



VNiVERSIDAD D SALAMANCA

Facultad de Enfermería y Fisioterapia

Grado en Enfermería.

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Trabajo de investigación

ANÁLISIS FUNCIONAL Y ESTRUCTURAL EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE TRANSICIÓN DE DAÑO RENAL AGUDO A ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA

Autor: Francisco David Pereira González

Tutores: M^a Nélida Eleno Balboa y Carlos Martínez Salgado

Salamanca, mayo de 2022.

A mis tutores María Nélica Eleno Balboa y Carlos Martínez Salgado por darme la oportunidad de integrarme en el grupo TRECARD durante este periodo y acercarme al mundo de la investigación.

A todo el grupo de investigadoras con las que compartí y aprendí dentro del laboratorio, en especial a Joana Mercado Hernández por su tiempo y ayuda todos estos meses.

A mis padres y hermanos por apoyarme incondicionalmente y animarme a perseguir mis sueños y cumplir mis objetivos.

A todas las personas, que este camino me ha regalado, por quererme, inspirarme y hacer de mí, cada día, una mejor persona y profesional.

A todos ¡Muchas gracias!

INDICE

1.INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. Daño Renal Agudo	5
1.2. Transición de Daño Renal Agudo a Enfermedad Renal Crónica	6
1.3. Enfermedad Renal Crónica.....	6
2.OBJETIVOS.....	10
3.MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
3.1. Diseño experimental	10
3.2. Obtención y manejo de muestras de orina.....	12
3.3. Obtención y manejo de muestras de sangre.....	12
3.4. Análisis de la Función Renal	12
3.4.1. Determinación de la concentración de creatinina en plasma y orina..	12
3.4.2. Determinación del aclaramiento de creatinina.....	13
3.5. Análisis Histológico.....	13
3.5.1. Tinción de Hematoxilina Eosina.....	14
3.5.2. Tinción de Rojo Sirio.....	14
3.5.3. Cuantificación de colágeno mediante la tinción de rojo sirio.....	14
3.6. Análisis Estadístico.....	15
4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	16
4.1. Análisis de la Función Renal	16
4.1.1. Creatinina plasmática y aclaramiento de creatinina.....	16
4.2. Estudio Histológico	19
4.3. Estudio del Grado de fibrosis	22
5.CONCLUSIONES.....	24
6.BIBLIOGRAFIA.....	26

LISTA DE ABREVIATURAS

AINES	Antinflamatorios no esteroideos	ERC	Enfermedad Renal Crónica
ARC	Área relativa de colágeno	HD	Hemodiálisis
C/I/I	Grupo control-isquemia-isquemia	H/E	Hematoxilina/Eosina
CAST	Cilindros urinarios	KDIGO	Organización. <i>Kidney Disease Improving Global Outcomes</i>
CP/I/I	Grupo cisplatino-isquemia-isquemia	M2	Segundo mes
CP/I	Grupo cisplatino-isquemia	M3	Tercer mes
CP/C/I	Grupo cisplatino-control-isquemia	pmp	pacientes por millón de población
CrCl	Aclaramiento de creatinina	PNT	Protocolo normalizado de trabajo
CrP	Creatinina plasmática	PS	Poliestireno, tubo
CrU	Creatinina urinaria	SHAM	Grupo control
DPA	Diálisis peritoneal automática	TFG	Tasa de filtración glomerular
DPCA	Diálisis peritoneal continua ambulatoria	TRECARD	Grupo de Investigación Traslacional en Enfermedades Renales y Cardiovasculares
DRA	Daño renal agudo	TRS	Terapia Renal Sustitutiva
EPIRCE	Estudio Epidemiológico de la Insuficiencia Renal en España	μm^2	micrómetro cuadrado
ERA	Enfermedad Renal Aguda		

RESUMEN

La enfermedad renal crónica (ERC) puede estar producida por enfermedades que afectan directa o indirectamente al riñón, o bien por daños puntuales que debilitan su estructura y función progresivamente. En la práctica clínica, existen numerosos fármacos que pueden inducir daño renal agudo (DRA) y predisponer a los pacientes a sufrir ERC con el tiempo.

Este trabajo de investigación busca analizar la función renal y los cambios histológicos en un modelo de experimentación *in vivo* con ratas tipo Wistar durante 90 días. Se aplicó una combinación de DRA isquémico (I) y tóxico; el primero limitando el flujo renal por clampaje de la arteria renal, y el segundo a través de la administración intraperitoneal de 5mg/kg de cisplatino (CP), un fármaco quimioterápico utilizado en la práctica clínica con efectos nefrotóxicos ampliamente conocidos. Se trabajó con cuatro grupos experimentales (CP/I/I, CP/I, CP/C/I y C/I/I) más un grupo control (SHAM). El análisis de la función se llevó a cabo en tres momentos: basal, segundo mes y tercer mes, mientras que el análisis histológico se realizó en el segundo y tercer mes, utilizando las tinciones de hematoxilina/eosina y rojo sirio.

Se concluye que en el periodo entre los 7 y 90 días tras el primer DRA existen cambios que aún no se detectan a nivel funcional, sin embargo, ya se observan alteraciones estructurales que, si prosiguen en el tiempo, predisponen a la ERC. Estos resultados evidencian la necesidad de disponer clínicamente de marcadores que indiquen el inicio del daño renal cuando las medidas de función habituales (creatinina plasmática, aclaramiento renal) se encuentran aún dentro de la normalidad.

Palabras claves: enfermedad renal crónica, daño renal agudo, modelo experimental, ratas Wistar, cisplatino, isquemia renal, función, estructura, histología.

INTRODUCCION

1.1. Daño Renal Agudo

El Daño Renal Agudo (DRA) se define como el descenso brusco de la función renal de evolución igual o menor a 7 días. Los riñones no solo se encargan de la eliminación de sustancias de desecho, sino que su función principal está relacionada con el mantenimiento del volumen y la composición de los líquidos corporales, equilibrando para ello las entradas de electrolitos y agua con las pérdidas de orina para mantener así la homeostasis interna (1).

El DRA puede estar causado por diversas etiologías que incluyen enfermedades que afectan a los riñones directamente, enfermedades extrarrenales o condiciones que pueden tener repercusión sobre dichos órganos. Se han definido tres tipos de DRA.

DRA Prerenal. Se produce cuando la perfusión renal está comprometida, disminuyendo el riego sanguíneo y por tanto la filtración y la función renal (2). La excreción de cloruro y sodio disminuyen al igual que la diuresis, y la concentración de los productos nitrogenados de desecho aumenta en el plasma, acumulándose en el organismo y produciendo azotemia. La hipoperfusión puede estar asociada a hipovolemia por hemorragia o deshidratación.

DRA Renal o Intrínseco. Se produce por varias causas. En el caso anterior, cuando la hipoperfusión perdura en el tiempo, se compromete el flujo sanguíneo y se produce daño hipóxico y oxidativo en las células tubulares renales, lo que lleva a la muerte celular y al compromiso de la función renal; esto se conoce como Necrosis Tubular Aguda (2). Entre otras causas de DRA intrínseco están los procesos inflamatorios agudos que afectan al riñón y que están producidos por infecciones, reacciones alérgicas y autoinmunes, fármacos o por nefrotóxicos que alteran el parénquima renal (afectando vasos, glomérulo, túbulos y/o intersticio) y traen consigo una alteración en la función renal.

DRA Postrenal. Causado por una obstrucción intrínseca (cálculos, neoplasias) o extrínseca (compresiones, neoplasias, hiperplasia prostática) en cualquier punto del tracto urinario que reduce el flujo urinario hacia su evacuación. En el DRA Postrenal, la obstrucción disminuye la diuresis (excreción de orina) y puede acabar afectando retrógradamente la función renal. Es potencialmente reversible si se detecta a tiempo y se elimina la causa.

Según la Guía KDIGO (Siglas en inglés de *Kidney Disease: Improving Global Outcomes*) del 2012, los valores de Creatinina Plasmática (CrP) y diuresis permiten definir de manera objetiva la presencia de DRA: incremento $\geq 0,3$ mg/dl de los valores de CrP en 48 horas o $\geq 1,5$ veces el valor inicial o conocido de los 7 días anteriores, o diuresis $\leq 0,5$ ml/kg/h durante 6 horas (3).

