJ, Liu M, Baldwin WM, Racusen L, Rabb H. Decreased capacity of immune cells to cause tissue injury mediates kidney ischemic preconditioning. *J Immunol* 2006; **176**: 7015-20.

Candeias LP, Patel KB, Stratford MR, Wardman P. Free hydroxyl radicals are formed on reaction between the neutrophil-derived species superoxide anion and hypochlorous acid. *FEBS Lett* 1993; **333**: 151-53.

Carr A, Frei B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J* 1999; **13(9)**: 1007-24.

Carr AC, Tijerina T, Frei B. Vitamin C protects against and reserves specific hypochlorous acid- and chloramina-dependent modifications of low-density lipoprotein. *Biochem J* 2000; **346**: 491-9.

Cesarone CF, Scarabelli L, Demori I, Balocco S, Fugassa E. Poly(ADP-ribose) polymerase is affected early by thyroid state during liver regeneration in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; **279(6)**: G1219-25.

Chatterjee PK, Cuzzocrea S, Brown PA, Zacharowski K, Stewart KN, Mota-Filipe H, Thiemermann C. Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, reduces oxidant stress-mediated renal dysfunction and injury in the rat. *Kidney Int* 2000; **58(2)**: 658-73.

Chavez-Cartaya R, Jamieson NV, Ramirez P, Marin J, Pino-Chavez G. Free radical scavengers to prevent reperfusion injury following warm liver ischemia. *Transplant Proc* 1999; **31(6)**: 2439-40.

Chen G. Lipid peroxidation. Oxygen free radicals and tissue damage. *Ciba Foundation Symposium 65. Excerpta Medica* 1979; 177-182.

Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev* 2010; **31(2)**: 139-70.

Chien CT, Hsu SM, Chen CF, Lee PH, Lai MK. Hypoxic preconditioning reduces ischemia/reperfusion-induced apoptosis cell death in rat kidney. *Transplant Proc* 2000; **32**: 1653-4.

Chu FF, Esworthy RS. The expression of an intestinal form of glutathione peroxidase (GSHPx-GI) in rat intestinal epithelium. *Arch Biochem Biophys* 1995; **323**: 288-94.

Chujo K, Ueno M, Asaga T, Sakamoto H, Shirakami G, Ueki M. Atrial natriuretic peptide enhances recovery from ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats. *J Biosci Bioeng* 2010; **109(6)**: 526-30.

Codoñer-Franch P, Muñiz P, Gasco E, Domingo JV, Valls-Belles V. Effect of a Diet Supplemented with alpha-Tocopherol and beta-Carotene on ATP and Antioxidant Levels after Hepatic Ischemia-Reperfusion. *J Clin Biochem Nutr* 2008; **43(1)**:13-8.

Cohen RD. Water and electrolyte metabolism during the treatment of myxedema. *Clin Sci* 1963; **25**:293-304.

Coimbra TM, Cieslinski DA, Humes HD. Epidermal growth factor accelerates renal repair in mercuric chloride nephrotoxicity. *Am J Physiol* 1990; **259**: 438-43.

Conde C, Mark M, Oliver FJ, Huber A, de Murcia G, Ménissier-de Murcia J. Loss of poly(ADP-ribose) polymerase-1 causes increased tumour latency in p53-deficient mice. *EMBO J* 2001; **20(13)**:3535-43.

Crane FL. Biochemical functions of coenzyme Q10. *J Am Coll Nutr* 2001; **20(6)**:591-8.

Cronin R, Inman L, Eche T, Southern P, Griggs M. Effect of thyroid hormone on gentamicin accumulation in rat proximal tubule lysosomes. *Am J Physiol* 1989; **257**: F86-91.

Cronin RE, Brown DM, Simonsen R. Protection by thyroxine in nephrotoxic acute renal failure. *Am J Physiol* 1986; **251**: F408-16.

Cronin RE, Newman JA. Protective effect of thyroxine but not parathyroidectomy on gentamicin nephrotoxicity. *AM J Physiol* 1985; **248**: F332-39.

D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I, Poirier GG. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J* 1999; **342(2)**: 249-68.

Davies A. Thyroid physiology. *Br. med. J* 1972; **ii**: 206-219.

Davis FB, Tang HY, Shih A, Keating T, Lansing L, Hercbergs A, Fenstermaker RA, Mousa A, Mousa SA, Davis PJ, Lin HY. Acting via a cell surface receptor, thyroid hormone is a growth factor for glioma cells. *Cancer Res* 2006; **66(14)**: 7270-5.

Davis PJ, Davis FB, Mousa SA, Luidens MK, Lin HY. Membrane receptor for thyroid hormone: physiologic and pharmacologic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2011; **51**: 99-115.

Davis PJ, Zhou M, Davis FB, Lansing L, Mousa SA, Lin HY. Mini-review: Cell surface receptor for thyroid hormone and nongenomic regulation of ion fluxes in excitable cells. *Physiol Behav* 2010; **99(2)**: 237-9.

De Cavanagh EM, Inserra F, Ferder L, Romano L, Ercole L, Fraga CG. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities are increased by enalapril and captopril in mouse liver. *FEBS Lett* 1995; **361(1)**: 22-4.

De Murcia G, Ménissier De Murcia J. Poly(ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor. *Trends Biochem Sci* 1995; **19**: 172-176.

