

UNIVERSIDAD DE SONORA

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO- BIOLÓGICAS**

Implementación de un modelo experimental de nefrolitiasis en ratas



Presenta:

Marco Antonio Chacón Flores

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del jurado designado para revisar la tesis de **Marco Antonio Chacón Flores**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el título de **Químico-Biólogo Especialidad Análisis Clínicos**.

Dra. Adriana Garibay Escobar
Director de Tesis

Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda
Secretario

M. en C. Rafael Cannet Romero
Vocal

M. en C. Martha Judith Valdez
Suplente

DEDICATORIA

A mi padre Q. P. D., a mi madre, a Mónica, Ámbar y Jade

AGRADECIMIENTOS

Primeramente quisiera agradecer ante todo a Dios, por haberme permitido estar en armonía con todas las personas que hicieron posible la realización de este trabajo y por haberles dado los recursos y las posibilidades de ayudarme. A mi padre que aunque ya no está físicamente con nosotros, su amor, valor, ideales y sus enseñanzas, formó lo que ahora soy y me acompaña siempre en mi corazón, te amo, a mi madre por su amor, su fuerza y que siempre me enseñó las cosas más lindas de la vida y siempre supo que yo puedo, aún cuando yo no tenía la razón y respetando mis ideas sin abandonarme un instante, madre te amo. A mis hermanos por su apoyo y todos los momentos difíciles que viví y vivimos los amo. A Bárbara quien me enseñó a no rendirme y por la idea. A mi esposa e hijas por su amor, paciencia y el estar siempre conmigo, por existir, por ser la causa de mi existir y de mi fuerza, las amo. Un agradecimiento muy especial y toda mi gratitud para la Dra. Adriana Garibay Escobar por su paciencia y guía, pues fue ella quien confió en mí y me apoyó cuando nadie lo hizo, y sin ello jamás lo habría logrado, por todos los acentos ¡¡mil gracias!! Al profesor investigador M. en C. Rafael Cannet Romero por todo su tiempo, paciencia, enseñanzas y días que lo hice madrugar, a la Dra. Adela Rascón Alcantar y al T. H. Francisco Fernando Pacheco Ruiz por su amistad, apoyo, enseñanzas, paciencia y facilidades que me brindaron todo este tiempo. A todas aquellas personas que no creyeron en mí pues me hicieron más fuerte y a las que creyeron en mí pues me hacen feliz. A la Universidad de Sonora y al Departamento de Ciencias Químico Biológicas por los recursos brindados y a todas aquellas personas que me veían en la calle y aportaron ese granito de arena para poder sacar adelante a mi familia y mis estudios, y a todas aquellas personas que algún día creyeron y dejaron de creer, a los que estuvieron, a los que están, a los que dijeron si y los que dijeron no, a los que decepcioné y a todas las personas que olvido mencionar.

¡¡GRACIAS!!!

CONTENIDO

	PÁGINA
FORMA DE APROBACIÓN	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
CONTENIDO	v
LISTA DE FIGURAS	vii
OBJETIVOS	viii
General	viii
Particulares	viii
RESUMEN	ix
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	5
Nefrolitiasis	5
Modelo Animal de Nefrolitiasis y Algunos Estudios	6
Modelo Animal de Nefrolitiasis en Ratas Wistar	7
Modelo Animal de Nefrolitiasis en Ratas Sprague Dawley	8
Modelo Animal de Nefrolitiasis en Ratón	9
MATERIALES Y MÉTODOS	10
Bioensayo	10
Sujetos de Experimentación	10
Formación de Grupos de Experimentación	11
Inducción Experimental de Nefrolitiasis Vía Administración	
Oral de Etilenglicol y Cloruro de Amonio	11
Obtención de Orina de 24 horas	11
Análisis Químico de Orina con Tira Reactiva	13
Examen Microscópico de Sedimento Urinario	13
Análisis Histopatológico	13
Toma de la Muestra	14
Fijación	14
Inclusión	15
Microtomía	17

	PÁGINA
Tinción	19
Tinción de Hematoxilina Eosina	20
Tinción de Pizzolato	21
Tinción Tricrómica de Masson	21
RESULTADOS	22
Análisis Macroscópico	22
Volumen de Líquido Ingerido	22
Cantidad de Alimento Ingerido	24
Volumen Urinario	25
Análisis Químico de Orina con Tira Reactiva	26
Examen Microscópico de Sedimento Urinario	27
Prueba Histopatológica	31
Otros Resultados	33
DISCUSIÓN	34
CONCLUSIONES	37
RECOMENDACIONES	38
BIBLIOGRAFÍA	39
ANEXOS	44
Anexo 1. Técnicas de Tinción Histológica	45
Anexo 2. Volumen de Líquido Ingerido Diariamente	49
Anexo 3. Comida Ingerida por Rata de Experimentación	50
Anexo 4. Volumen Urinario	51
Anexo 5. Análisis Químico de Orina con Tira Reactiva	52
Anexo 6. Resultados y Observaciones del Examen Microscópico de Sedimento Urinario	57
Anexo 7. Resultados y Observaciones del Examen Histopatológico	67