El DRA es un problema que puede ocurrir en todos los contextos dentro de la atención sanitaria, pudiendo tener consecuencias no solo inmediatas sino también a largo plazo sobre la estructura y función renal a pesar de que la etiología pueda ser reversible y tratada.

1.2. Transición de DRA a ERC

La Enfermedad Renal Aguda (ERA) es un término que se ha propuesto para definir el curso de la enfermedad renal después de producirse un DRA. El DRA y la Enfermedad Renal Crónica (ERC) están claramente caracterizadas y diferenciadas, sin embargo, la ERA no ha sido estudiada sistemáticamente y se ha propuesto como el periodo de transición entre los 7 y 90 días que pasan entre el DRA y la ERC (Fig. 1). Su importancia se basa en que constituye un periodo de ventana sobre la cual pueden aplicarse intervenciones que frenen la historia natural de la enfermedad renal (4).

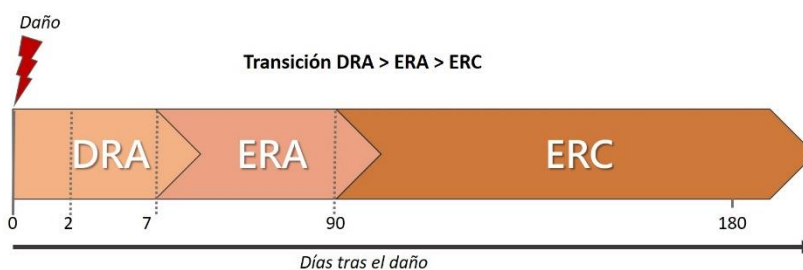


Figura 1. Transición en el tiempo de Daño renal agudo (DRA) a Enfermedad Renal Aguda (ERA) y Enfermedad Renal Crónica (ERC) tras un daño inicial. Adaptado de Chawla, LS et al. (2017)

1.3. Enfermedad Renal Crónica

Definición y Epidemiología

La ERC se define como la persistencia de la alteración de la estructura y/o función renal durante al menos tres meses. Existe un gran espectro de patologías que acaban en ERC y que afectan al riñón de forma crónica e irreversible (5). La presencia de DRA, aunque este sea reversible, puede tener consecuencias clínicas no solo inmediatas sino también a largo

plazo como lo es la predisposición o el desarrollo de la ERC ya que la función renal se ve afectada y, de un modo silente, progresivamente puede ir decayendo en el tiempo (3).

Según los resultados arrojados por el Estudio Epidemiológico de Insuficiencia Renal Crónica en España (EPIRCE) que estimó la prevalencia de ERC, el 6,8% de la población española mayor de 20 años presenta algún tipo ERC en los estadios 3-5, aumentando considerablemente este valor en la población mayor de 64 años (21,42%), y con una fuerte presencia de los siguientes factores de riesgo: dislipidemia, diabetes, tabaquismo, obesidad e hipertensión (6).

La ERC constituye un grave problema de salud pública con gran repercusión no solo sobre la calidad de vida en los pacientes que la padecen, sino también sobre el coste sanitario relacionado a su tratamiento, que busca suplir la función del órgano a través de la Terapia Renal Sustitutiva (TRS) que incluye tres tipos de tratamiento: hemodiálisis, diálisis peritoneal y, en último caso, el trasplante renal (6,7). En lo que se refiere a la Diálisis, en España, el coste medio anual de tratamiento por paciente, es de 21.870,00 euros para la Diálisis Peritoneal Continua Ambulatoria (DPCA), 32.914,80 euros para la Diálisis Peritoneal Automatizada (DPA) y 23.049,00 euros para la Hemodiálisis (HD) (8).

Teniendo en cuenta que para el año 2020, la incidencia anual de pacientes que iniciaron TRS a nivel nacional fue de 141,4 pacientes por millón de población (pmp) y que la prevalencia (*desde el año 2006*) se sitúa sobre los 1362,8 pmp (*resultados preliminares del Registro Español de Enfermos Renales*), podemos afirmar que la ERC genera un gasto sanitario anual importante, en concreto un 2,5% del presupuesto del Sistema Nacional de Salud y más de un 4% de la Atención Especializada (7), valor que progresivamente podrá ir aumentando conforme la población siga envejeciendo y aumente el grupo de población donde la prevalencia de ERC es mayor.

Diagnóstico de la ERC

Para analizar la función renal en el contexto clínico se emplea la concentración de CrP, que es un producto obtenido del metabolismo de los músculos que se excreta únicamente por la orina a través del proceso conocido como *filtración*. Este valor, obtenido por medio de un análisis de sangre, al ser introducido en las ecuaciones específicas de estimación de la

Tasa de Filtración Glomerular (TFG), como la Ecuación de MDRP o CKD-EPI, nos permitirá determinar si los riñones funcionan adecuadamente. La afectación de la función renal se objetiva con una TFG <60 ml/min/1,73m² (5). Sin embargo, hay que tener en cuenta que valores de CrP pueden seguir siendo normales aun cuando la enfermedad renal ya se ha establecido (9). Según Sellares y Rodriguez, en los estadios iniciales de ERC, la CrP no aumenta hasta que la filtración glomerular desciende un 50% sobre su valor basal, en cambio, cuando hablamos de estadios más avanzados, la CrP es más sensible a pequeños cambios en la misma.

Otros inconvenientes que presenta la creatinina como marcador diagnóstico son que, a pesar de ser excretada por filtración, cuando esta se ve afectada, su secreción en el túbulo aumenta sobrestimando la TFG en un 10-30%; además, su producción está influida por cambios en la masa muscular, así como por otros factores como el peso corporal, raza, edad, sexo, etc. Todo esto hace que en numerosas ocasiones el diagnóstico de la ERC se retrase y que cuando sea detectada, nos encontremos en estadios avanzados de la enfermedad. (5,10)

En cuanto a la alteración de la estructura, la lesión renal puede ponerse de manifiesto a través de técnicas de imagen (ecografía), estudios histológicos (a partir de la toma de biopsias renales para el estudio de las estructuras celulares) o bien por medio de otros parámetros clínicos como la albuminuria, o el sedimento urinario (11). Cuando estas alteraciones permanecen de forma persistente durante al menos 3 meses, nos indicarán que existe un daño real en el tejido o bien en las estructuras implicadas dentro de su función (11).

Clasificación de la ERC

La ERC se clasifica en función de la causa que la produce, siendo la diabetes la principal causa, seguida por la hipertensión arterial, enfermedades cardiovasculares, el uso de fármacos con efecto nefrotóxico como el litio, inhibidores de calcio o el abuso de antiinflamatorios no esteroideos (AINES), y los trastornos renales y del tracto urinario. Además de su etiología, se clasifica según la TFG estimada (que define cinco categorías de la función renal) y el grado de albuminuria (con tres categorías de rangos) (12). La relación de estas dos últimas variables permite determinar el pronóstico de la enfermedad (riesgo bajo/sin ERC, moderado, alto y muy alto) para así, diseñar el tratamiento más adecuado (Fig. 2).

Pronóstico de la ERC según las categorías de TFG y Albuminuria: KDIGO 2012

				Categorías de Albuminuria persistente. Descripción y rangos.		
				A1	A2	A3
				Normal o leve incremento	Incremento moderado	Incremento grave
				<30 mg/g <3 mg/mmol	30-300 mg/g 3-30 mg/mmol	>300 mg/g >30 mg/mmol
Categorías de TFG (ml/min/1.73m ²) Descripción y rangos	G1	Normal o alto	≥90			
	G2	Levemente disminuido	60-89			
	G3a	Disminución leve-moderado	45-59			
	G3b	Disminución moderada-grave	30-44			
	G4	Gravemente disminuido	15-29			
	G5	Fallo renal	<15			

Figura 2. Pronóstico de la ERC según la TFG y Albuminuria (Traducido). ERC: Enfermedad Renal Crónica; TFG: Tasa de Filtración Glomerular; KDIGO: Kidney Disease Improving Global Outcomes. El color verde indica un riesgo bajo en caso de que no haya otros marcadores de enfermedad renal, no habrá ERC; color amarillo indica un riesgo moderado, en color naranja un riesgo elevado y en color rojo un riesgo muy elevado de desarrollar ERC. Fuente: KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Off J Int Soc Nephrol [Internet]. 2013;3(1):150.* Disponible en: <https://www.kidney-international.org/>.