Declèves AE, Caron N, Voisin V, Legrand A, Bouby N, Kultti A, Tammi MI, Flamion B. Synthesis and fragmentation of hyaluronan in renal ischaemia *Nephrol Dial Transplant.* 2012; **27(10)**: 3771-81.

Deetjen P, Kramer K. The relation of O₂ consumption by the kidney to Na re-resorption. *Pflugers Arch GesamtePhysiol Menschen Tiere* 1961; **273**:636-50.

Delbridge MS, Shrestha BM, Raftery AT, El Nahas AM, Haylor JL. The effect of body temperature in a rat model of renal ischemia reperfusion injury. *Transplant Proc* 2007; **39**: 2983-85.

Deterding LJ, Barr DP, Mason RP, Tomer KB. Characterization of cytochrome c free radical reactions with peptides by mass spectrometry. *J Biol Chem* 1998; **273**: 12863-9.

Devarajan P. Cellular and molecular derangements in acute tubular necrosis. *Curr Opin Pediatr* 2005; **17(2)**:193-9.

Dormandy TL. An approach to free radicals. *Lancet* 1983; **2**: 1010-14.

Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; **82**: 47-95.

Duffy SJ, Keaney JF Jr, Holbrook M, Gokce N, Swedloff PL, Frei B. Short and longterm black tea consumption reserves endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001; **104**: 151-56.

Eiserich JP, Cross CE, Jones AD, Halliwell B, van der Vliet A. Formation of nitrating and chlorinating species by reaction of nitrite with hypochlorous acid. A novel mechanism for nitric oxide-mediated protein modification. *J Biol Chem* 1996; **271**: 19199-208.

Eiserich, JP, Hristova M, Cross CE, Jones AD, Freeman BA, Halliwell B, van der Vliet A. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* 1998; **391**: 393-97.

Ellenberger C, Schweizer A, Diaper J, Kalangos A, Murith N, Katchatourian G, Panos A, Licker M. Incidence, risk factors and prognosis of changes in serum creatinine early after aortic abdominal surgery. *Intensive Care Med* 2006; **32(11)**: 1808-16.

Ernster L, Dallner G. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochim Biophys Acta* 1995; **1271**: 195-204.

Fenn W.O, Gerschman R, Gilbert D.L, Terwilliger D.E, Cothran F.V. Mutagenic effects of high oxygen tensions on Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci US A* 1957; **43(12)**:1027-32.

Fernández Iglesias A, González Núñez L, Calunga Fernández JL, Rodríguez Salgueiro S, Santos Febles E. Ozone postconditioning in renal ischaemia-reperfusion model. Functional and morphological evidences. *Nefrología* 2011; **31(4)**: 464-70.

Fernández V, Castillo I, Tapia G, Romanque P, Uribe-Echevarría S, Uribe M, Cartier-Ugarte D, Santander G, Vial MT, Videla LA. Thyroid hormone preconditioning: protection against ischemia-reperfusion liver injury in the rat. *Hepatology* 2007; **45(1)**: 170-7.

Fernández V, Tapia G, Varela P, Castillo I, Mora C. Redox up-regulated expression of rat liver manganese superoxide dismutase and Bcl-2 by thyroid hormone is associated with inhibitor of IB- phosphorylation and nuclear factor-B activation. *J Endocrinol* 2005; **186**: 539-547.

Fernández V, Tapia G, Varela P, Videla LA. Redox regulation of thyroid hormone-induced Kupffer cell-dependent IB- phosphorylation in relation to inducible nitric oxide synthase expression. *Free Radic Res* 2005; **39**: 411-18.

Fernando AR, Armstrong DM, Griffiths JR, Hendry WF, O'Donoghue EP, Perrett D, Ward JP, Wickham JE. Enhanced preservation of the ischaemic kidney with inosine. *Lancet*.1976; **1(7959)**: 555-7.

Foote CS, Gozne TE, Lehrer RI. Assessment of chlorination by human neutrophils. *Nature* 1983; **301**: 715-26.

Forsmark-Andrée P, Dallner G, Ernster L. Endogenous ubiquinol prevents protein modification accompanying lipid peroxidation in beef heart submitochondrial particles. *Free Radic Biol Med* 1995; **19**: 749-57.

Frei B, Stocker R, England L, Ames BN. Ascorbate: the most effective antioxidant in human blood plasma. *Adv Exp Med Biol* 1990; **264**: 155-63.

Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 1995; **64**:97-112.

Glaumann B, Glaumann H, Berezsky IK, Trump BF. Studies on the pathogenesis of ischemic cell injury. II. Morphological changes of the pars convoluta (P1 and P2) of the proximal tubule of the rat kidney made ischemic in vivo. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1975; **19(4)**: 281-302.

Glaumann B, Trump BF. Studies on the pathogenesis of ischemic cell injury. III. Morphological changes of the proximal pars recta tubules (P3) of the rat kidney made ischemic in vivo. *Virchows Arch B Cell Pathol.* 1975; **19(4)**: 303-23.

Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1994; **81(5)**: 637-47.

Granger DN, Rutili G, McCord JM. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology* 1981; **81(1)**:22-9.

Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1988; **255(6 Pt 2)**:H1269-75.

