

Efecto protector de los bloqueantes del calcio en el fracaso renal agudo de tipo isquémico. Estudio experimental funcional, histológico y ultraestructural

A. Alvarez*, E. V. Martul**, F. Veiga***, F. Valdés**** y J. Forteza*****

Hospital Juan Canalejo. La Coruña.

* Adjunto Anatomía Patológica. Hospital Juan Canalejo. La Coruña. ** Jefe de Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Juan Canalejo. La Coruña.

*** Adjunto Urología. Hospital Juan Canalejo. La Coruña. **** Jefe de Servicio Nefrología. Hospital Juan Canalejo. La Coruña. ***** Jefe de Servicio Anatomía Patológica. Hospital General de Galicia. Santiago de Compostela.

RESUMEN

Este trabajo experimental, desarrollado en conejos, estudia desde un punto de vista funcional y morfológico el efecto de los bloqueantes del calcio (BEC) (verapamil) en el fracaso renal agudo isquémico (FRA-isquémico). Tres grupos experimentales fueron diferenciados: grupo A, control sin isquemia; grupo B, con isquemia sin tratamiento, y grupo C, con isquemia y tratamiento con verapamil. Funcionalmente se observó que el grupo de conejos tratados con BEC presentó un aclaramiento de creatinina mejor conservado que el grupo de conejos con isquemia sin tratamiento a las veinticuatro horas (0,77 ml/min/kg versus 0,13 ml/min/kg, $p < 0,005$), a las cuarenta y ocho horas (0,73 ml/min/kg versus 0,35 ml/min/kg, $p < 0,05$) y a las setenta y dos horas (0,90 ml/min/kg versus 0,46 ml/min/kg, $p < 0,005$). Histológicamente también se comprobó una mejor conservación en este grupo del reborde en cepillo del túbulo proximal ($p < 0,005$), un menor número de células en descamación o protrusión hacia la luz tubular ($p < 0,005$) y una menor incidencia de infiltrado inflamatorio ($p < 0,05$). El estudio ultraestructural, realizado en material perfundido y fijado in vivo, demostró también una mejor conservación ultraestructural en el grupo tratado con BEC, con menor pérdida del reborde en cepillo ($p < 0,0005$), menor edema celular ($p < 0,005$), menor rotura celular ($p < 0,01$), mejor conservación mitocondrial ($p < 0,005$), un laberinto basal lateral (LBL) del túbulo proximal (TP) menos aplanado ($p < 0,05$) y una menor hipertrofia de bandas de actina en los túbulos ($p < 0,05$). Estos resultados sugieren que los BEC, y concretamente el verapamil, protegen al túbulo renal del daño isquémico, pudiendo ser muy útiles en el tratamiento del FRA de tipo isquémico.

Palabras clave: **Fracaso renal agudo. Bloqueantes del calcio. Verapamil. Microscopía óptica. Microscopía electrónica de transmisión.**

Correspondencia: A. Alvarez García.
Servicio de Anatomía Patológica.
Hospital Juan Canalejo.
Las Jubias, s/n.
15006 La Coruña.

Realizado con la aportación Beca del FISS, N.º 90/0591.

PROTECTIVE EFFECT OF CALCIUM CHANNEL BLOCKING AGENTS IN ISCHEMIC ACUTE RENAL FAILURE. AN EXPERIMENTAL, FUNCTIONAL HISTOLOGICAL AND ULTRASTRUCTURAL STUDY

SUMMARY

We present the experimental work on the functional and morphological effects of calcium blocking agents (CBA) (Verapamil) in ischemic acute renal failure (Necrosis) (IARF) in rabbits. Three different sets of animals were differentiated: Group «A» were controls without ischemia, Group «B» were animals with ischemia but without treatment with CBA and Group «C» were the rabbits with ischemia and CBA treatment. Functionally the rabbits with ischemia and treatment with CBA showed a better preservation Creatinine Clearance than the ischemic but untreated group at 24 h. (0.77 ml/min/kg versus 0.33 ml/min/kg, $p < 0.005$), 48 h. (0.73 ml/min/kg versus 0.35 ml/min/kg, $p < 0.05$) and 72 h. (0.90 ml/min/kg versus 0.46 ml/min/kg, $p < 0.005$). Histologically a better preservation of the brush border of the proximal tubule ($p < 0.005$) was also demonstrated in this group. Fewer cells were desquamated or protruding into the tubular lumen ($p < 0.005$) and the inflammatory infiltrate was less prominent ($p < 0.005$). The ultrastructural study was done on tissues perfused and fixed *in vivo* and showed a better preservation in the group treated with CBA with a lower loss of the brush border ($p < 0.0005$), less cellular edema ($p < 0.005$) and cell rupture ($p < 0.05$), better mitochondrial preservation ($p < 0.005$), a basal lateral labyrinth of the proximal tubule less flattened ($p < 0.05$) and lesser hypertrophy of the actin bands in the tubules ($p < 0.05$).

These results suggest that CBA and in particular Verapamil protect the renal tubule from the ischemic damage and can be very useful in the treatment of ischemic acute renal failure.

Key words: Acute renal failure. Block calcium. Verapamil. Light microscopy. Transmission electron microscopy.

Introducción

La mortalidad y morbilidad secundaria al fracaso renal agudo de tipo isquémico (FRA-isquémico) sigue siendo un problema médico de máxima importancia. Estudios clínicos realizados recientemente cifran la mortalidad entre un 30-50 %¹⁻³, estimándose que dicha cifra se ha reducido desde la utilización de la hemodiálisis⁴. Un problema adicional en esta patología es el FRA-postrasplante, asociado con una disminución en la supervivencia a corto plazo del trasplante^{5,6}.

En la década de los setenta, diuréticos y vasodilatadores han sido considerados como una terapéutica racional en el tratamiento del FRA⁷⁻⁹, aunque trabajos clínicos realizados no han probado la utilidad de estos fármacos¹⁰⁻¹².

En la década de los ochenta se ha trabajado de una manera experimental con otras sustancias en la prevención de los efectos de la isquemia sobre el túbulo renal. Los bloqueantes del calcio (BEC), y más concretamente el verapamil, diltiazén y nifepidina, han logrado un protagonismo relevante en este campo, realizando numerosos autores trabajos experimentales¹³⁻⁴⁶ sobre los efectos de dichos fármacos en el daño isquémico renal. A consecuencia de la obtención de resultados beneficiosos en la protección del daño isquémico renal¹³⁻³⁴ se han realizado diversos ensayos clínicos, obteniéndose también efectos beneficiosos⁴⁷⁻⁵¹.

Si bien existe un número importante de trabajos que valoran los efectos de los BEC, desde un punto de vista funcional son muy pocos los que realizan estudios morfológicos^{16, 35, 46}.

Este trabajo experimental valora los efectos del verapamil en el FRA-isquémico, tanto desde un punto de vista funcional como morfológico. Sobre este último apartado hemos realizado estudios histológicos y ultraestructurales, utilizando una técnica de perfusión-fijación *in vivo*, con el fin de obtener un material óptimo para dichos estudios.