Progresión de la Enfermedad Renal Crónica

Cuando el DRA es inicial y no existe previamente ERC, existe un periodo de recuperación a las 48 horas que permitiría la reversión del daño en la mayor parte de los casos (sobre todo, si se retira la causa que originó el DRA); sin embargo, cuando el DRA se produce en un contexto de ERC preexistente, existe un mayor riesgo de progresión a otras fases de la enfermedad (4). A este antecedente, se le suman factores de riesgos de progresión como la proteinuria, hipertensión arterial, Diabetes Mellitus, enfermedad cardiovascular, tabaquismo, obesidad o tratamiento crónico con AINES (11).

La ERC aumenta la sensibilidad al DRA y este a su vez actúa acelerando la progresión de la ERC hacia el fallo renal, por lo que la detección temprana del DRA debe ser fundamental para tratar a tiempo la enfermedad renal o incluso evitar su acción en el paciente.

La transición de DRA a ERC nos indica que, durante este periodo entre los 7 y 90 días, existe una serie de modificaciones estructurales y fisiológicas que van restando funcionalidad a los riñones hasta que el daño termina siendo irreversible. Es por ello que el estudiar este proceso de transición adquiere cada vez un mayor interés traslacional, ya que busca identificar los cambios que suceden en el riñón detectando y evaluando la progresión

funcional y estructural de la enfermedad renal tras aplicar varios DRA experimentales, para poder a nivel clínico, desarrollar nuevos métodos clínicos de detección y abordaje que nos permitan adelantarnos a las consecuencias no deseadas sobre unos órganos tan importantes para el equilibrio interno.

OBJETIVOS

A partir de un modelo experimental in vivo sobre el cual se aplicará DRA isquémico y nefrotóxico, se proponen los siguientes objetivos:

- Evaluar los cambios en la función renal tras tres meses de aplicación de los DRA experimentales.
- Describir el daño histológico presente en muestras de tejido renal.
- Cuantificar el grado de fibrosis de muestras de tejido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los métodos de trabajo se realizaron siguiendo los Protocolos Normalizados de Trabajo (PNT) realizados por el Grupo TRECARD (<https://trecard.com/>) de la Universidad de Salamanca.

3.1. Diseño experimental

Se parte de un total de 35 ratas macho tipo Wistar de 8 semanas y con un peso entre los 200-260gr, a las que se le realizó acostumbamiento animal en jaulas metabólicas durante 24 horas, donde se controlaron las variables de ingesta (agua y comida), ciclo de luz y excreción urinaria para la posterior recogida de muestras y su procesamiento.

Los 35 animales se repartieron en 5 grupos de experimentación de manera aleatoria a los cuales se les fue aplicando dos o tres DRA de tipo nefrotóxico e isquémico espaciados en el tiempo. Además, se extrajeron muestras de sangre y de orina para el análisis de la función renal y otras variables analíticas y posteriormente se procedió al sacrificio de estas para la obtención de las muestras de riñón y su análisis estructural.

- **Grupo SHAM.** A este grupo de ratas se le realizó una laparotomía seguida de sutura sin aplicación de ningún daño. Se estableció como grupo control.
- **Grupo CP/I/I.** A estas ratas se les aplicó tres DRA espaciados en el tiempo. El primero consistió en la administración de una dosis de 5mg/kg de cisplatino (CP) por vía intraperitoneal. El segundo daño consistió en el clampaje de la arteria renal izquierda durante 60 minutos al cual se accedió por medio de una laparotomía y el tercer daño aplicando el mismo DRA isquémico (I) descrito anteriormente, pero en este caso del lado derecho.
- **Grupo CP/I.** A estas ratas se les aplicó dos DRA espaciados en el tiempo, que consistió en la administración de una dosis de 5mg/kg de CP y posteriormente el proceso de isquemia en el riñón izquierdo.
- **Grupo CP/C/I.** A estas ratas se les aplicó el mismo tipo de daño que el descrito anteriormente, pero en un intervalo de tiempo mayor.
- **Grupo C/I/I.** A estas ratas se les aplicó dos DRA de tipo isquémico. Se inició con la isquemia en la arteria renal izquierda y posteriormente en el lado derecho.

El experimento duró un total de 90 días (3 meses). La aplicación del primer DRA se realizó en el día cero "0" del experimento, el segundo DRA se aplicó entre el día 8-10 coincidiendo con el día de recuperación de la función renal, y el tercer DRA se aplicó en el día 24. Para los grupos con doble daño, el primer daño se aplicó en el día 0 mientras que el segundo daño se aplicó en el día 24.

En los días 56 (Segundo mes, en adelante M2) y 90 (Tercer mes, en adelante M3), se realizaron sacrificios a razón de 2 ratas por grupo, para realizar el estudio histológico de los riñones en los distintos tiempos.

Se tomaron muestras de sangre y de orina a todas las ratas de los distintos grupos experimentales el día 0 del experimento (en adelante tiempo: BASAL) antes de la realización del primer episodio de DRA, y previos al momento de su sacrificio (M2 y M3) para el análisis de la función renal.

3.2. Obtención y manejo de muestras de orina

Siguiendo el *PNT de Uso de Jaulas metabólicas y recogida de muestras de orina de rata*, se obtiene la orina de 24h recogida de las jaulas metabólicas y se vierte en tubos de poliestireno (PS) de 10ml, previamente identificados, para posteriormente centrifugarlos a 2000G durante 8 minutos. Se obtiene un líquido separado en tres fases: superior de aceite mineral (que evita la evaporación de la orina), fase intermedia que contiene la orina y la fase inferior que contiene restos de comida, heces u otros elementos. Se recoge toda la orina de la fase intermedia con ayuda de una pipeta Pasteur y se vierte en un nuevo tubo PS, para luego obtener alícuotas de 200µl en tubos de tipo Eppendorf, previamente identificados, que será de donde se tomarán las muestras para las determinaciones en orina.

3.3. Obtención y manejo de muestras de sangre

Seguindo el PNT de Extracción y procesamiento de sangre de rata, se obtienen muestras de aproximadamente 400µl (recogidas en tubos capilares para hematocrito), por el método de canulación de la vena de la cola, previa anestesia inhalatoria con isoflurano al 5% y posteriormente al 2%. Las muestras obtenidas se vierten en tubos de tipo Eppendorf de 1,5ml, previamente identificados; que se centrifugarán a 7000G durante 4 minutos y a una temperatura de 4°C. Una vez procesadas las muestras, se recoge el sobrenadante que corresponde al plasma, se transfiere a otro tubo Eppendorf, y luego se extraen las alícuotas necesarias de donde se tomarán las muestras para las determinaciones séricas.

3.4. Análisis de la función renal

3.4.1. Determinación de la concentración de creatinina en plasma y orina

Plasma: Utilizando el Kit comercial Quantichrom ® Creatinine assay kit DICT-500 de Bioassay Systems ® (San Francisco, CA, Estados Unidos) se determina la concentración de creatinina en muestras de orina y plasma por un método colorimétrico. Para ello, en una placa de 96 pocillos se añaden en pocillos distintos: 30µl de siete diluciones de creatinina conocidas que constituirán la recta patrón para el calibrado de las muestras y seguidamente 30µl de cada una de las muestras de plasma. Posteriormente, se adicionará a cada pocillo un volumen total de 200µl mezclando los reactivos A y B del kit comercial en una proporción 1:1. Una vez preparada la placa, se procederá a la lectura de la placa para medir su

absorbancia a los 0 y 5 minutos. Se calcula el incremento de la absorbancia restando los valores obtenidos en ambos tiempos y a partir de la ecuación de la recta patrón, se despejan las variables para calcular la concentración de creatinina.

Orina: Para ello se utiliza el mismo kit para la determinación de la concentración de CrP. En este caso a los pocillos se añaden 5µl de las diluciones que constituyen la recta patrón y seguidamente 5µl de cada una de las muestras de orina previamente diluidas en agua destilada (1:10). Posteriormente, se adicionará a cada pocillo un volumen total de 200µl mezclando los reactivos A y B del kit comercial diluidos en agua MiliQ en una proporción 0,5:0,5:1 respectivamente. Para la lectura, se realiza el mismo procedimiento que en el apartado anterior.