Green CJ, Healing G, Lunec J, Fuller BJ, Simpkin S. Evidence of free-radical-induced damage in rabbit kidneys after simple hypothermic preservation and autotransplantation. *Transplantation* 1986; **41(2)**:161-5.

Haglund U, Lundgren O. Intestinal ischemia and shock factors. *Fed Proc* 1978; **37(13)**:2729-33.

Halliwell B. Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo? *FreeRadical Res* 1996; **25(5)**: 439- 54.

Hammet FS. Studies of thyroid apparatus; role of thyroid and parathyroid glands in growth of liver, kidneys and spleen. *Am J Anat* 1927; 39: 239-66.

Hansson R, Gustafsson B, Jonsson O, Lundstam S, Pettersson S, Schersten T, Waldenström J. Effect of xanthine oxidase inhibition on renal circulation after ischemia. *Transplantation Proc* 1982;**14**: 51-8.

Hansson R, Jonsson O, Lundstam S, Pettersson S, Scherstén T, Waldenström J. Effects of free radical scavengers on renal circulation after ischemia in the rabbit. *ClinSci (Lond)*1983; **65(6)**: 605-10.

Hayaishi o, Shimizu T. Metabolic and functional significance of prostaglandins in lipid peroxide research. *Lipid peroxides biology and medicine* 1982; 41-43.

Hazen SL, Heinecke JW. 3-chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low-density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima. *J Clin Invest* 1997; **99**: 2075-81.

Hazen SL, Zhang R, Shen Z, Wu W, Podrez EA, MacPherson JC. Formation of nitric oxide-derived oxidants by myeloperoxidase in monocytes: pathways for monocyte mediated protein nitration and lipid peroxidation in vivo. *Circ Res* 1999; **85**: 950-58.

Hems DA, Brosnan JT. Effects of ischaemia on content of metabolites in rat liver and kidney in vivo.*Biochem J* 1970; **120(1)**:105-11.

Herrler T, Wang H, Tischer A, Schupp N, Lehner S, Meyer A, Wallmichrath J, Habicht A, Mfarrej B, Anders HJ, Bartenstein P, Jauch KW,

Hacker M, Guba M. Decompression of inflammatory edema along with endothelial cell therapy expedites regeneration after renal ischemia-reperfusion injury. *Cell Transplant.* 2013; **22(11)**: 2091-103.

Hertle L, Garthoff B. Calcium channel blocker nisoldipino limits ischemic damage in rat kidney. *J Urol* 1985; **134(6)**: 1251-4.

Hoch FL. Biochemical actions of thyroid hormones. *Physiol. Rev* 1962; **42**: 605-73.

Holmes G, DiScala V. Studies of the exaggerated natriuretic response to a saline infusion in the hypothyroid rat. *J. Clin. Invest* 1970; **49**: 1224-36.

Hoste EA, Kellum JA. Acute kidney injury: epidemiology and diagnostic criteria. *Curr Opin Crit Care* 2006; **12(6)**:531-7.

Huang A, Vita JA, Venema RC, Keaney JF Jr. Ascorbic acid enhances endothelial nitric-oxide synthase activity by increasing intracellular tetrahydrobiopterin. *J Biol Chem* 2000; **275**: 17399-406.

Humes HD, Cieslinski DA, Coimbra TM, Messana JM, Galvao C. Epidermal growth factor enhances renal tubule cell regeneration and repair and accelerates the recovery on renal function in postischemic acute renal failure. *J Clin Invest* 1989;**84**: 1757-61.

Humes HD, Cieslinski DA, Johnson LB, Sanchez IO. Triiodothyronine enhances renal tubule cell replication by stimulating EGF receptor gene expression. *Am J Physiol* 1992; **262 (4 Pt 2)**: F540-F545.

Ismail-Beigi F, Edelman IS. Effects of thyroid status on electrolyte distribution in rat tissues. *Am J Physiol* 1973; **225(5)**:1172-7.

Jang HR, Ko GJ, Wasowska BA, Rabb H. The interaction between ischemia-reperfusion and immune responses in the kidney. *J Mol Med (Berl)* 2009; **87**: 859-864.

JohnsonLB, Sánchez IO, Cieslinski DA, Humes HD. Cellular and molecular mechanisms of thyroid hormone enhancement of renal function recovery in acute renal failure. *Proc Am Soc Nephrol* 1989; **22**: 297A .

KaizuT,Tamaki T, Tanaka M, Uchida Y, Tsuchihashi S, Kawamura A, Kakita A. Preconditioning with tin-protoporphyrin IX attenuates ischemia/reperfusion injury in the rat kidney. *Kidney Int* 2003; **63**: 1393-403.

Katz AI, Emmanouel DS, Lindheimer MD. Thyroid hormone and the kidney. *Nephron* 1975; **15(3-5)**: 223-49.

Katz AI, Lindheimer MD. Renal sodium- and potassium-activated adenosine triphosphatase and sodium reabsorption in the hypothyroid rat. *J Clin Invest* 1973; **52(4)**: 796-804.

Kettle AJ, Winterbourn CC. Myeloperoxidase: A key regulator of neutrophil oxidant production. *Redox. Rep* 1997; **3**: 3-15.