Material y métodos

Hemos utilizado como método experimental en la provocación del daño isquémico renal el descrito por Soles⁵², realizado en conejos uninefrectomizados, en base a su gran similitud funcional y morfológica con el FRA-isquémico del humano. Se han utilizado conejos neozelandeses machos, con un peso entre 1,9 y 3,1 kg ($M = 2,36 \pm 0,8$ kg). En todos los conejos se han realizado dos estudios completos funcionales previos a su incorporación en el protocolo experimental, sirviéndonos estos resultados como parámetros basales funcionales de normalidad; dichos resultados quedan reflejados en la tabla I en la primera columna.

La anestesia fue inducida con xilazina (Rompun®), 10

Tabla I. Número de túbulos estudiados

	Túbulos proximales	Túbulos distales	Totales
Grupo A (7).....	144	70	214
Grupo B (7).....	152	80	232
Grupo C (7).....	135	82	217
Totales.....	431	232	663

mg/kg de peso, y clorhidrato de ketamina (Ketolar®), 50-75 mg/kg de peso, ambos por vía intramuscular, según método previamente descrito por otros autores⁵³.

Protocolo experimental

Hemos diferenciado tres grupos de conejos:

— Grupo A (n = 7), conejos control sin isquemia, a los que se ha realizado uninefrectomía derecha y técnica de perfusión-fijación *in vivo* del riñón izquierdo intacto setenta y dos horas después de la uninefrectomía derecha.

— Grupo B (n = 7), conejos con isquemia; en este caso realizamos también uninefrectomía derecha, seguida del clampaje del hilio renal izquierdo durante sesenta minutos. Setenta y dos horas más tarde se realizó perfusión-fijación *in vivo* del riñón izquierdo.

— Grupo C (n = 7), conejos con isquemia tratados con verapamil (Manidon®, Knollmade, S. A.); en este caso se procedió de igual manera que en el grupo B, infundiéndoseles a estos conejos clorhidrato de verapamil por i.v. (vía vena marginal de la oreja) treinta minutos previos al clampaje del hilio renal izquierdo durante los sesenta minutos del clampaje y durante los treinta primeros minutos de la reperusión, a dosis constante de 3 µg/kg/minuto.

Técnica de perfusión-fijación *in vivo*

En todos los grupos se realizó una técnica similar. Tras clampaje de la arteria aorta por encima de la arteria renal izquierda se realizó incisión de la aorta 1 cm por encima de la bifurcación de las ilíacas. Se introdujo cánula (Abbocath-T N.º 186, de 151 × 1,3 mm), perfundiendo con lactato de Ringer durante treinta segundos y posteriormente con glutaraldehído al 1,5 % durante quince minutos. La presión de perfusión fue constante a 110 mmHg, siendo controlada con manómetro. El cambio de color homogéneo y el aumento de la consistencia fueron los parámetros utilizados para confirmar una adecuada fijación.

Estudios funcionales

Se realizaron tres determinaciones del aclaramiento de creatinina tras la realización de la nefrectomía derecha y/o clampaje en los grupos B y C. Se recogió la orina de vein-

ticuatro horas en cada conejo a las veinticuatro, cuarenta y ocho y setenta y dos horas de la nefrectomía, tomándose muestras de suero a las doce, treinta y seis y sesenta horas (a través de la vena marginal de la oreja). Las determinaciones de creatinina en sangre y orina se realizaron con método automatizado⁵⁴.

El cálculo del aclaramiento de creatinina se realizó en base a la fórmula estándar habitualmente utilizada, introduciéndose como factor de corrección el peso del animal y expresándolo en ml/min/kg de peso.

Estudios morfológicos

Microscopia óptica. Secciones transversales del riñón fijado *in vivo* fueron pos fijadas en formol tamponado al 10 %, incluyéndose en parafina. Cortes de 3-4 µm se tiñeron con hematoxilina-eosina, PAS, tricrómico de Masson y plata metenamina. Histológicamente se cuantificaron los siguientes parámetros: reborde en cepillo (con técnica de PAS), porcentaje de túbulos proximales con pérdida del reborde en cepillo (computados 1.000 túbulos proximales/caso); descamación o protrusión del epitelio tubular en la luz, porcentaje de túbulos con esta patología (computados 1.000 túbulos proximales/caso); cilindros, número de cilindros encontrados en 50 campos de 100 aumentos; mitosis, número de mitosis en 100 campos de 400 aumentos.

En el resto, los parámetros estudiados con microscopia óptica, que incluyeron presencia de nucléolos o hiperromatismo en las células del epitelio tubular, edema intersticial, infiltrado inflamatorio intersticial, patología glomerular y patología vascular, se realizó un estudio semicuantitativo que subdividimos en cuatro grados (nulo, -; leve, +; moderado, ++, y severo, +++).

Microscopia electrónica. Secciones finas de 1 mm³ del riñón fijado *in vivo* fueron procesadas según método que ya previamente hemos descrito⁵⁵. De cada caso se cortaron un mínimo de ocho secciones ultrafinas, que fueron examinadas con microscopio electrónico Phillips 301. La tabla I refiere el número de túbulos proximales (TP) y túbulos distales (TD) estudiados en cada grupo.

Nuestro estudio ultraestructural se centró preferentemente a nivel de TP y TD, realizándose microfotografías ultraestructurales de todos los túbulos, con un aumento final mínimo de 2.200 y máximo de 44.000.

Los estudios de cuantificación ultraestructural se evaluaron sobre las microfotografías realizadas, cuantificándose: el reborde microvellositario del túbulo proximal, la media del porcentaje perdido en cada túbulo; el edema en células del TP, porcentaje de células con edema apical en el TP; la rotura de células del epitelio en el TP, porcentaje de células con membrana apical rota en el epitelio del TP; la patología mitocondrial, porcentaje de mitocondrias con vacuolas o pérdida de crestas, tanto en el TP como en el TD.

Del resto de parámetros ultraestructurales en los que no se pudo realizar estudio cuantitativo, y que incluyen al-

teración del laberinto basal del túbulo proximal (LBL TP), laberinto basal lateral del epitelio del túbulo distal (LBL TD) e hipertrofia de las bandas de actina en la porción basal del túbulo, se realizó una valoración semicuantitativa, similar a la descrita con microscopía óptica.

Estudios estadísticos. Tanto los resultados funcionales como los morfológicos fueron expresados en media \pm error estándar medio (ESM). Los parámetros cuantificables fueron comparados entre los diferentes grupos con la «t» del test de Student para evaluar si las diferencias entre los grupos eran significativas. Los parámetros cualitativos, debido al escaso número de muestras, se agruparon en dos categorías: nulo o leve y moderado o severo, utilizando como método estadístico comparativo el χ^2 , con corrección continua.

El nivel de significación aceptado en los estudios estadísticos fue el de $p < 0,05$, no reseñándose valores inferiores a esta cifra.

Resultados

La tabla II resume los resultados funcionales en los tres grupos, incluyendo además los parámetros fisiológicos obtenidos en dos determinaciones basales previas a la intervención de los conejos.

La creatinina en suero fue más baja en los tres controles realizados en los conejos tratados con verapamil (grupo C) con respecto al grupo de conejos con isquemia sin tratamiento (grupo B). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas a las veinticuatro y cuarenta y ocho horas ($p < 0,005$). La creatinina en orina fue más alta en el grupo de conejos tratados con verapamil (grupo C), siendo esta diferencia significativa a las veinticuatro horas ($p < 0,005$). El volumen de orina fue también más alto en los conejos del grupo C con respecto al grupo B, sin que estadísticamente estas diferencias llegaran a ser significativas.