3.4.2. Determinación del aclaramiento de creatinina

El aclaramiento de creatinina (CrCl) es una técnica desarrollada para medir la función renal (TFG), empleando para ello el análisis de una muestra de sangre y orina y estudiando una sustancia que se excrete por vía urinaria y que únicamente se filtre sin ser reabsorbida ni secretada por los riñones. La creatinina es una sustancia que cumple parcialmente dichas características, ya que aproximadamente un 10-15% se secreta. Para determinar el aclaramiento de creatinina se requiere el valor de CrP creatinina urinaria (CrU) y el flujo urinario (V) por día dentro de la siguiente ecuación:

$$CrCl (ml/min) = \frac{CrU (mg/dl) \times V(ml/día)}{CrP (mg/dl) \times 1440min/día}$$

3.5. Análisis Histológico

Para el análisis histológico se obtuvieron muestras de tejido renal de las ratas en los días de sacrificio, que se enviaron al servicio de Patología Molecular Comparada de la Universidad de Salamanca para su procesamiento, inclusión en bloque de parafina, y realización de microcortes de 5µm de grosor, que sobre los portaobjetos se fijaron y colorearon con tinciones de hematoxilina-eosina y rojo sirio. Los preparados histológicos al microscopio se digitalizaron para su análisis con el software correspondiente.

3.5.2. Hematoxilina Eosina (H/E)

Es una de las tinciones más usadas en histología que usa dos colorantes; uno básico, la hematoxilina y otro ácido, la eosina, para teñir las diferentes estructuras de la célula (13). En el caso de la hematoxilina, esta se une por afinidad a las sustancias ácidas como el ADN para teñir el núcleo, y algunos elementos como los glucosaminoglicanos, para teñir la matriz extracelular (13). La eosina por su parte, tiene afinidad por estructuras proteicas, tiñendo de esta forma otros compartimentos de la célula, en este caso el citoplasma, y también se une al colágeno de la matriz extracelular (13). Al microscopio óptico la hematoxilina se observa de color morada, mientras que la eosina se observa de color rosado.

3.5.3. Rojo Sirio

Es una tinción con gran selectividad para las fibras colágenas, aunque no sea específica para las mismas (14). La tinción se combina con el microscopio de luz polarizada, para poder visualizar el tejido conectivo (14). Se utiliza en patologías crónicas como cirrosis hepática, arteriosclerosis, glomeruloesclerosis, entre otras. Tiñe de rojo las fibras del tejido conjuntivo excepto las fibras elásticas, y de amarillo el resto de elementos celulares como citoplasma, aunque los núcleos pueden observarse con una coloración rosácea.

3.5.4. Cuantificación de colágeno mediante la tinción de Rojo Sirio

El colágeno es una familia de proteínas que representa aproximadamente el 25 al 30% de todas las proteínas corporales (15). Se distribuye a lo largo del tejido conectivo o matriz extracelular y su función principal es dar soporte a las células, para lo cual forman un entramado de fibras que ofrece gran resistencia (15). La detección de colágeno en muestras histológicas permite analizar cómo se expresan y disponen dichas fibras conectivas en los distintos tejidos. Aparte de su papel en la resistencia e integridad de los tejidos, el colágeno es protagonista en procesos inflamatorios crónicos, ya que expresa, aumentando su producción (15,16). Cuantificar el colágeno tisular sirve como herramienta para el diagnóstico clínico de la fibrosis (16).

Para realizar la cuantificación de colágenos se siguió un protocolo de Cuantificación de Fibrosis con Rojo Sirio del grupo TRECARD y se utilizaron los siguientes programas en el mismo orden: OlyVIA versión 2.6 de Olympus Soft Imaging Solutions GmbH (Münster,

Alemania), Microsoft® PowerPoint® 2013 (versión 15.0.5325.1000) de Microsoft Office 365ProPlus e ImageJ versión 1.53k desarrollado por los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (*En inglés, National Institutes of Health, NIH, USA*) y de dominio público.

En el programa OlyVIA se cargaron los archivos digitalizados correspondientes a los cortes histológicos de riñón ya teñidos, se realizaron ajustes de color para conseguir el mismo brillo y tonalidad en todas las imágenes y se obtuvieron cinco tomas aleatorias de cada una de las áreas del riñón: corteza, medula externa y médula interna. En caso de las imágenes teñidas con H/E, solo se realizaron cinco tomas del área cortical.

Posteriormente, se copiaron las imágenes en Power Point, para ajustar el tamaño (18,2cm x 32,7cm) y luego guardar el archivo como formato .TIFF, compatible con el programa ImageJ. Finalmente, en el programa ImageJ se cambió la escala de píxeles a micrómetros y tras pasar la imagen a una escala de blanco y negro, con la herramienta *Threshold*, se ajustó el área de píxeles correspondiente a la tinción roja para calcular su área en micrómetros al cuadrado (μm^2). Una vez ajustada el área, se midió y se obtuvo el valor absoluto de área de colágeno definido por sus límites superior e inferior del *threshold*, y el porcentaje de área respecto al área total.

Para las imágenes con H/E solo se utilizó el programa OlyVIA y Power Point para identificar los distintos tipos de daño histológico observados en cada imagen a través de una leyenda gráfica. Los archivos fueron guardados en formato .JPG. Para presentar visualmente el análisis con la tinción de H/E en este trabajo, se seleccionó una imagen representativa de cada grupo experimental en M3.

3.6. Análisis estadístico

Todos los datos obtenidos en este estudio fueron introducidos en un base de datos creada en el software Microsoft® Excel® 2013 (versión 15.0.5441.1000) de Microsoft Office 365ProPlus y para el análisis estadístico se utilizó el software GraphPad Prism7, de GraphPad Software (San Diego, CA, Estados Unidos). Los valores de CrP y CrCl fueron introducidos en la base de datos para el análisis de la función renal y los valores de área relativa de colágeno (ARC) para el análisis del grado de fibrosis.

Se realizaron distintos ANOVA de dos vías con el post-test de Dunnet. para comparar los distintos grupos experimentales con el grupo SHAM y con el post-test de Tukey para comparar cada grupo respecto al tiempo basal, M2 y M3. Se consideró que existía significación estadística cuando el p-valor era inferior a 0,05 y significación mayor o alta cuando el p-valor tomaba valores inferiores a 0,01.

Los datos se representaron como la media \pm el error estándar en un gráfico de barras. Para representar la función renal, en el eje de las abscisas se dispusieron los grupos experimentales agrupados en tres tiempos: basal, M2 y M3 y en el eje de ordenadas los valores de los parámetros correspondientes (CrP en mg/dl y CrCl en ml/min). Para la representación del grado de fibrosis, en el eje de las abscisas se dispusieron los grupos experimentales, subdivididos en derecho e izquierdo, y se agruparon en dos tiempos: m2 y m3. En el eje de las ordenadas se dispusieron los valores del ARC en sus unidades correspondiente (μm^2).

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Análisis de la función renal

4.1.1. Creatinina plasmática y aclaramiento de creatinina

Los valores normales de CrP en ratas de laboratorio están entre 0,4 y 1,5 mg/dl según el método de análisis empleado (17). Según Goñi et al., este valor se encuentra entre 0,32 y 0,71mg/dl para ratas entre 5 – 8 semanas (18).

Tras realizar el análisis de cada valor por separado, observamos que todos los valores de CrP se encontraban dentro de los rangos de normalidad, sin embargo, se encontraron diferencias al analizar su evolución en el tiempo (Basal, M2 y M3), dentro de los grupos y entre los mismos.

Se observó que el valor de CrP en los grupos donde se aplicó un daño mixto, isquémico y tóxico (CP/I/I, CP/C/I y CP/I), aumentó de manera significativa en los tres meses siguientes respecto a su valor basal y también respecto al grupo control. En el grupo que solo sufrió daño de tipo isquémico (C/I/I), la CrP aumentó ligeramente pero su valor no alcanzó

una diferencia significativa hasta el tercer mes de evolución, y no se encontraron diferencias significativas frente al grupo control (Fig. 3).