Kim YO, Li C, Sun BK, Kim JS, Lim SW, Choi BS, Kim YS, Kim J, Bang BK, Yang CW.Preconditioning with 1,25-dihydroxyvitamin D3 protects against subsequent ischemia-reperfusion injury in the rat kidney. *Nephron Exp Nephrol* 2005; **100**: e85-94.

Klebanoff SJ, Clark RA. The neutrophil: functions and clinical disorders. *Elsevier Scientific Publishing Co.* 1978.

Ko GJ, Jang HR, Huang Y, Womer KL, Liu M, Higbee E, Xiao Z, Yagita H, Racusen L, Hamad AR, Rabb H. Blocking Fas ligand on leukocytes attenuates kidney ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol*2011; **22(4)**: 732-42.

Koizumi T, Yamane Y. Protective effect of sodium molybdate on the acute toxicity of mercuric chloride. V. Enhancement of renal regeneration after exposure to HgCl₂. *ChemBiol Interact* 1988; **67**: 185-97.

Kribben A, Wieder ED, Wetzels JF, Yu L, Gengaro PE, Burke TJ, Schrier RW. Evidence for role of cytosolic free calcium in hypoxia-induced proximal tubule injury. *J Clin Invest* 1994; **93(5)**: 1922-9.

Krinsky NI. Singlet excited oxygen as a mediator of the antibacterial action of leukocytes. *Science* 1974; **186**: 363-65.

Kurz CR, Kissner R, Nauser T, Perrin D, Koppenol WH. Rapid scavenging of peroxynitrous acid by monohydroascorbate. *Free Radic Biol Med* 2003; **35**: 1529-37.

Lameire N, Vanholder R. Pathophysiologic features and prevention of human and experimental acute tubular necrosis. *J Am Soc Nephrol* 2001; **12**: S20-S32.

Laurent G, Maldague P, Carlier MB, Tulkens PM. Increased renal DNA synthesis in vivo after administration of low doses of gentamicin to rats. *Antimicrob Agents Chemother* 1983; **24**: 586-93.

Leeuwenburg C, Ardí MM, Hazen SL, Wagner P, Oh-ishi S, Steinbrecher UP. Reactive nitrogen intermediates promote low density lipoprotein oxidation in human atherosclerotic intima. *J Biol Chem* 1997; **272**: 1433-36.

Legrand M, Mik EG, Johannes T, Payen D, Ince C. Renal hypoxia and dysoxia after reperfusion of the ischemic kidney. *Mol Med* 2008; **14**: 502-516.

Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; **282(2)**: C227-41.

Liaño F, Pascual J. Epidemiology of acute renal failure: a prospective, multicenter, community-based study. Madrid Acute Renal Failure Study Group. *Kidney Int* 1996; **50(3)**: 811-8.

Lin HY, Sun M, Tang HY, Lin C, Luidens MK, Mousa SA, Incerpi S, Drusano GL, Davis FB, Davis PJ. L-Thyroxine vs. 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and cell proliferation: activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2009; **296(5)**:C980-91.

Lindahl T, Satoh MS, Poirier GG, Klungland A. Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks. *Trends Biochem Sci* 1995; **20(10)**: 405-11.

Lo CS, Edelman IS. Effect of triiodothyronine on the synthesis and degradation of renal cortical (Na⁺/K⁺)-adenosine triphosphatase. *J Biol Chem* 1976; **251**: 7834-40.

Logue SE, Gustafsson AB, Samali A, Gottlieb RA. Ischemia/reperfusion injury at the intersection with cell death. *J Mol Cell Cardiol* 2005; **38(1)**: 21-33.

Marquez LA, Dunford HB, Van Wart H. Kinetic studies on the reaction of compound II of myeloperoxidase with ascorbic acid. Role of ascorbic acid in myeloperoxidase function. *J Biol Chem* 1990; **265**: 5666-70.

Martin DR, Lewington AJ, Hammerman MR, Padanilam BJ. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase attenuates ischemic renal injury in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000; **279**: R1834-R 1840.

Matés JM, Sánchez-Jiménez F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front Biosci* 1999; **4**: d339-45.

Matsumura G, Herp A, Pigman W. Depolymerization of hyaluronic acid by autoxidants and radiations. *Radiat Res* 1966; **28(4)**: 735-52.

Maxwell SR, Lip GY. Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. *Int J Cardiol*1997; **58(2)**: 95-117.

May JM, Cobb CE, Mendiratta S, Hill KE, Burk RF. Reduction of the ascorbyl free radical to ascorbate by thioredoxinreductase. *J Biol Chem* 1997; **272**: 22607-10.

Mc Cord JM. Oxygen derived free radicals in postischemict issue injury. *N Eng J Med* 1985; **17**:159-62.

Mc Cord JM. The superoxide free radical: its biochemistry and pathophysiology. *Surgery*1983; **94**:407-14.

Medeiros PJ, VillarimNeto A, Lima FP, Azevedo IM, Leão LR, Medeiros AC.Effect of sildenafil in renal ischemia/reperfusion injury in rats.*Acta CirBras*2010; **25(6)**: 490-5.

Mendiratta S, Qu ZC, May JM. Enzyme-dependent ascorbate recycling in human erythrocytes, role of thioredoxinreductase.*Free RadicBiol Med* 1998; **25**: 221-8.