La figura 1 corresponde a la representación gráfica de aclaramiento de creatinina en los tres controles y a la media de dichos controles; podemos observar que el aclaramiento de creatinina fue muy superior en el grupo C de conejos tratados con BEC, siendo estadísticamente signifi-

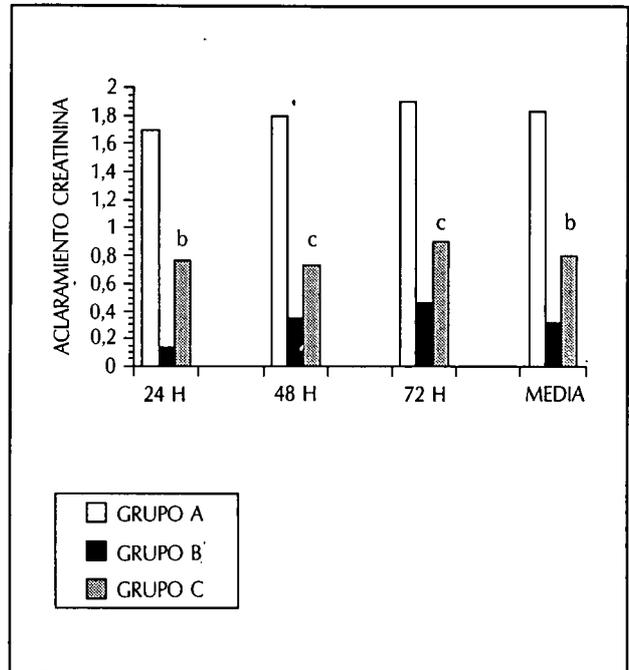


Fig. 1.—El aclaramiento de creatinina, incluyendo el valor medio de las tres determinaciones realizadas, fue significativamente más elevado en el grupo con verapamil. B = $p < 0,005$; c = $p < 0,05$ en ambos casos con respecto al grupo B.

ficativas estas diferencias en los tres controles y en la media de los mismos ($p < 0,05$ a las cuarenta y ocho y setenta y dos horas y $p < 0,005$ a las veinticuatro horas y en la media de los tres controles de aclaramiento).

Resultados histológicos

Los cambios histológicos que encontramos en los grupos a los que se provocó FRA-isquémico (grupos B y C) son similares a los que actualmente se describen en el FRA-isquémico del humano^{56, 57}. Consistían en una pérdida o aplanamiento del reborde en cepillo del TP, cilin-

Tabla II. Resultados funcionales (resultados comparativos)

Grupo (N.º)	Creat. suero (mg/dl) M \pm EEM			Creat. orina (mg/dl) M \pm EEM			Vol. orina (c.c.) M \pm EEM			Aclar. creat. (ml/min/kg) M \pm EEM		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
PF (21)		1,16 \pm 0,02			63 \pm 3			106 \pm 6			1,75 \pm 0,09	
A (7)	1,4 \pm 0,07	1,3 \pm 0,1	1,4 \pm 0,08	96 \pm 13	112 \pm 26	109 \pm 15	85 \pm 13	87 \pm 13	92 \pm 10	1,7 \pm 0,1	1,82 \pm 0,2	1,9 \pm 0,3
B (7)	3,3 \pm 0,2 ^A	3 \pm 0,2 ^A	2,5 \pm 0,3 ^C	31 \pm 6 ^A	52 \pm 6 ^D	52 \pm 3 ^B	35 \pm 7 ^B	54 \pm 11 ^D	58 \pm 10 ^D	0,13 \pm 0,04 ^A	0,35 \pm 0,09 ^A	0,46 \pm 0,1 ^A
C (7)	2,1 \pm 0,2 ^{Bb}	2 \pm 0,1 ^{Bb}	1,9 \pm 0,08 ^B	62 \pm 2 ^{Ba}	72 \pm 13	66 \pm 13 ^D	62 \pm 13	73 \pm 16	100 \pm 22	0,77 \pm 0,1 ^{Bb}	0,73 \pm 0,1 ^{Bc}	0,90 \pm 0,2 ^{Cc}

PF = Parámetros fisiológicos basales. Grupo A = uninefrectomía. Grupo B = uninefrectomía + clampaje. Grupo C = uninefrectomía + clampaje + verapamil.
^a = $p < 0,0005$; ^b = $p < 0,005$; ^c = $p < 0,05$; con respecto al grupo B.
^A = $p < 0,0005$; ^B = $p < 0,005$; ^C = $p < 0,01$; ^D = $p < 0,05$; con respecto al grupo A.

dros y descamación o protrusión de células del epitelio con ausencia de una extensa necrosis del mismo, dato actualmente considerado como un artefacto de fijación⁵⁷.

Al utilizar fijación-perfusión *in vivo* no hemos valorado la dilatación del túbulo proximal, hallazgo histológico frecuentemente encontrado en el FRA de tipo isquémico⁵⁷.

La tabla III muestra los resultados obtenidos en el estudio de microscopía óptica. En el grupo control A no existieron cambios patológicos relevantes, considerando dicho grupo como grupo control de buena técnica de perfusión (fig. 2). En los grupos B y C se objetivaron cambios patológicos. El reborde en cepillo estaba perdido en un 63 ± 5 % de los TP en el grupo B (fig. 3), siendo la pérdida únicamente en un 24 ± 4 % de los TP en el grupo C de conejos tratados con verapamil (fig. 4), siendo dichas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0005$). Existieron también diferencias estadísticamente significativas entre estos dos grupos en el porcentaje de túbulos que presentaron en su luz descamación y protrusión celular ($p < 0,05$) (figs. 3 y 4). No se observaron diferencias en el número de cilindros ni de mitosis entre ambos grupos. Entre los parámetros semicuantificados cabe destacar que el infiltrado inflamatorio fue casi constante en el grupo B, observándose solamente en un caso del grupo C (χ^2 corregido, $p < 0,05$).

La tabla IV resume los resultados obtenidos con microscopía electrónica. El grupo control A presentaba TP con reborde en cepillo íntegro, sin edema ni rotura celular (fig. 5). A nivel mitocondrial no se observó pérdida de crestas, y los LBL, tanto del TP como del TD, no mostraban aplanamiento. No se objetivaron bandas de actina hipertróficas.