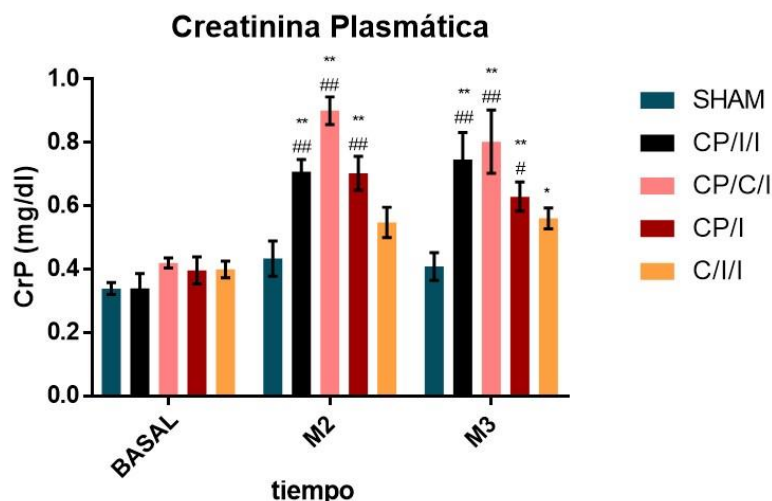


Figura 3. Valores de CrP expresados en mg/dl en los tres momentos del experimento. Significaciones estadísticas: (**) de los grupos frente al tiempo BASAL con un p valor <0,01; (*) de los grupos frente al tiempo BASAL con un p valor <0,05; (##) de los grupos frente al grupo SHAM con un p valor <0,01; (#) de los grupos frente al grupo SHAM con un p valor <0,05. C: control, CP: Cisplatino, CrP: Creatinina plasmática, I: Isquemia, M2: Segundo mes, M3: tercer mes, SHAM: grupo control.

Considerando que la creatinina es un metabolito que se filtra casi en su totalidad por el riñón (19), observamos que su concentración aumentó significativamente en los grupos de DRA. A pesar de que los valores se encuentran en sus límites teóricamente normales, se observa una alteración en la filtración glomerular que condiciona el incremento de creatinina en los grupos que experimentaron DRA frente al grupo control. Ante una reducción de la filtración en torno al 20% del valor basal para el grupo control, los grupos con daño isquémico y tóxico tuvieron un descenso de la filtración por encima del 50%, lo cual explica que, aunque los valores no sobrepasen los rangos de normalidad, los aumentos han sido significativos (incremento de CrP en M2 y M3 frente al valor basal respectivamente, CP/I/I: 108,5% y 119,7%; CP/C/I: 114,6% y 91,3%; CP/I: 77,3% y 58,7%). Para el grupo con daño isquémico esta reducción de la filtración no superó el 50% (incremento de CrP en M2 y M3 frente al valor basal respectivamente C/I/I: 37% y 40,2%).

En cuanto al aclaramiento, se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos que experimentan un daño mixto (isquémico y tóxico) con respecto al grupo control (Fig.4). Existe una disminución estadísticamente significativa del CrCl de los grupos

con daño mixto, siendo el grupo CP/C/I el que ha sufrido un mayor descenso (-52,92%) seguido del grupo CP/I (-42,98%) y el grupo CP/I/I (-39,85%). En cuanto al grupo que solo ha recibido daño de tipo isquémico (C/I/I), se observa una disminución del aclaramiento (-18,50%) pero no es significativa con respecto a SHAM frente a los grupos anteriores.

Ante los resultados expuestos, podemos decir que la función renal se ha visto afectada en el tiempo, ya que se observa que hay una disminución del aclaramiento de creatinina con un acumulo de dichas sustancias en sangre, en especial en los grupos que han recibido un daño tóxico con cisplatino. Los animales que han experimentado dos DRA isquémicos son los que experimentan un menor descenso del aclaramiento, observando así que el CP es un agente que interfiere sobre la función renal en mayor medida que la propia isquemia infringida sobre los distintos grupos experimentales.

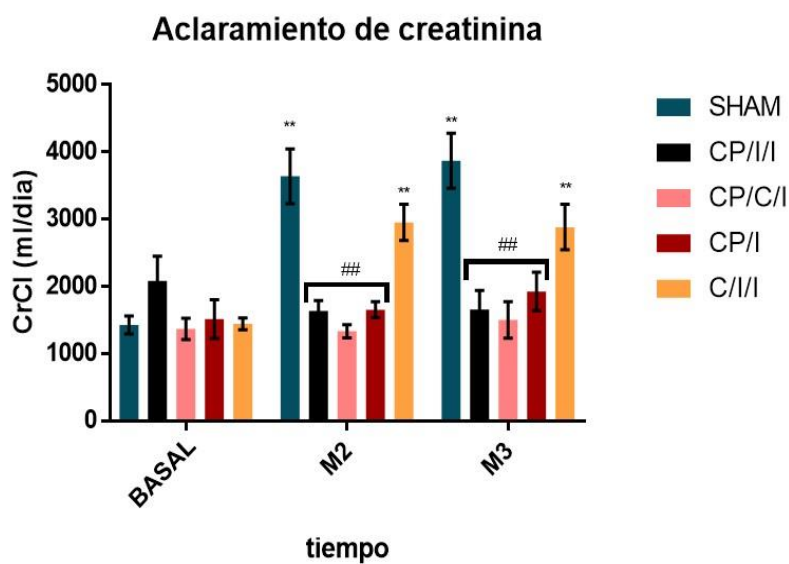


Figura 4. Aclaramiento de creatinina expresado en ml/día en los tres momentos del experimento. Significaciones estadísticas: (**) de los grupos frente al tiempo BASAL con un p valor <0,01; (*) de los grupos frente al tiempo BASAL con un p valor <0,05; (##) de los grupos frente al grupo SHAM con un p valor <0,01; (#) de los grupos frente al grupo SHAM con un p valor <0,05. C: control, CP: Cisplatino, CrP: Creatinina plasmática, I: Isquemia, M2: Segundo mes, M3: tercer mes SHAM: grupo control.

El cisplatino, tiene una alta afinidad por el tejido renal, lo cual explica gran parte de sus efectos nefrotóxicos. Esto se debe a que el cisplatino se une de manera covalente a las proteínas de las células del epitelio tubular, favoreciendo así la toxicidad por un periodo de tiempo prolongado (20) con respecto a la propia isquemia controlada en el ensayo experimental. Sin embargo, el CP no solo induce lesión y muerte de las células tubulares, sino que además tiene efectos sobre los vasos renales lo cual, por aumento de las resistencias vasculares, provoca una disminución de la perfusión local, de la TFG y favorece así el daño isquémico (21,22). Es por esta razón que los grupos que reciben dosis de CP potencian y

mantienen en el tiempo el daño isquémico, afectando la depuración renal de creatinina y aumentando así sus concentraciones en el plasma

4.2. Estudio histológico

Tinción Hematoxilina-eosina

Para las imágenes teñidas con H/E se describieron los cambios histopatológicos observados en el área cortical en el tercer mes. Los cambios se agrupan en cuatro regiones, siendo los cambios glomerulares y tubulares los más importantes, seguidos de los cambios en el intersticio y en los vasos sanguíneos.

La corteza renal tiene un aspecto granular, debido a la presencia de los glomérulos renales rodeados a su vez por los túbulos contorneados proximales teñidos con eosina. En cuanto al epitelio tubular, es de tipo cubito simple con presencia de microvellosidades, lo cual permite aumentar la superficie de intercambio a este nivel, haciendo que la luz tubular sea muy estrecha e incluso imperceptible al microscopio. Esta disposición de la corteza es observable en el grupo SHAM (Fig. 5A), y los cambios apreciables a nivel celular responden a procesos celulares y fisiológicos no atribuibles a ningún tipo de daño.

Tras un DRA, los túbulos renales son los más afectados, en concreto los túbulos contorneados proximales ubicados en la corteza. Los cambios observados en los túbulos fueron: atrofia de las células que forman el epitelio y dilatación de la luz tubular, así como infiltrado inflamatorio peritubular, todo ello acompañado de una tinción basófila del epitelio celular. En la luz tubular se observaron cilindros urinarios (CAST) hialinos y celulares.