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Rata Wistar	10
2. Caja metabólica utilizada para la recolección de orina de 24 horas	12
3. Unicaset	15
4. Deshidratador	16
5. Centro de inclusión con parafina	17
6. Microtomo semiautomático	18
7. Baño María	18
8. Horno.	19
9. Esquema general del proceso de rehidratación, tinción y deshidratación de los cortes histológicos	20
10. Disección y extracción de los riñones de las ratas de los tres grupos de experimentación una vez terminado el periodo de inducción de nefrolitiasis (día 24)	23
11. Volumen medio de líquido ingerido diariamente por grupo de experimentación durante el periodo de inducción de 24 días	24
12. Ingesta de alimento promedio por grupo de experimentación durante el periodo de inducción de nefrolitiasis de 24 días	25
13. Volumen urinario promedio por grupo de experimentación durante el periodo de inducción de nefrolitiasis de 24 días	26
14. Resultado representativo por grupo del examen microscópico de sedimento urinario. Observaciones a 60 x	30
15. Resultados y observaciones representativas por grupo del examen histopatológico realizado al finalizar el periodo de inducción (día 24) a todas las ratas de experimentación	32

OBJETIVOS

Objetivo General

Implementar un modelo experimental de nefrolitiasis en ratas Wistar a través de la administración oral de etilenglicol y cloruro de amonio.

Objetivos Específicos

- Inducir nefrolitiasis en ratas Wistar mediante la administración de etilenglicol y cloruro de amonio vía oral.
- Analizar las muestras de orina de los sujetos en estudio a través de un examen general de orina.
- Evaluar por histología los cálculos renales.

RESUMEN

La nefrolitiasis, urolitiasis o cálculos renales es una enfermedad que ha venido en aumento en los últimos años, así que la implementación de un modelo animal abre la posibilidad de estudiar este padecimiento más a fondo para la obtención de nuevos y mejores tratamientos contra esta enfermedad. Para la implementación de este modelo se utilizaron ratas Wistar de 170 a 210 g de peso, de 7 a 9 semanas de edad y se les administró etilenglicol al 0.75% y cloruro de amonio al 1% vía oral en el agua que bebieron diariamente, durante un periodo de 3 días. Posteriormente se administró solo etilenglicol por 3 semanas más. Se tomaron muestras de orina antes del inicio de la inducción y los días 4, 7, 14 y 21 una vez iniciada la inducción. Se monitorizó el volumen de agua ingerido diariamente, la cantidad de comida ingerida y volumen urinario. Se realizó la prueba de tira reactiva en orina para tratar de llevar un seguimiento del proceso de inducción, así como prueba de sedimento urinario para el diagnóstico de cristaluria. Finalmente se extrajeron los riñones (día 24) y se fijaron en formol para realizar la prueba histopatológica para el diagnóstico y observación de los cálculos formados. Los resultados demostraron que al cabo del tercer día ya es posible observar cristales de oxalato de calcio en la orina, sin presencia de hematíes, ni leucocitos. Mientras que el día 24, se pudo observar en los cortes histológicos renales de todas las ratas inducidas, túbulos renales dilatados, fibrosis glomerular en algunos casos y en todos los casos se observaron depósitos de calcio o cálculos de calcio mediante la tinción de Pizzolato.

INTRODUCCIÓN

La litiasis renal, también denominada urolitiasis o nefrolitiasis es la mayor causa de morbilidad que envuelve al tracto urinario, y se refiere a la condición de tener o formar piedras (cálculos) en los riñones o en las vías urinarias,¹ también se define como la formación de fases sólidas en los pasajes urinarios.²

Aunque los cálculos renales son frecuentes en las poblaciones mundiales, la incidencia varía en función del área geográfica, distribución racial, nivel socioeconómico y hábitos alimenticios. Cambios en algunos factores durante las décadas pasadas han afectado la incidencia, el sitio de formación y la composición del cálculo. En la actualidad los cálculos de oxalato de calcio son los de mayor prevalencia,^{3,4,5} más aún, puede decirse que los cálculos de calcio son los de mayor incidencia entre la población de los países desarrollados,⁶ afectando como promedio a uno de cada ocho personas entre la tercer y sexta década de vida.⁷ En Europa Occidental se estima una incidencia de 0.5% y una prevalencia del 5-9%.^{1,8} En la población general se estima que la frecuencia es del 2% al 5%, en España la incidencia de litiasis alcanza el 4.2% de la población.