Los cambios estructurales encontrados en los dos grupos a los que se provocó isquemia (grupos B y C) fueron superponibles a los que actualmente se describen en el FRA-isquémico humano^{58,59}, con pérdida importante del reborde en cepillo del TP, aplanamiento del LBL tanto del TP como del TD⁵⁸, edema celular, afectación mitocondrial y escaso número de células necróticas, dato este último

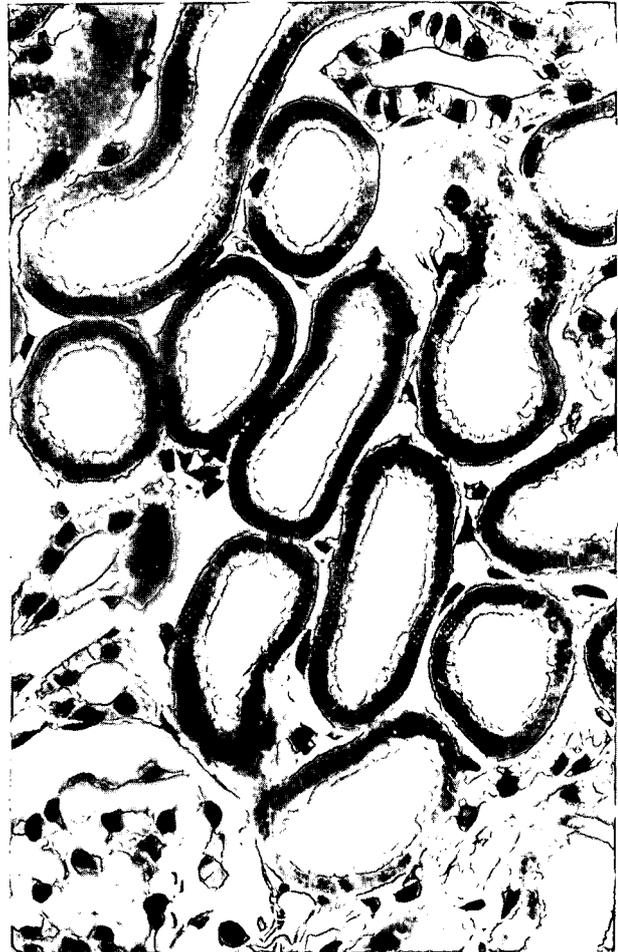


Fig. 2.—Túbulos proximales de un conejo del grupo A control, en el que se aprecia una adecuada preservación y buena fijación. (PAS × 400.)

Tabla III. Resultados con microscopía óptica

	Grupo A	Grupo B	Grupo C
Pérdida reb. cepillo.....	4,8 ± 0,9	63 ± 5 ^A	24 ± 4 ^{Ba}
Cilindros.....	5,7 ± 1,3	128 ± 44 ^C	90 ± 31 ^C
Mitosis.....	6 ± 1,4	8,8 ± 2	7 ± 1
Des. prot. tubular.....	1 ± 0,4	28 ± 5 ^A	13 ± 3 ^{Bb}
Núcleolos.....	0 (++)	4 (++)	2 (++)
Basofilia.....	0 (++)	3 (++)	2 (++)
Edema.....	0 (++)	4 (++)	3 (++)
Infil. inflamatorio.....	0 (++)	6 (++)	1 (++) ^C

Reb. cepillo = reborde en cepillo. Des. prot. tubular = descamación y/o protrusión tubular.

A = $p < 0,0005$; B = $p < 0,005$, ambas con respecto al grupo B (test «b»); A = $p < 0,0005$; B = $p < 0,005$, C = $p < 0,01$ con respecto al grupo A; ^C = $p < 0,01$ con respecto al grupo b (χ^2 corregido).

que se considera más un artefacto de fijación que una característica ultraestructural del FRA-isquémico^{57,59}. En el grupo C, el reborde en cepillo se encontraba perdido y/o aplanado en el 17 ± 3 % del perímetro de los TP (fig. 6), siendo esta pérdida del 59 ± 5 % en el grupo B (fig. 7), que no recibió verapamil (diferencia estadísticamente significativa, $p < 0,0005$).

Se observó en ambos grupos la presencia de edema intracelular en la porción más apical del epitelio del túbulo proximal, asociado en ocasiones a rotura de la membrana celular en esta porción apical (fig. 7). Ambos hallazgos fueron estadísticamente más significativos en el grupo B no tratado con BEC ($p < 0,005$ para el edema y $p < 0,01$ para la rotura celular).

En estos dos grupos encontramos también la presencia de mitocondrias con vacuolas y pérdida de crestas tanto en el TP como en el TD. El estudio cuantitativo mostró que dicho cambio afectó en un 16 ± 3 % del recuento mi-

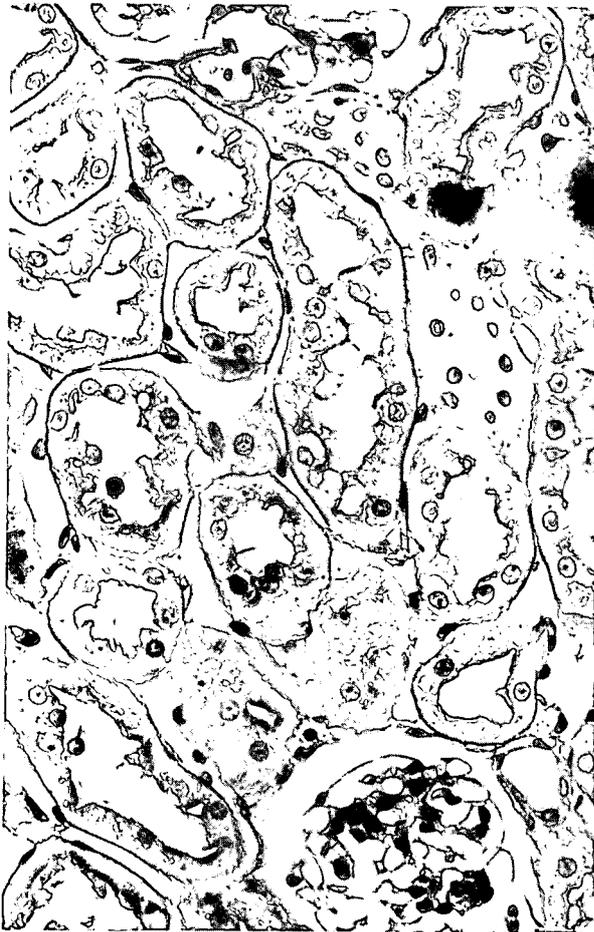


Fig. 3.—Túbulos proximales en un conejo del grupo B, con isquemia sin tratamiento, en los que no se reconoce el reborde microvellositario y se observa descamación y protrusión de células en los túbulos. (PAS × 400.)



Fig. 4.—Túbulos proximales en un conejo del grupo C, tratado con verapamil, en los que se reconoce parcialmente un reborde microvellositario. Escasa protrusión y ausencia de descamación celular en los túbulos. (PAS × 600.)

tocondrial en el grupo B, afectando solamente al 2,5 ± 0,9 % del grupo tratado con verapamil (p < 0,005).

El LBL del TP mostró un aplanamiento severo-moderado

do en seis de los siete conejos del grupo B, observándose este grado de afectación únicamente en un caso del grupo C (χ^2 corregido, p < 0,05). El LBL del TD mostró afectación moderada-severa en cuatro casos del grupo B, siendo dicho cambio leve o nulo en todos los conejos tratados con BEC del grupo C.

La presencia de bandas de actina hipertróficas (fig. 8) en la porción basal del túbulo, en un grado moderado-severo, se encontró en cinco casos del grupo B; ninguno de los conejos tratados con verapamil del grupo C presentó dicho cambio, o si éste existía era en grado leve (χ^2 corregido, p < 0,005).