Michael UF, Logan JL, Meeks LA. The beneficial effects of thyroxine on nephrotoxic acute renal failure in the rat.*J Am Soc Nephrol*.**1**: 1236-40 (1991).

Molitoris BA. Actin cytoskeleton in ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 2004; **66(2)**:871-83.

Moreno JM, Rodriguez Gomez I, Wangensteen R, Perez-Abud R, Duarte J, Osuna A, Vargas F. Mechanisms of hydrogen peroxide-induced vasoconstriction in the isolated perfused rat kidney. *J Physiol Pharmacol*2010; **61(3)**: 325-32.

Mousa SS, Davis FB, Davis PJ, Mousa SA. Human platelet aggregation and degranulation is induced in vitro by L-thyroxine, but not by 3,5,3'-triiodo-L-

thyronine or diiodothyropropionic acid (DITPA). *Clin Appl Thromb Hemost* 2010; **16(3)**: 288-93.

Mukai K, Kikuchi S, Urano S. Stopped-flow kinetic study of regeneration reaction of tocopheroxyl radical by reduced ubiquinone-10 in solution. *Biochim Biophys Acta* 1990; **1035**: 77-82.

Murry CE, Jennings RB, Reimer KE. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; **74**:1124-36.

Najarian JS, Gillingham KJ, Sutherland DE, Reinsmoen NL, Payne WD, Matas AJ. The impact of the quality of initial graft function on cadaver kidney transplants. *Transplantation* 1994; **57(6)**: 812-6.

Nath KA, Norby SM. Reactive oxygen species and acute renal failure. *Am J Med* 2000; **109(8)**: 665-78.

Nauseef WM, Malech HL. Analysis of the peptide subunits of human neutrophil myeloperoxidase. *Blood* 1986; **67**: 1504-07.

Nauta RJ, Tsimoyiannis E, Uribe M, Walsh DB, Miller D, Butterfield A. The role of calcium ions and calcium channel entry blockers in experimental ischemia-reperfusion-induced liver injury. *Ann Surg* 1991; **213(2)**: 137-42.

Neuzil J, Stocker R. Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin. *FEBS Lett* 1993; **331**: 281-4.

Neuzil J, Stocker R. Free and albumin-bound bilirubin are efficient co-antioxidants for alpha-tocopherol, inhibiting plasma and low-density lipoprotein lipid peroxidation. *J Biol Chem* 1994; **269(24)**: 16712-9.

Nicholson ML, Wheatley TJ, Horsburgh T, Edwards CM, Veitch PS, Bell PR. The relative influence of delayed graft function and acute rejection on renal transplant survival. *Transplant* 1996; **9(4)**: 415-9.

Noiri E, Nakao A, Uchida K, Tsukahara H, Ohno M. Oxidative and nitrosative stress in acute renal ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; **281**: F948-F957.

O'Valle F, Benítez MC, Gómez-Morales M, Bravo J, Osuna A, del Moral RM, Martín-Oliva D, Oliver FJ, del Moral RG. Correlation of morphological findings with functional reserve in the aging donor: role of the poly (ADP-ribose) polymerase. *Transplant Proc* 2004; **36(3)**:733-5.

O'Valle F, Del Moral RG, Benítez MC, Martín-Oliva D, Gómez-Morales M. Poly [ADP-ribose] polymerase-1 expression is related to cold ischemia, acute tubular necrosis, and delayed renal function in kidney transplantation. *PLoS One* 2009; **4(9)**: e7138.

Obal D, Dettwiler S, Favoccia C, Rascher K, Preckel B, Schlack W. Effect of sevoflurane preconditioning on ischemia/reperfusion in the rat kidney in vivo. *Eur J Anaesthesiol* 2006; **23**: 319-26.

Ohkawa, H, Ohishi N, and Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; **95**: 351-358.

Oliver FJ, Ménissier-de Murcia J, Nacci C, Decker P, Andriantsitohaina R, Muller S, de la Rubia G, Stoclet JC, de Murcia G. Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly(ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice. *EMBO J* 1999; **18(16)**: 4446-54.

Ouriel K, Smedira NG, Ricotta JJ. Protection of the kidney after temporary ischemia: free radical scavengers. *J Vasc Surg* 1985; **2(1)**: 49-53.

Owens ML, Lazarus HM, Wolcott MW, Maxwell JG, Taylor JB. Allopurinol and hypoxanthine pretreatment of canine kidney donors. *Transplantation* 1974; **17(4)**: 424-7.

Oztosun M, Akgul EO, Cakir E, Cayci T, Uysal B, Ogur R, Ozcan A, Ozgurtas T, Guven A, Korkmaz A. The effects of medical ozone therapy on renal ischemia/reperfusion injury. *Ren Fail* 2012; **34(7)**: 921-5.

Paller MS, Hebbel RP. Ethane production as a measure of lipid peroxidation after renal ischemia. *Am J Physiol* 1986; **251(5 Pt 2)**: F839-43.

Paller MS, Hoidal JR, Ferris TF. Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in therat. *J Clin Invest* 1984; **74(4)**: 1156-64.

Paller MS. The cell biology of reperfusion injury in the kidney. *J Investig Med* 1994; **42(4)**: 632-9.

Park KM, Byun JY, Kramers C, Kim JI, Huang PL, Bonventre JV. Inducible nitric oxide synthase is an important contributor to prolonged protective effects of ischemic preconditioning in the mouse kidney. *J Biol Chem* 2003; **278(29)**: 256-66.