En México se han efectuado pocos estudios epidemiológicos sobre urolitiasis, pero se ha reportado que éste padecimiento comprende 13% de todas las hospitalizaciones por enfermedad renal a nivel nacional en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).⁹ Otra encuesta nacional efectuada en éste mismo instituto reportó una prevalencia de 2.4 casos de urolitiasis/10 000 derechohabientes. En cuanto a la diferenciación de los sexos, la incidencia es mayor en hombres en quienes el riesgo es de 10-20%, en comparación con las mujeres cuyo riesgo es de aproximadamente 3-6%.^{8,10} Los cálculos renales suelen acontecer entre las edades de 20-40 años en varones, mientras que en las mujeres también hay un pico de incidencia entre los 40 y 60, la litiasis urológica en mujeres suele localizarse con más frecuencia en el riñón mientras que en el varón en el uréter. El riesgo de recidiva en personas con formación de cálculos renales previos puede llegar a ser tan alta como un 50%.⁸ La frecuencia de la litiasis renal, ha dado lugar a un gran costo social por las complicaciones que puede crear el proceso así como el costo económico que

generan el diagnóstico y tratamiento para el sector de salud público así como de manera personal para el paciente que lo padece.

La formación de los cálculos renales surge del rompimiento de un equilibrio que es delicado, en el que se debe mantener la solubilidad y evitar la precipitación de las sales,¹¹ es decir se forman de la precipitación (cristalización de partículas disueltas previamente) de determinados compuestos presentes en la orina.¹² Según la mayor parte de los autores, la formación de los cálculos urinarios se basa, en ciertas anomalías anatómicas y en alteraciones fisicoquímicas¹³ como deficiencia de algunas glicoproteínas como la proteína de Tamm-Horsfall (THP),^{14,15,16} que puede actuar aislada o conjuntamente, y finalmente termina con la producción del núcleo o matriz que dará inicio a la formación del cálculo renal, después continúa la agregación de cristales de mayor tamaño alrededor del núcleo o matriz, que, merced a su tamaño, se fijaría en el trayecto de la vía excretora. A partir de allí comenzaría un progresivo crecimiento hasta alcanzar el tamaño definitivo del cálculo.

El mayor factor de riesgo para la formación de cálculos renales es la deshidratación, otros factores que se pueden mencionar son la ingesta de agua, la dieta, obesidad, diabetes, entre otros.¹⁷ También tenemos otros tipos de factores como son:¹

- 1) Factores fisicoquímicos: la nefrolitiasis inicia con la sobresaturación de la orina. La saturación es el punto en el que los cristales en solución están en equilibrio con la sal de esos cristales en solución. Un aumento en la excreción urinaria de iones en combinación con un volumen urinario bajo favorece la formación y crecimiento de cálculos renales. La presencia de inhibidores y promotores de la cristalización juegan un papel preventivo importante.
- 2) Factores genéticos: entre el 35 y 65% de las personas que forman cálculos renales tienen un familiar con nefrolitiasis, el cual tiene un riesgo de dos a dieciséis veces mayor que una persona sin historial familiar.

- 3) Factores metabólicos: muchos pacientes con cálculos de calcio tienen hipercalcemia, un factor metabólico crucial en la nefrolitiasis. Dos hormonas regulan la concentración de calcio sérico, la proteína de Tamm-Horsfall (THP) y vitamina D, por lo tanto su alteración metabólica influye en la formación de los cálculos renales.

- 4) Factores sobre la dieta:^{1,4} recientes estudios epidemiológicos apoyan el papel benéfico de la cantidad de calcio que se recomienda consumir en la dieta.¹⁸ La evidencia sugiere que la dieta con calcio inhibe la absorción de oxalato en el intestino reduciendo su excreción en la orina.¹ Dietas altas en proteínas y bajas en carbohidratos aumenta la acidez en el riñón y esto aumenta el riesgo de formar cálculos renales, ya que se rompe el equilibrio de calcio y aumenta la pérdida de calcio óseo.

Un modelo es definido como una imitación, una copia o réplica de algo que ya existe.² En la actualidad se puede estudiar el proceso de formación de cálculos renales usando modelos de inducción de nefrolitiasis en ratas, así como la influencia que puedan tener algunas sustancias activas sobre los cálculos en formación o ya formados. Los modelos¹⁹ son estudiados porque en ellos se pueden dividir procesos complejos en segmentos individuales y estudiar estos segmentos por separado o bien en conjunto. Los modelos buenos no son complicados, permiten exámenes críticos de diferentes hipótesis y pueden ser usados para dar valor a la terapia propuesta.