Tabla IV. Resultados con microscopía electrónica

	Grupo A	Grupo B	Grupo C
Reb. cepillo (TP).....	0,7 ± 0,4	59 ± 5 ^a	17 ± 3 ^a
Edema celular (TP).....	0	33 ± 4 ^a	12 ± 2 ^{ab}
Rotura apical cel. (TP)....	0	21 ± 4 ^b	6,4 ± 1 ^{bc}
Edema mitocondrial.....	0	16 ± 3 ^b	2,5 ± 0,9 ^{cb}
LBL TP.....	0 (++)	6 (++) ^d	1 (++) ^d
LBL TD.....	0 (++)	4 (++)	0 (++)
Bandas de actina.....	0 (++)	5 (++) ^d	0 (++) ^d

TP = túbulo proximal. TD = túbulo distal. LBL = laberinto basal lateral.
^a = p < 0,0005; ^b = p < 0,005; ^c = p < 0,01 con respecto al grupo B (test «b»).
^a = p < 0,0005; ^b = p < 0,005; ^c = p < 0,01 con respecto al grupo A (test «b»).
^d = p < 0,05 con respecto al grupo B (χ^2 corregido).
^d = p < 0,05 con respecto al grupo A (χ^2 corregido).

Discusión

La isquemia o anoxia provoca una rápida disminución del ATP celular que es fundamental en la homeostasia intracelular^{60,61}. Los bajos niveles de concentración de cal-

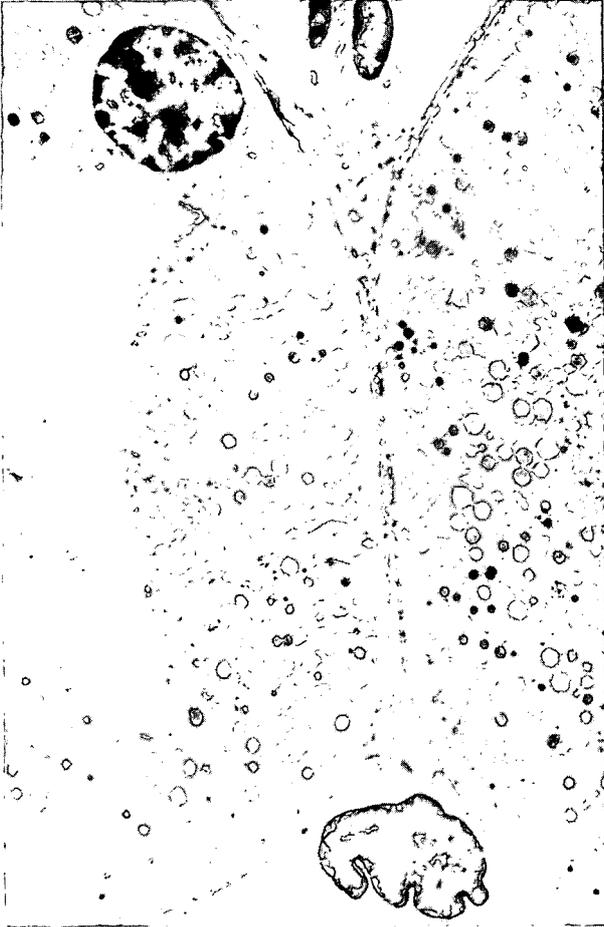


Fig. 5.—Ultraestructura de un túbulo proximal en un conejo control del grupo A. Rebordé microvellositario alto y compacto perfectamente íntegro. Abundantes mitocondrias y ausencia de edema ($\times 3.300$).

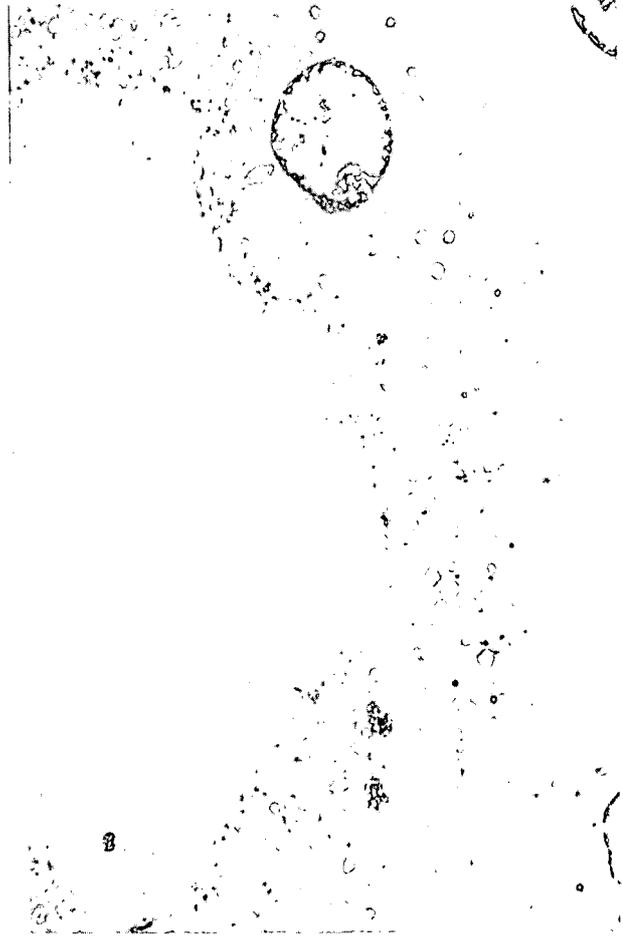


Fig. 6.—Ultraestructura de un túbulo proximal en un conejo del grupo C, tratado con verapamil. Aplastamiento de las microvellosidades con focos de pérdida de las mismas. Discreto edema, más evidente en el área supranuclear ($\times 3.600$).

cio dentro de la célula (Ca^{++}) son mantenidos gracias a un transporte activo dependiente del ATP. Durante la isquemia, la disminución del ATP celular provoca un aumento Ca^{++} intracelular, además de la entrada de Na, Cl y H_2O ⁶².

El aumento de Ca^{++} a nivel del músculo liso vascular provoca la formación de uniones calcio-calmodium, activadores de la miosina, que producen vasoconstricción^{63,64}. Por otro lado, el aumento del Ca^{++} intracelular es fundamentalmente regulado por el retículo endoplásmico y las mitocondrias, provocando en estas últimas una persistente depresión en su función⁶⁵. En las células que necesitan de una gran riqueza mitocondrial, como son las del epitelio del TP y TD del riñón, la disminución de la respiración mitocondrial y, por tanto, de su función, fundamentales en la formación de energía en forma de ATP, impide los mecanismos habituales de restauración de la homeostasia celular, provocando la muerte celular⁶⁶. Este importante papel del calcio en los mecanismos fisiopatoló-

gicos^{63,64,66} de la muerte celular ha postulado el posible efecto protector de los BEC en el FRA de tipo isquémico. Estos fármacos actuarían impidiendo la entrada del calcio dentro de la célula, tanto a nivel de la musculatura lisa de la pared de los vasos, reduciendo así la vasoconstricción persistente^{63,64}, como a nivel del epitelio tubular, impidiendo la entrada de calcio y la destrucción mitocondrial y preservando así la función celular y favoreciendo los mecanismos de regeneración de la misma⁶⁶.