Parks DA, Granger DN. Ischemia-induced vascular changes: role of xanthine oxidase and hydroxyl radicals. *Am J Physiol* 1983; **245(2)**: G285-9.

Parra C, Salas P, Dominguez J. Effects of immunosuppressive drugs on rat renal ischemia reperfusion injury. *Transplant Proc* 2010; **42**: 245-247.

Patel N, Chatterjee P, Chatterjee B, Cuzzocrea S, Serraino I, Brown P, Stewart K, Mota-Filipe H, Thiemermann C. Tempone reduces renal dysfunction and injury mediated by oxidative stress of the rat kidney. *Free Radic Biol Med* 2002; **33(11)**: 1575-89.

Patschan D, Krupincza K, Patschan S, Zhang Z, Hamby C, Goligorsky MS. Dynamics of mobilization and homing of endotelial progenitor cells after acute renal ischemia: modulation by ischemic preconditioning. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; **291**: F176-85.

Patterson CE, Rhoades RA. Protective role of sulfhydryl reagents in oxidant lung injury. *Exp Lung Res* 1988; **14 Suppl**: 1005-19.

Peters J, Foote C. Chemistry of superoxide ion. Reaction with hydroperoxides. *J Am Chem Soc* 1976; **98**: 873-875.

Petrone W, English D, Wong K, McCord JM. Free radicals and inflammation superoxide dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma. *Proc Natl. Acad. Sci* 1980; **77**: 1159-63.

Poli G, Leonarduzzi G, Biasi F, Chiarpotto E. Oxidative stress and cell signalling. *Curr Med Chem* 2004; **11**: 1163-82.

Preuss HG. Tubular function in experimental acute tubular necrosis in rats. *Kidney Int* 1976; **10**: S51-57.

Ramalho RJ, de Oliveira PS, Cavaglieri RC, Silva C, Medeiros PR, Filho DM, Poli-de-Figueiredo LF, Noronha IL. Hyperbaric oxygen therapy induces kidney protection in an ischemia/reperfusion model in rats. *Transplant Proc* 2012; **44(8)**: 2333-6.

Ratych RE, Bulkley GB. Free-radical-mediated postischemic reperfusion injury in the kidney. *J Free Radic Bio IMed* 1986; **2(5-6)**: 311-9.

Reimer KA, Ganote CE, Jennings RB. Alterations in renal cortex following ischemic injury. 3. Ultrastructure of proximal tubules after ischemia or autolysis. *Lab Invest.* 1972; **26(4)**: 347-63.

Rodriguez F, Bonacasa B, Fenoy FJ, Salom MG. Reactive oxygen and nitrogen species in the renal ischemia/reperfusion injury. *Curr Pharm Des* 2013; **19(15)**: 2776-94.

Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 1973; **179**: 588-90.

Salman IM, Sattar MA, Abdullah NA, Ameer OZ, Yam MF, Kaur G, Hye Khan MA, Johns EJ. Renal ischemic injury affects renal hemodynamics and excretory functions in Sprague Dawley rats: involvement of renal sympathetic tone. *Ren Fail* 2010; **32(1)**: 96-102.

Schraufstatter IU, Hyslop PA, Hinshaw DB, Sklar LA. Hydrogen peroxide-induced injury of cells and its prevention by inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Proc Natl Acad Sci* 1986 USA; **83**: 4908-12.

Schrier R, Wang W, Poole B, Mitra A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *J Clin Invest* 2004; **114(1)**: 5-14.

Schrier RW, Wang W, Poole B, Mitra A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *J Clin Invest* 2004; **114(1)**: 5-14.

Schulte-Wissermann H, Straub E, Funke PJ. Influence of L-thyroxine upon enzymatic activity in the renal tubular epithelium of the rat under normal conditions and in mercury-induced lesions. I. Histochemical studies of alkaline phosphatase, acid phosphatase, adenosine-tri-phosphatase and leucine-aminopeptidase. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1977; **23**: 163-73.

Schulte-Wissermann H, Straub E, Funke PJ. Influence of L-thyroxine upon enzymatic activity in the renal tubular epithelium of the rat under normal conditions and in mercury-induced lesions. II. Histochemical studies of lactate dehydrogenase, succinate dehydrogenase, malate dehydrogenase, unspecific esterase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1977; **23**: 175-84.

Schulte-Wissermann H, Straub E. Intravital uptake of trypan blue in the epithelial cells of the proximal renal tubule following sublimate intoxication and subsequent treatment with L-thyroxine. *Virchows Arch A Pathol Anat* 1973; **359(3)**: 255-66.

Senturk H, Kabay S, Bayramoglu G, Ozden H, Yaylak F. Silymarin attenuates the renal ischemia/reperfusion injury-induced morphological changes in the rat kidney. *World J Urol* 2008; **26**: 401-407.

Shall S, de Murcia G. Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model? *Mutat Res* 2000; **460(1)**:1-15.

Shapiro JI, Cheung C, Itabashi A, Chan L, Schrier RW. The effect of verapamil on renal function after warm and cold ischemia in the isolated perfused rat kidney. *Transplantation* 1985; **40(6)**: 596-600.