Todos estos cambios contrastan con la presencia de túbulos adyacentes intactos o que están comenzando a sufrir cambios, entre ellos el cambio de tinción eosinófilo a basófilo. Algunos túbulos experimentaron tantos cambios que perdieron su proporción en el tejido, dejando una luz tubular muy dilatada que daba el aspecto de espacios huecos en la imagen.

Los cambios glomerulares observados también variaron entre las distintas regiones e imágenes obtenidas. En cuanto al tamaño de los glomérulos, este no se tomó en cuenta ya que el tamaño variaba según la zona de estudio y el nivel del corte histológico. El cambio más destacable en cuanto al glomérulo fue el aumento del grosor de la membrana basal de la cápsula respecto al grupo control.

A los cambios tubulares y glomerulares, se añaden los cambios en el intersticio debido al proceso inflamatorio. En los grupos de daño, el intersticio aumentó su área que antes era escasa y se observaron grandes conglomerados de células inflamatorias mononucleares distribuidas de manera difusa en el intersticio y sobre todo próximos a los vasos sanguíneos y túbulos proximales. Con la tinción de H/E no es posible identificar el colágeno, sin embargo, se observó que la matriz extracelular estaba ocupada por una red que podría sugerir el depósito de tejido fibroso en las zonas afectadas.

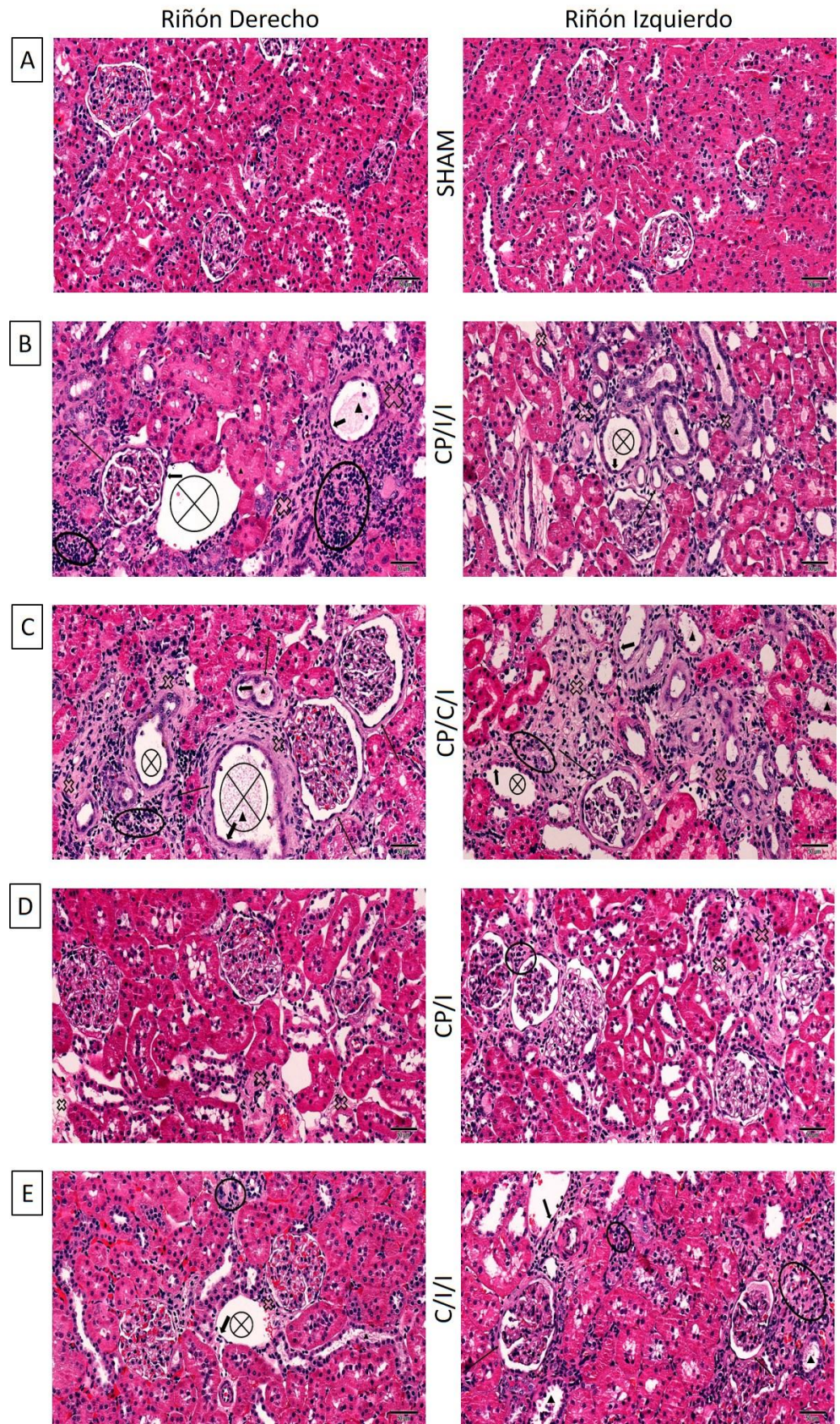
En los grupos que recibieron un daño de tipo mixto se observó una mayor dilatación de los túbulos respecto al grupo con daño isquémico (C/I/I). En ellos, la dilatación de los túbulos era más evidente hacia la zona cortico medular y medular, mientras que, en la zona cortical, la infiltración celular era más predominante. Este patrón de daño tubular se debe a que el DRA de tipo tóxico produce una lesión con necrosis franca de los túbulos, donde el epitelio sufre cambios y desprendimiento de células hacia la luz (23,24).

En el grupo CP/I/I (Fig.5B) se observaron los cambios producidos por el daño tóxico e isquémico con mayor claridad e intensidad. Los túbulos dilatados estuvieron en mayor proporción respecto a los grupos CP/C/I y CP/I (Fig. 5C y 5D). La membrana basal epitelial se veía más engrosada y con mayor infiltrado peritubular.

A nivel celular, se observaron cambios reversibles e irreversibles. Los cambios reversibles son la tumefacción turbia (aumento del volumen donde el citoplasma se visualiza con aspecto turbio) y la vacuolización progresiva de la célula (desde degeneración vacuolar a degeneración vesicular). Los cambios irreversibles responden a los procesos de apoptosis y necrosis, donde el aspecto circular del núcleo va cambiando progresivamente hasta finalmente fragmentar la célula hacia la luz tubular.

Todos estos cambios estructurales fueron más evidentes en los riñones izquierdos frente a los derechos cuando el daño isquémico solo afectaba a un riñón, mientras que fueron similares cuando el daño isquémico era bilateral.

Figura 5. Alteraciones estructurales de los tejidos renales con la tinción de hematoxilina-eosina. Cortes histológicos (200x) del área cortical representativas de cada grupo experimental en el punto final del experimento (M3), con una escala de 50µm. Se señalan los cambios glomerulares: engrosamiento de la membrana basal (flecha delgada); cambios tubulares: dilatación de la luz (circulo con cruz), depósitos hialinos o celulares (triangulo negro), aplanamiento del epitelio tubular (flecha gruesa) y engrosamiento de la membrana basal (flecha delgada); y cambios en el intersticio: infiltrado inflamatorio (ovalo negro) y aumento del espacio intersticial (cruz negra hueca). C: control, CP: Cisplatino, I: Isquemia, SHAM: grupo control.



4.3. Estudio del grado de fibrosis

Todos los grupos a los que se aplicó un DRA experimentaron cambios frente al grupo control con resultados estadísticamente significativos (p valor $< 0,01$) tanto para las imágenes de riñón derecho como del izquierdo.

En cuanto a la progresión en el tiempo, los grupos CP/I/I y CP/I presentaron diferencias significativas entre M2 y M3, donde el ARC total, tuvo un incremento por encima del cien por ciento en ambos grupos tanto para el riñón derecho como el izquierdo siendo el incremento más acusado en el segundo grupo (Incremento total en CP/I/I: 169,24% derecho y 100,272% izquierdo. CP/I: 225,49% derecho y 182% izquierdo).