Numerosos trabajos experimentales¹³⁻⁴⁶ han intentado demostrar desde un punto de vista funcional este efecto protector de los BEC en el FRA utilizando diferentes modelos experimentales y obteniendo un número importante de casos efectos beneficiosos¹³⁻³⁴. En este trabajo, realizado en conejos uninefrectomizados, a los que se les ha provocado FRA-isquémico por clampaje durante sesenta minutos del pedículo renal, nosotros hemos observado un efecto protector del verapamil en el FRA-isquémico

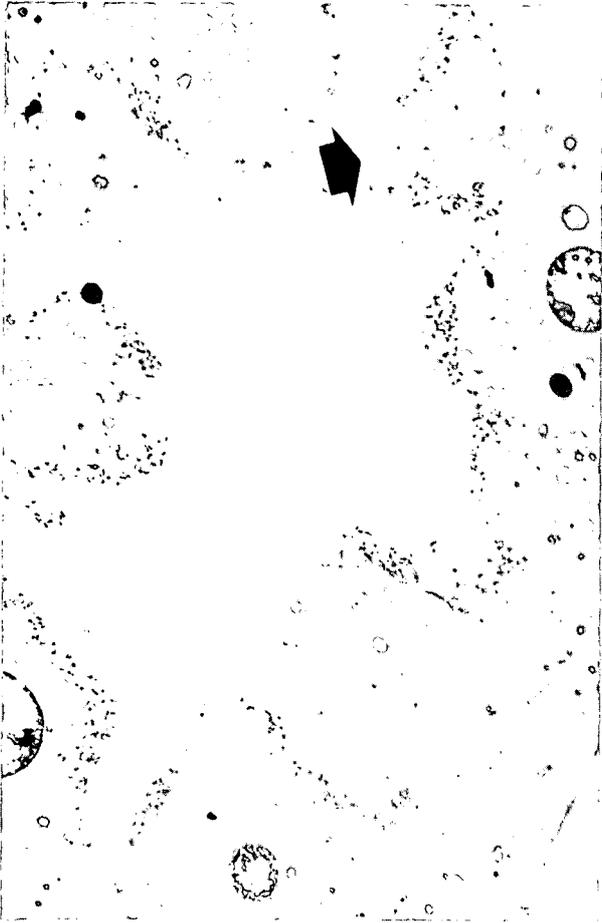


Fig. 7.—Ultraestructura del túbulo proximal en un conejo del grupo B que no recibió tratamiento con verapamil. Importante pérdida del reborde microvellositario, con intenso edema en la porción apical de la célula y rotura de la membrana apical de forma focal (flecha) ($\times 3.300$).

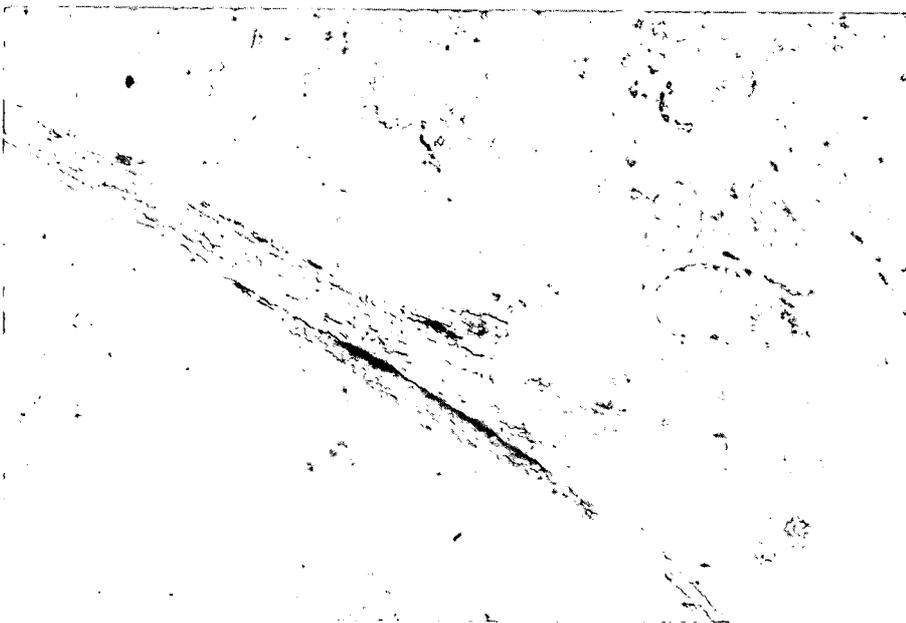


Fig. 8.—Fibras de actina hipertróficas e importante aplanamiento del laberinto basal lateral en un túbulo proximal de un conejo del grupo B.

co desde un punto de vista funcional. El grupo de conejos tratados con verapamil presentó una menor elevación de las cifras de creatinina en suero, con cifras más altas de creatinina en orina, una diuresis mejor conservada y un aclaramiento de creatinina más alto que el grupo con isquemia sin tratamiento. Estas cifras resultaron estadísticamente significativas en los tres controles de aclaramiento de creatinina, en el control a las veinticuatro y cuarenta y ocho horas de creatinina en suero y en el control a las veinticuatro horas para la creatinina en orina.

Si bien la demostración funcional del efecto protector de los BEC fue realizada en número relativamente alto de trabajos¹³⁻³⁴, estudios con comprobación morfológica fueron realizados únicamente en tres casos^{16,35,46}, obteniéndose resultados muy desiguales. Así, Burke y cols.¹⁶, en un trabajo experimental que incluye estudio de microscopía óptica y ultraestructural, observan preservación del epitelio tubular en animales tratados con BEC. Por otra parte, Blank y cols.³⁵, en un trabajo con microscopía óptica y microscopía electrónica, y Bock y cols.⁴⁶, únicamente con estudio de microscopía óptica, no obtienen diferencias objetivables entre los grupos experimentales tratados y no tratados con BEC a los que se les había provocado FRA-isquémico.

En este trabajo nosotros realizamos un estudio morfológico, tanto óptico como ultraestructural, en riñones perfundidos y fijados *in vivo*, cuantificando una serie de parámetros morfológicos, tanto histológicos como ultraestructurales, con el fin de que nuestros resultados fuesen lo más objetivables posibles.

Histológicamente observamos una menor afectación estadísticamente significativa en el grupo de conejos tratados con verapamil, que presentaron una menor pérdida del reborde en cepillo de los TP y un número menor de células en descamación o en protrusión hacia la luz tubular. Existieron también diferencias significativas en el número de casos con infiltración inflamatoria intersticial, asociándose dicho cambio al grupo de conejos con isquemia sin tratamiento.

Ultraestructuralmente también se observaron diferencias significativas entre los grupos de conejos tratados con bloqueantes del calcio y los no tratados. En los primeros existió una menor pérdida del reborde microvellositario del TP, con un número menor de células con edema o rotura de las células del epitelio del TP y una mejor preservación mitocondrial. Además, el LBL del TP se encontró mejor preservado, no observándose bandas de actina con cambios de hipertrofia moderada o intensa como en el grupo que no recibió tratamiento.

Si bien el planteamiento de nuestro trabajo no incide en el mecanismo por el cual los BEC protegen del FRA-isquémico, sí demuestra el efecto protector de dicha sustancia en la isquemia renal en un modelo experimental, conocido por su similitud con el FRA-isquémico del humano⁵².