Siegel NJ, Gaudio KM, Katz LA. Beneficial effect of thyroxin on recovery from toxic acute renal failure. *Kidney Int* 1984; **25**: 906-11.

Sindram D, Rüdiger HA, Upadhyya AG, Strasberg SM, Clavien PA. Ischemic preconditioning protects against cold ischemic injury through an oxidative stress dependent mechanism. *J Hepatol* 2002; **36**:78-84.

Squadrito GL, Cueto R, Splenser AE, Valavanidis A, Zhang H, Uppu RM. Reaction of uric acid with peroxynitrite and implication for the mechanism of neuroprotection by uric acid. *Arch Biochem Biophys* 2000; **376**: 333-7.

Stephan F, Jahn H. Tubulopathie degenerative du rein au cours d l'hypothyroidisme chronique du rat. *C. r. Séanc. Soc. Biol* 1961; **155**: 904-917.

Stephan F, Reville P, DeLaharpe F, Köll-Back MH. Impairment of renal compensatory hypertrophy by hypothyroidism in the rat. *Life Sci* 1982; **30**: 623-31.

Straub E. Einfluss von Thyroxin auf den Verlauf des akuten Nierenversagens II. Einfluss der L-Thyroxin- Applikation auf P|asmaspiegel und renale Ausscheidung verschiedener Substanzen bei Kaninchen mit manifestem akutem Nierenversagen (Untersuchungen am Modell der sog. Sublimatnephrose). *Z GesExp Med* 1971; **155**: 32-55.

Straub E. Einfluss von Thyroxin auf den Verlauf des akuten Nierenversagens. I. Einfluss der L-Thyroxin - Applikation auf die Letalit|it von Kaninchen und M|iusen mit manifestem akutem Nierenversagen (Untersuchungen am Modell der sog. Sublimatnephrose). *Z Ges Exp Med* 1971; **154**: 177-186.

Strauss MB. Mechanism of thyroid stimulation of metabolism. *Ann Intern Med* 1971; **74(5)**: 793-4.

Sutter PM, Thulin G, Stromski M, Ardito T, Gaudio KM. Beneficial effect of thyroxin in the treatment of ischemic acute renal failure. *Pediatr Nephrol* 1988; **2**: 1-7.

Swaminathan S., Griffin M. First responders: understanding monocyte-lineage traffic in the acutely injured kidney. *Kidney International*, 2008; **74**:1509–1511.

Szabó C, Dawson VL. Role of poly(ADP-ribose) synthetase in inflammation and ischemia-reperfusion. *Trends Pharmacol Sci* 1998; **19(7)**: 287-98.

Szabó C, Lim LH, Cuzzocrea S, Getting SJ, Zingarelli B, Flower RJ, Salzman AL, Perretti M. Inhibition of poly (ADP-ribose) synthetase attenuates neutrophil recruitment and exerts anti-inflammatory effects. *J Exp Med* 1997; **186(7)**: 1041-9.

Tamba M, O'Neill P. Redox reactions of thiol free radicals with the anti-oxidants ascorbate and chlorpromazine: role in radioprotection. *J Chem Soc Perkin Trans* 1991; **2**: 1681-5.

Tapia G, Fernández V, Varela P, Cornejo P, Guerrero J. Thyroid hormone-induced oxidative stress triggers nuclear factor-B and cytokine gene expression in rat liver. *Free Radic Biol Med* 2003; **35**: 257-265.

Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV. Acute renal failure. *NEngl J Med* 1996; **334(22)**: 1448-60.

Thiemermann C, Bowes J, Myint FP, Vane JR. Inhibition of the activity of poly(ADP-ribose) polymerase synthetase reduces ischemia-reperfusion injury in the heart and skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci* 1997 USA; **94**: 679-683.

Thomas EL, Jefferson MM, Grisham MB. Myeloperoxidase-catalyzed incorporation of amines into proteins: role of hypochlorous acid and dichloramines. *Biochemistry* 1982; **21**: 6299-308.

Toledo-Pereyra LH, Simmons RL, Olson LC, Najarian JS. Clinical effect of allopurinol on preserved kidneys: a randomized double-blind study. *Ann Surg* 1977; **185(1)**: 128-31.

Torras J, Herrero-Fresneda I, Lloberas N, Riera M, Cruzado J, Grinyó J. Promising effects of ischemic preconditioning in renal transplantation. *Kidney Int* 2002; **61**: 2218.

Troncoso P, Smook G, Videla I.A. Potentiation of ischemia-reperfusion liver injury by hyperthyroidism in the rat. *Free Radical Biol Med* 1997; **23**: 19-25.

Tulin A, Stewart D, Spradling AC. The *Drosophila* heterochromatic gene encoding poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) is required to modulate chromatin structure during development. *Genes Dev* 2002; **16(16)**: 2108-19.

Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 2003; **552 (2)**: 335-44.

Ursini F, Heim S, Kiess M, Maiorino M, Roveri A, Wissing J. Dual function of the seleno protein PHGPx during sperm maturation. *Science* 1999; **285**: 1393-96.

Ursini F, Maiorino M, Gregolin C. The selenoenzyme phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta* 1985; **839**: 62-70.

Van der Vliet A, Eiserich JP, Halliwell B, Cross CE. Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. A potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity. *J Biol Chem* 1997; **272**: 7617-25.