El grupo CP/C/I a pesar de no arrojar cambios significativos en el tiempo, fue el que mayor cantidad de colágeno total por μm^2 mostró en el segundo mes frente al resto de grupos (Fig. 7A), con un área media de colágeno de $12737,3 \mu m^2$ para el riñón derecho y de $16085,9 \mu m^2$ para el riñón izquierdo, frente al grupo SHAM cuya área media fue de $2111,7 \mu m^2$ para el riñón derecho y $1253,58 \mu m^2$ para el riñón izquierdo destacando, así como el grupo con mayor cantidad de fibrosis. En el tercer mes, los grupos con DRA fueron igualando las área medias entre sí.

En cuanto a la distribución por región: cortical, medular externa y medular interna (Fig. 7B, 7C y 7D), se mantuvieron las diferencias altamente significativas entre M2 y M3 en la corteza para los grupos CP/I/I y CP/I, y estadísticamente significativas para los grupos C/I/I en ambos riñones y CP/C/I en el riñón izquierdo.

Para la medula externa (Fig.7C), se mantuvieron diferencias altamente significativas en el grupo CP/I y estadísticamente significativas en el grupo CP/C/I del lado al que se le aplicó el daño isquémico (izquierdo) así como para la medula interna (Fig. 7D). En el caso del grupo de triple daño (CP/I/I) la diferencia fue significativa solo en el riñón derecho para ambas regiones que aumentó con diferencia su área de colágeno respecto al segundo mes.

Hay que destacar que a pesar de no haber diferencias significativas en el grupo CP/C/I en el tiempo, este fue el que presentó mayor grado de fibrosis respecto al grupo SHAM a los dos meses (ARC en SHAM: $3443 \mu m^2$ -derecho- y $2560 \mu m^2$ -izquierdo vs. ARC en CP/C/I: $12576 \mu m^2$ -derecho- y $14660 \mu m^2$ - izquierdo-). En los grupos donde el daño isquémico

solo afectó al riñón izquierdo, se observa mayor fibrosis frente al lado derecho, mientras que a los que se les aplicó daño isquémico en ambos riñones, el grado de fibrosis fue más equilibrado en ambos lados.

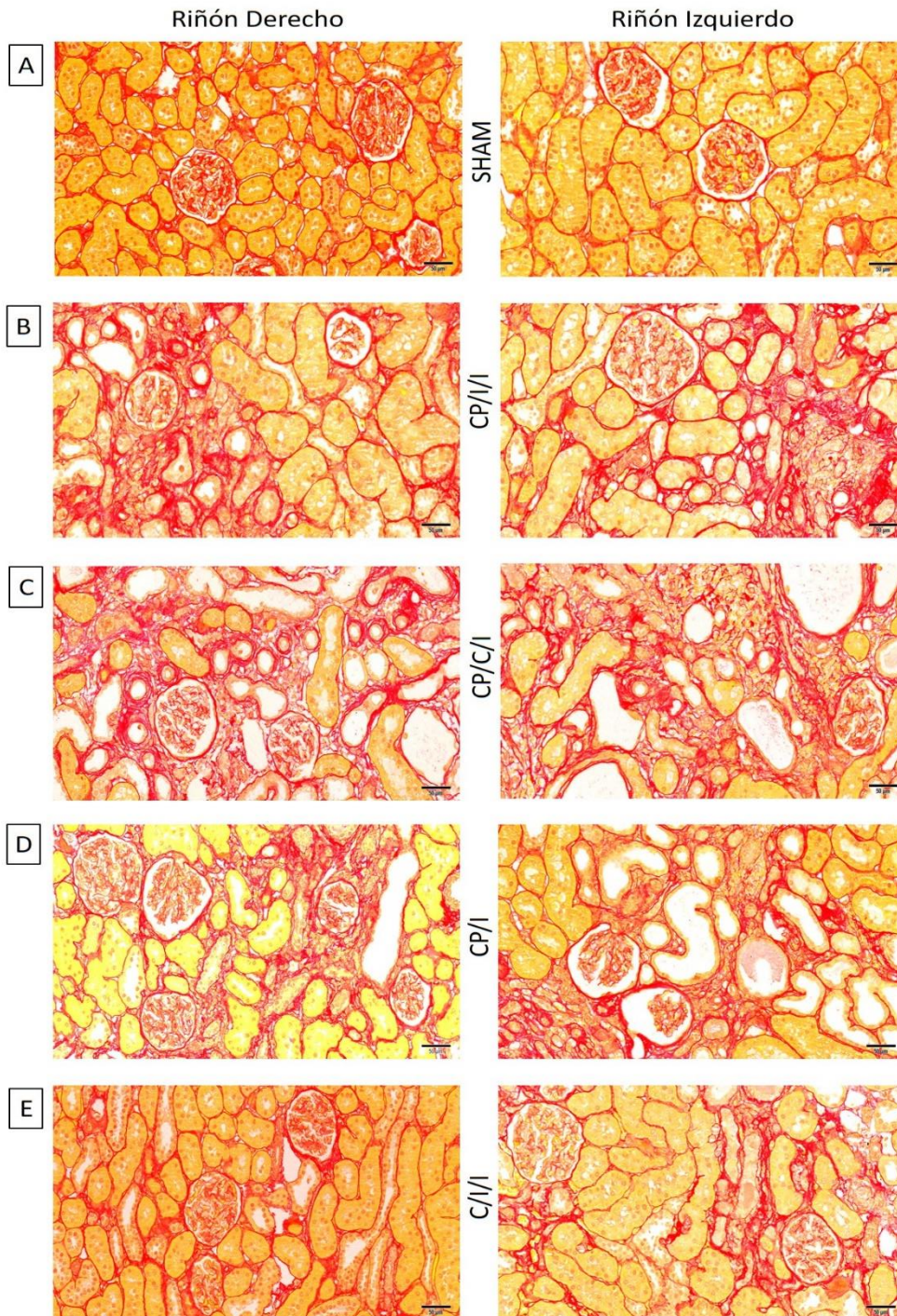


Figura 6. Estudio de la fibrosis en el tejido renal con la tinción Rojo sirio. Cortes histológicos (200x) del área cortical representativas de cada grupo experimental en el punto final del experimento (M3), con una escala de 50µm.

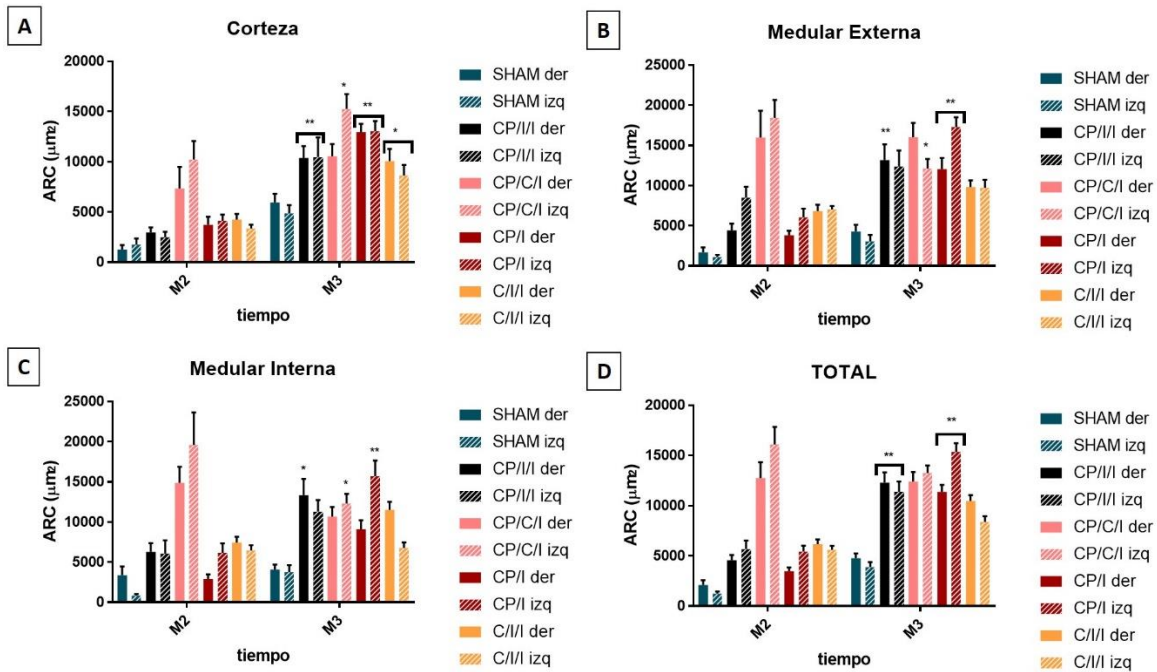


Figura 7. Cuantificación total (A) y por regiones (corteza B, medular externa C, medular interna D) del grado de fibrosis en los riñones derecho e izquierdo analizado con la tinción de Rojo Sirio. Significaciones estadísticas:(**) de los grupos frente al tiempo BASAL con un p valor $<0,01$;(*) de los grupos frente al tiempo BASAL con un p valor $<0,05$. El corchete indica que la significación afecta a ambos lados del mismo grupo (derecho e izquierdo). ARC: Área Relativa de Colágeno, C: control, CP: Cisplatino, der: riñón derecho I: Isquemia, izq: riñón izquierdo, M2: Segundo mes, M3: tercer mes, SHAM: grupo control.