Nuestros resultados, tanto funcionales como morfológicos, así como los obtenidos ya incluso en práctica clí-

nica por otros autores⁴⁷⁻⁵¹, nos hacen proponer la utilidad de los BEC en el tratamiento y prevención del FRA-isquémico, así como su posible utilización en los líquidos de perfusión en el trasplante renal con el fin de prevenir el FRA-postrasplante.

Bibliografía

1. Liaño F: Fracaso renal agudo: revisión de 202 casos. Aspectos pronósticos. *Nefrología*, IV:181-190, 1984.
2. Seggie J, Milne FJ y Meyers AM: Survival after severe acute renal failure. *Kidney Int* (abstr.), 30:975, 1986.
3. Castela AM, Gil-Vernet S, Torras J, Andrés E, Griñó JM y Alsina J: Prognostic pattern in acute renal failure (ARF). Analysis of 1,000 episodes. *Kidney Int* (abstr.), 30:129, 1986.
4. Gillum DM, Dixon BS, Yanover JM, Kelleher SP, Shapiro MD, Benedetti RG, Dillingham MA, Paller MS, Goldberg JP y Conger JD: The role of intensive dialysis in acute renal failure. *Clin Nephrol*, 25:249-255, 1986.
5. Baxby K, Taylor RMR y Andersen M: Assessment of cadaveric kidneys for transplantation. *Lancet*, 2:977-979, 1974.
6. San Filippo F, Vaughn WK, Spees EK y Lucas BA: The detrimental effects of delayed graft function in cadaver donor renal transplantation. *Transplantation*, 38:643-648, 1984.
7. Burke TJ, Cronin KL y Duchin LN: Ischemic and tubular obstruction during acute renal failure in dogs: mannitol in protection. *Am J Physiol*, 238:F305-F314, 1980.
8. Mauk RH, Patak RU y Faden SZ: Effect of prostaglandin administration in a nephrotoxic and a vasoconstrictor model of acute renal failure. *Kidney Int*, 12:122-130, 1977.
9. De Torrente A, Miller PD y Cronin RE: Effects of furosemide and acetylcholine in norepinephrine induced acute renal failure. *Am J Physiol*, 235:F131-F136, 1978.
10. Kleinknecht D, Ganeval D y González-Duque LA: Furosemide in acute oliguric renal failure: a controlled trial. *Nephrol*, 17:51-58, 1976.
11. Brown CB, Ogg CS y Cameron JS: High dose furosemide in acute renal failure: a controlled trial. *Clin Nephrol*, 15:90-96, 1981.
12. Berman LB, Smith LL y Chisholm GD: Mannitol and renal function in cardiovascular surgery. *Arch Surg*, 88:239-246, 1964.
13. Rose H, Philipson J y Puschett JB: Effect of nitrendipine in a rat model of ischemic acute renal failure. *J Cardiovasc Pharmacol*, 9:S57-S59, 1987.
14. Ishigami M, Stowe N y Smith C: Protective effect of a Ca⁺⁺ entry blocker in dog kidneys subject to 120 min warm ischemia. *Fed Proc* (abstr.), 42:843, 1983.
15. Papadimitriou M, Alexopoulos E, Vargemelis V, Sakellariou G, Kosmidou I y Metaxas P: The effect preventive administration of verapamil on acute ischemic renal failure in dogs. *Proc EDTA*, 20:650-655, 1983.
16. Burke TJ, Arnold PE, Gordon JA, Bulger RE, Dennis C y Schrier W: Protective effect of intrarenal calcium membrane blockers before of after renal ischemia. *J Clin Invest*, 74:1830-1841, 1984.
17. Ishigami M, Magnusson MO, Stowe NT y Straffon RA: The salutary effect of verapamil and d-propranolol in ischemically damaged kidneys. *Transplant Proc*, 16:40-43, 1984.
18. Lindner A: Protective effects of verapamil on renal function during hemorrhagic shock in the dog. *Kidney Int* (abstr.), 25:233, 1984.
19. Gingrich GA, Barker GR, Lui P y Stewart SC: Renal preservation following severe ischemia and prophylactic calcium channel blockade. *J Urol*, 134:408-410, 1985.
20. Natesh T, Alexopoulos E, Dimitriadis A, Tsobanelis S, Kalpakoglou S y Papadimitriou M: The effect preventive administration of nifedipine on acute ischemic renal failure in hydropenic dogs. *Kidney Int* (abstr.), 28:279, 1985.
21. Sato K, Asari H y Masaki Y: Usefulness of radionuclide scintigraphy to evaluate preserved kidney viability. *Transplant Proc*, 19:2043-2045, 1987.
22. Rooth P, Dawidson I y Diller K: Beneficial effects of calcium anta-