Vanderklis PW, Bahr BA. The pathogenic activation of calpain: a marker and mediator of cellular toxicity and disease states. *Int J Exp Pathol* 2000; **81(5)**: 323-39.

Vasko KA, DeWall RA, Riley AM. Effect of allopurinol in renal ischemia. *Surgery* 1972; **71(5)**: 787-90.

Vaziri ND, Dicus M, HoND, Boroujerdi-Rad L, Sindhu RK. Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency. *Kidney Int* 2003; **63**: 179-85.

Venkatachalam MA, Bernard DB, Donohoe JF, Levinsky NG. Ischemic damage and repair in the rat proximal tubule: differences among the S1, S2, and S3 segments. *Kidney Int* 1978; **14(1)**: 31-49.

Virág L, Szabó C. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* 2002; **54(3)**: 375-429.

Vogt MT, Farber E. On the molecular pathology of ischemic renal cell death. Reversible and irreversible cellular and mitochondrial metabolic alterations. *Am J Pathol* 1968 ;**53(1)**: 1-26.

Wahhabaghai H, Rasoulia B, Esmaili M, Mehrani HA, Mohammadhosseniakbari H, Mofid M, Jafari M, Noroozi M, Foadoddini M, Asgai A, Khoshbaten A. Hyperoxia-induced protection against rat's renal ischemic damage: relation to oxygen exposure time. *Ren Fail* 2009; **31(6)**: 514-21.

Warnick CT, Lazarus HM. Decreased RNA polymerase activity after organ storage. *Exp Mol Pathol* 1980; **33(2)**: 123-32.

Weight SC, Bell PR, Nicholson ML. Renal ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1996; **83(2)**: 162-70.

Weiss SJ, Klein R, Slivka A, Wei M. Chlorination of taurine by human neutrophils. Evidence for hypochlorous acid generation. *J Clin Invest* 1982; **70**: 598-607.

Whitin JC, Bhamre S, Tham DM, Cohen HJ. Extracellular glutathione peroxidase is secreted basolaterally by human renal proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; **283**: F20-F28.

Winterbourn CC, van den Berg JJ, Roitman E, Kuypers FA. Chlorohydrin formation from unsaturated fatty acids reacted with hypochlorous acid. *Arch Biochem Biophys* 1992; **296**: 547-555.

Witting PK, Westerlund C, Stocker R. A rapid and simple screening test for potential inhibitors of tocopherol-mediated peroxidation of LDL lipids. *J Lipid Research* 1996; **37**: 853-67.

Wong GT, Irwin MG. Contrast-induced nephropathy. *Br J Anaesth* 2007; **99(4)**: 474-83.

Wu TW, Carey D, Wu J, Sugiyama H. The cytoprotective effects of bilirubin and biliverdin on rat hepatocytes and human erythrocytes and the impact of albumin. *Biochem Cell Biol* 1991; **69**: 828-34.

Wu TW, Hashimoto N, Au JX, Wu J, Mickle DA, Carey D. Trolox protects rat hepatocytes against oxyradical damage and the ischemic rat liver from reperfusion injury. *Hepatology* 1991; **13(3)**: 575-80.

Wu TW, Wu J, Li RK, Mickle D, Carey D. Albumin-bound bilirubins protect human ventricular myocytes against oxyradical damage. *Biochem Biophys* 1992; **294**: 75-82.

Yang B, Hosgood SA, Harper SJ, Nicholson ML. Leucocyte depletion improves renal function in porcine kidney hemoreperfusion through reduction of myeloperoxidase+ cells, caspase-3, IL-1 β , and tubular apoptosis. *J Surg Res* 2010; **164**: e315-e324.

Yang CW, Ahn HJ, Jung JY, Kim WY, Li C, Choi BS, Kim HW, Kim YS, Moon IS, Kim J, Bang BK. Preconditioning with cyclosporine A or FK506 differentially regulates mitogen-activated protein kinase expression in rat kidneys with ischemia/reperfusion injury. *Transplantation* 2003; **75(1)**: 20-4.

Yang CW, Li C, Jung JY, Shin SJ, Choi BS, Lim SW, Sun BK, Kim YS, Kim J, Chang YS, Bang BK. Preconditioning with erythropoietin protects against subsequent ischemia-reperfusion injury in rat kidney. *FASEB J* 2003; **17**: 1754-5.

Yelamos J, Oliver FJ. Role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) in the inflammatory response. *Inmunología* 2002; **21**: 219-27.

Yoshioka T, Bills T, Moore-Jarrett T, Greene HL, Burr IM, Ichikawa I. Role of intrinsic antioxidant enzymes in renal oxidant injury. *Kidney Int* 1990; **38(2)**: 282-8.

Yu SY, Chiu JH, Yang SD, Yu HY, Hsied CC. Preconditioned hyperbaric oxygenation protects the liver against ischemia-reperfusion injury in rats. *J Surg Res* 2005; **128**: 28-36.

Zager RA, Baltes LA, Sharma HM, Jurkowitz MS. Responses of the ischemic acute renal failure kidney to additional ischemic events. *Kidney Int* 1984; **26**: 689-700.

Zheng J, Devalaraja-Narashimha K, Singaravelu K, Padanilam BJ. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 gene ablation protects mice from ischemic renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; **288**: F387-F398.