CONCLUSIONES

El análisis de la función renal determinado como aclaramiento de creatinina muestra que tras 90 días de exposición a distintos tipos de DRA existe un ligero descenso en los procesos de filtración glomerular que no permiten establecer un diagnóstico claro de ERC de modo que sería necesario prolongar el estudio y seguir la evolución de la función renal en un periodo de tiempo mayor.

Los hallazgos histológicos demuestran que a nivel estructural se están produciendo cambios en el tejido renal que progresan de forma acelerada pero que en la clínica pasan de forma inadvertida. Se podrían incorporar otras tinciones histológicas específicas para determinar otro tipo de daños en la estructura tubular, como puede ser la Técnica de Schiff para el estudio del borde en cepillo que resulta bastante afectado.

La determinación del grado de fibrosis aporta datos que nos permite confirmar que el daño agudo sobre el tejido renal ha ido evolucionando hacia la cronicidad con el depósito de tejido fibroso intersticial acompañado de un descenso leve del aclaramiento de creatinina, medida que claramente es insuficiente para evaluar la función real.

Estos hallazgos demuestran que, dentro de la clínica se necesita disponer de nuevos marcadores de función renal que permitan evaluar la evolución del daño en estadios más tempranos y cuando las medidas de función habituales (creatinina plasmática, aclaramiento renal) se encuentran aún dentro de la normalidad.

BIBLIOGRAFIA

1. Gal Iglesias B, López Gallado M, Martín Velasco AI, Prieto Montalvo J. Bases de la Fisiología. Editorial. Madrid; 2007. 626 p.
2. Gaínza de los Ríos FJ. Insuficiencia Renal Aguda. Nefrol al día [Internet]. Disponible en: <https://www.nefrologiaaldia.org/es-articulo-insuficiencia-renal-aguda-317>
3. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. Off J Int Soc Nephrol [Internet]. 2012;2(1). Disponible en: <http://www.kidney-international.org>
4. Chawla LS, Bellomo R, Bihorac A, Goldstein SL, Siew ED, Bagshaw SM, et al. Acute kidney disease and renal recovery: Consensus report of the Acute Disease Quality Initiative (ADQI) 16 Workgroup. Nat Rev s Nephrol [Internet]. 2017;13(4):241–57. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nrneph.2017.2>
5. Lorenzo Sellarés V, Luis Rodríguez D. Enfermedad Renal Crónica. Nefrol al día [Internet]. 2021; Disponible en: <https://www.nefrologiaaldia.org/136>
6. Otero A, de Francisco A, Gayoso P, García F. Prevalence of chronic renal disease in Spain: Results of the EPIRCE study. Rev Nefrol. 2010;30(1):78–86.
7. Arrieta J. Evaluación económica del tratamiento sustitutivo renal (hemodiálisis, diálisis peritoneal y trasplante) en España. Rev Nefrol. 2010;1(Suppl 1):37–47.
8. de Francisco ALM. Sostenibilidad y equidad del tratamiento sustitutivo de la función renal en España. Rev Nefrol. 2011;31(3):241–6.
9. Otero A, Gayoso P, García F, de Francisco AL. Epidemiology of chronic renal disease in the Galician population: Results of the pilot Spanish EPIRCE study. Kidney Int. 2005;68(SUPPL. 99):16–9.
10. Tenorio Cañamás MT, Galeano Álvarez C, Rodríguez Mendiola N, Liaño García F. Diagnóstico diferencial de la insuficiencia renal aguda. Nefroplus [Internet]. 2010;3(2):16–32. Disponible en: <http://www.revistanefrologia.com/modules.php?name=articulos&idarticulo=10548&idlangart=ES>
11. Martínez-Castelao A, Górriz JL, Bover J, Segura-de la Morena J, Cebollada J, Escalada J, et al. Documento de consenso para la detección y manejo de la enfermedad renal crónica. Rev Nefrol. 2014;34(2):243–62.
12. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. Off J Int Soc Nephrol [Internet]. 2013;3(1):150. Disponible en: <https://www.kidney-international.org/>
13. Megías M, Molist P, Pombal MA. Técnicas histológicas. Tinción. [Internet]. Universidad de Vigo; 2018. Disponible en: <https://mmegias.webs.uvigo.es/descargas/tecnicas-tincion.pdf>

14. Garcia Bermejo MJ. Coloraciones para tejido conjuntivo. In: Editorial Mad SL, editor. Técnico Especialista en Anatomía Patológica del Servicio Gallego de Salud [Internet]. Sevilla; 2006. Disponible en: <https://books.google.es/books?id=v3WYlx7FCHAC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>
15. Megías M, Molist P, Pombal MA. Matriz Extracelular. In: Atlas de Histología Vegetal y Animal [Internet]. Universidad de Vigo; 2021. Disponible en: <https://mmegias.webs.uvigo.es/descargas/atlas-celula-02-matriz-extracelular.pdf>
16. Segnani C, Ippolito C, Antonioli L, Pellegrini C, Blandizzi C, Dolfi A, et al. Histochemical detection of collagen fibers by sirius red/fast green is more sensitive than van gieson or sirius red alone in normal and inflamed rat colon. *PLoS One*. 2015;10(12):1–10.
17. Bolani Hernández B, Calvo Bermúdez MA, Cejalvo Lapeña D, Gimeno Forner O, Gimeno Forner L, Lloris Carsí J. Hematología y Bioquímica Clínica de la Rata (parte 2). *Res Surg*. 1990;supp 4:12–20.
18. Goñi Avelina L, Blanco D, Peña A, Ronda M, Gonzalez B, Arteaga ME, et al. Valores hematológicos y bioquímicos de las ratas Sprague Dawley producidas en CENPALAB, Cenp: SPRD. *Rev Electron Vet*. 2011;12(11).
19. Carracedo J, Ramírez R. Fisiología Renal. *Soc Española Nefrol* [Internet]. 2020;1–20. Disponible en: <https://www.nefrologiaaldia.org/es-articulo-fisiologia-renal-335>
20. Bernal-Barquero CE, Vázquez-Zapién GJ, Mata-Miranda MM. Revisión de las alteraciones en la expresión génica y vías apoptóticas provocadas en la nefrotoxicidad inducida por cisplatino. *Nefrología*. 2019;39(4):362–71.
21. Pabla N, Dong Z. Cisplatin nephrotoxicity: Mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney Int* [Internet]. 2008;73(9):994–1007. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ki.5002786>
22. Ozkok A, Edelstein CL. Pathophysiology of cisplatin-induced acute kidney injury. *Biomed Res Int*. 2014;2014.
23. Fogo AB, Lusco MA, Najafian B, Alpers CE. AJKD atlas of renal pathology: Toxic acute tubular injury. *Am J Kidney Dis* [Internet]. 2016;67(6):e31–2. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1053/j.ajkd.2016.04.003>
24. Fogo AB, Lusco MA, Najafian B, Alpers CE. AJKD Atlas of Renal Pathology: Ischemic Acute Tubular Injury. *Am J Kidney Dis* [Internet]. 2016;67(5):e25. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1053/j.ajkd.2016.03.003>