- gonist pretreatment and albumin infusion on cyclosporine A-induced impairment of kidney microcirculation in mice. *Transplant Proc*, 19:3602-3605, 1987.
23. Mills S, Chan L, Schwertsehlag U, Shapiro JJ y Schrier RW: The protective effect of (-) emopamil of renal function following warm and cold ischemia. *Transplantation*, 43:928-930, 1987.
 24. Iaina A, Herzog D, Cohen D, Gavendo S, Kapuler S, Serban I, Schiby G y Eliahou HE: Calcium entry-blockade with verapamil in cyclosporine A plus ischemia induced acute renal failure in rats. *Clin Nephrol*, 25:S168-S170, 1986.
 25. Shapiro JL, Cheung C, Itabishi A, Chan L y Schrier W: The effect of verapamil on renal function after warm and cold ischemia in isolated perfuse rat kidney. *Transplantation*, 40:596-600, 1985.
 26. Grekas D, Cristodoulou S, Kalekou H y Tourkantonis A: Experimental in situ renal preservation effect of nifedipina in the prevention of acute renal failure. *Kidney Int* (abstr.), 31:871, 1987.
 27. Nakamoto M, Shapiro JJ, Mills SD, Schrier RW y Chan L: Improvement or renal preservation by verapamil with 24 hours cold perfusion in the isolated rat kidney. *Transplantation*, 45:313-315, 1988.
 28. Eissenger DR, Suranyi MG y Bracs P: Effects of verapamil in the prevention of warm ischemia induced acute renal failure in dogs. *Aust N Z J Surg*, 55:391-396, 1985.
 29. Higuchi C: Pathophysiological mechanism of ischemic dismutase and protease inhibitor against ischemic acute renal failure. *Nippon Jinzo Gakkai Shi*, 31:15-24, 1989.
 30. Elkadi HK, Mardan AH, Nghiem DD y Southard JH: The role of calcium antagonists in the management of renal warm ischemic. *J Urol*, 141:974-980, 1989.
 31. Karasawa A y Kujo K: Protection by benidipine hydrochloride a calcium antagonists of ischemic kidney in rats via inhibition of Ca-overload ATP-decline and lipid peroxidation. *Jpn J Pharmacol*, 52:553-562, 1990.
 32. Silverman M, Rose H y Puschett JB: Modifications in proximal tubular function induced by nitrendipine in a rat model of acute ischemic renal failure. *J Cardiovasc Pharmacol*, 14:799-802, 1989.
 33. Leahy AL, Fitzpatrick JM y Wait RM: Variable results of calcium blockade in posts ischemic renal failure. *Eur Urol*, 14:222-225, 1988.
 34. Woolley JL, Narker GR, Jacobsen WK, Gingrich GA, Stewart SC, Briggs BA, Martin RD y Melashenko RA: Effect of the calcium entry blocker verapamil on renal ischemia. *Crit Care Med*, 16:48-51, 1988.
 35. Blank W, Unni Mooppan MM y Chajwani B: Effects of verapamil on preservation of renal function after ischemia: functional and ultrastructural study. *J Urol*, 131:992-994, 1984.
 36. Moody ML, Bates SB y Andrews PM: An evaluation of calcium in a model of posts ischemic acute renal failure. *Kidney Int* (abstr.), 27:235a, 1985.
 37. Kramer HJ, Neumark A y Schmidt S: Renal functional and metabolic studies on the role of preventive measures in experimental acute ischemic renal failure. *Clinical Experimental Dialysis and Apheresis*, 7:77-99, 1983.
 38. Goldfarb D, Iaina A, Serban I, Gavendo S, Kapuler S y Eliahou HE: Beneficial effect of verapamil in ischemic acute renal failure in the rat (41576). *Proc Soc Exp Biol Med*, 172:389-392, 1983.
 39. Malis DC, Cheung JY, Leaf A y Bonventre JV: Effects of verapamil in models of ischemic acute renal failure in the rat. *Am J Physiol*, 245:F735-F742, 1983.
 40. Wait RB, White G y David JH: Beneficial effects of verapamil on posts ischemic renal failure. *Surgery*, 94:276-282, 1983.
 41. Bock HA, Bertschin S, Brunner FP y Thiel G: Verapamil does not protect from acute ischemic renal failure in rats. *Kidney Int* (abstr.), 25:988, 1984.
 42. Wagner K, Schultze G y Molzahn M: The influence of long-term infusion of the calcium antagonist diltiazem on posts ischemic acute renal failure conscious dog. *Klin Wochenschr*, 64:135-140, 1986.
 43. Anaise D, Lane B, Waltzer WC y Rapaport FT: The protective effect of calcium inhibitors and of captopril on the renal microcirculation during reperfusion. *Transplantation*, 43:128-133, 1987.
 44. Agatstein EA, Farrer JH, Kaplan LM, Randazo RF, Glassock RJ y Kaufman JJ: The effect of verapamil in reducing the severity of acute tubular necrosis in canine renal autotransplants. *Transplantation*, 44:355-357, 1987.
 45. Golueke PJ, Kahng KU, Lipkowitz GS, O'Neil PA y Wait RB: Effect of verapamil on posttransplant acute renal failure in the canine kidney. *Transplantation*, 45:502-504, 1988.
 46. Bock HA, Brunner FP, Torhorst J y Thiel G: Failure of verapamil to protect from ischaemia renal damage. *Nephron*, 57:299-305, 1991.
 47. Wagner K y Neumayer HH: Influence of the calcium antagonist diltiazem on delayed graft function in cadaveric kidney transplantation: results of a 6-month follow-up. *Transplant Proc*, 19:1353-1357, 1987.
 48. Neumayer HH y Wagner K: Prevention of delayed graft function in cadaver kidney transplant by diltiazem: outcome two prospective, randomized clinical trials. *J Cardiovasc Pharmacol*, 10:S170-S177, 1987.
 49. Duggan KA, MacDonald GJ, Charlesworth JA y Pussell BA: Verapamil prevents post-transplant oliguric renal failure. *Clin Nephrology*, 24:289-291, 1985.
 50. Frei U, Margreiter R, Harms A, Bösmüller C, Neumann KH, Viebahn R, Gubematis G, Wonigeit K y Pichlmayr R: Preoperative graft reperfusion with a calcium antagonist improves initial function: preliminary results of a prospective randomized trial in 110 kidney recipients. *Transplant Proc*, 19:3539-3541, 1987.
 51. Morales JM: Dosis bajas de ciclosporina en el trasplante renal: papel de los calcioantagonistas en la prevención de la nefrotoxicidad en el postoperatorio inmediato. Symposium ciclosporina en trasplante renal. Estambul, febrero 1989.
 52. Solez K, D'Agostin JR, Stawowy L, Freedman MT, Scott WW, Siegelman SS y Heptinstall RH: Beneficial effect of propranolol in a histologically appropriate model of posts ischemic. Acute renal failure. *Am J Pathol*, 88:163-192, 1977.
 53. Lipman NS, Phillips PA y Newcomer CE: Reversal of Ketamine/Xilazine anesthesia in the rabbit with yohimbine. *Lab Anim Sci*, 37:474-477, 1987.
 54. Chasson AC, Grady HJ y Stanley MA: Determination of creatinina by means of automatic chemical analysis. *Am J Clin Pathol*, 35:83-88, 1961.
 55. Martul EV, Cuesta MG y Churg I: Histopathologic variability of the congenital nephrotic syndrome. *Clin Nephrology*, 28:161-168, 1987.
 56. Solez K, Morel-Maroger K y Sraer JD: The morphology of «Acute Tubular Necrosis» in man: analysis of 57 renal biopsies and a comparison with the glycerol model. *Medicine*, 58:362-376, 1979.
 57. Olsen S: *Acute tubular necrosis in Renal Pathology*. Brenner BM, Churchill, Livingstone Inc., New York, pp. 656-699, 1989.
 58. Olsen TS, Hansen HE y Olsen HS: Tubular ultrastructure in acute renal failure: Alterations of cellular surfaces (brush border and basolateral infoldings). *Virchows Arch (A)*, 406:91-104, 1985.
 59. Olsen TS, Olsen HS y Hansen HE: Tubular ultrastructure in acute renal failure in man: Epithelial necrosis and regeneration. *Virchows Arch (A)*, 406:75-89, 1985.
 60. Arnold PE, Van Puttem VJ, Lumlertgul D y cols.: Adenine nucleotide metabolism and mitochondrial Ca transport following rena; ischemia. *Am J Physiol*, 250:F357-F363, 1986.
 61. Schrier RW, Arnold PE, Van Puttem VS y Burke TJ: Cellular calcium in ischemic acute renal failure: role of calcium entry blockers. *Kidney Int*, 32:313-321, 1987.
 62. Mason J, Beck F, Dorge A, Rick R y Thureau A: Intracellular electrolyte composition following renal ischemia. *Kidney Int*, 20:61-70, 1981.
 63. Meyer-Lehnert H, Takeda K y Schrier RW: Effects of arginine vasopressin (AVP) on calcium kinetics and cell contraction in cultured vascular smooth muscle cells. *Clin Res* (abstr.), 34:482A, 1986.
 64. Takeda K, Kim J y Schrier R: Effect of angiotensin II on Ca kinetics and cell contraction in cultured rat mesangial cells. *Kidney Int* (abstr.), 29:424, 1986.
 65. Schieppati A, Wilson PD, Burke TJ y Schrier RW: Effect of renal ischemia on cortical microsomal calcium accumulation. *Am J Physiol*, 249:C476-C483, 1985.
 66. Chan CH y Schrier RW: Effects of calcium channel blocker on renal function. *Ann Rev Med*, 41:289-302, 1990.