Para realizar la inducción de la nefrolitiasis se puede manipular el pH de la orina, o la cantidad de sustancias que puedan cristalizar, también se puede manipular la excreción de proteínas que inhiben la cristalización; éstos son los mecanismos más utilizados para inducir cristaluria y la formación de cálculos renales.² Los cálculos renales son producidos en las ratas por la inducción de hiperoxaluria crónica o aguda,²⁰ usando una variedad de agentes litógenos como son oxalato de sodio, oxalato de amonio, hidroxil-prolina, etilenglicol y ácido glicólico.² En los últimos años también se han utilizado glicolato y glioxilato,²¹ por mencionar algunos para realizar

la inducción. Estos agentes pueden ser usados en asociación con vitamina D₃, dieta deficiente de magnesio y, en ocasiones, con un protocolo de reducción de pH administrando cloruro de amonio. Su administración puede ser vía oral, mediante una sonda gástrica o inyección intraperitoneal.

Los modelos animales han jugado un papel muy importante en investigaciones básicas, clínicas y etiológicas de la nefrolitiasis.²²

Con la implementación de éste modelo animal de nefrolitiasis se puede estudiar la patogénesis de dicha enfermedad, de igual forma se puede realizar investigación para el diseño de nuevos medicamentos que ayuden a la inhibición de la formación, crecimiento y aglomeración de los cálculos, y el punto más importante es que se pueden realizar estudios sobre la herbolaria regional sonoreense en busca de sustancias activas que ayuden ya sea en la profilaxis o tratamiento de esta enfermedad. Por lo tanto es muy conveniente tener un estable y simple modelo animal de nefrolitiasis debido a que Sonora es un estado que cumple con varios de los principales factores de riesgo para el desarrollo de esta enfermedad.

Desde el punto de vista científico establecer nuevos modelos en rata y ratón sobre nefrolitiasis abriría nuevos campos de investigación para la comunidad científica local en los mecanismos del desarrollo de esta enfermedad; es decir, estandarizar nuevos modelos para la investigación de enfermedades siempre es importante para el ambiente social, dada sus repercusiones en el desarrollo de nuevos medicamentos e información que ayuden a mejorar la calidad de vida de las personas que padecen dicha enfermedad.

ANTECEDENTES

Nefrolitiasis

La litiasis renal, también denominada urolitiasis o nefrolitiasis es una afección frecuente que se define como la presencia de cálculos, litos o piedras (estructuras cristalinas con matriz mucoproteica) que se forman en las papilas renales, crecen por aposición y pueden quedar fijos en ese lugar, aunque lo habitual es que se desprendan y migren a través de los pasajes urinarios,²³ cuando esto ocurre y su calibre es menor de 6 mm en uno de sus diámetros, pueden migrar por el uréter y dar lugar al cólico renal.

La formación de cálculos renales es un proceso complejo y el resultado de una cascada de eventos o mecanismos tales como la saturación salina de la orina y la poca eficacia de los inhibidores de la cristalización, también incluyen la formación del núcleo del cálculo renal (nucleación), que favorece la aposición de los cristales alrededor de éste hasta alcanzar su tamaño definitivo, además de la fijación y retención de cristales dentro de los túbulos renales.² La escasa ingestión de líquidos con reducción del volumen urinario, favorece la aparición de cálculos.

Éste es un padecimiento renal y de las vías urinarias que mayormente ataca a varones, sin ser exclusivo de éstos, y es de gran incidencia social entre la población adulta, siendo ésta, una de las enfermedades que lleva a severas consecuencias, que resultan en un costo económico tanto para el sector de salud público como para quienes padecen esta enfermedad, siendo la población menos beneficiada la más vulnerable ya que generalmente no pueden cubrir los costos que se generan,²⁴ llevándolos a consecuencias mayores.

Modelo Animal de Nefrolitiasis y Algunos Estudios

Un gran número de modelos de nefrolitiasis han sido desarrollados en un esfuerzo de entender los mecanismos que envuelven a los procesos de formación de cálculos renales.²

Algunos modelos de nefrolitiasis sirven para estudiar un solo aspecto del proceso, como estudios que usan solamente algunos tipos de cristalizadores que tienen que ver con la nucleación del cristal y el crecimiento del cálculo renal. Los estudios de cultivos de tejidos se usan actualmente para estudiar solamente la interacción entre el calcio, oxalato o los cristales de oxalato de calcio y las células epiteliales renales. Modelos computacionales (teóricos) evalúan el potencial de cristalización de la orina y soluciones similares. Modelos animales, por otro lado, son empleados para entender todo sobre la patogénesis, incluyendo el rol anatómico y fisiológico de los riñones y los túbulos renales así como muchos otros factores.²

Otro ejemplo son los estudios donde se evalúa el efecto en la ingesta de suplementos de calcio durante las comidas o antes de irse a la cama, la excreción urinaria de calcio fue significativamente elevada. La excreción urinaria de oxalato, se redujo significativamente, cuando el suplemento de calcio se tomó junto con las comidas solamente,¹ en otros estudios, se sospechó de la participación de la proteína de Tamm Horsfall (THP) en la formación de los cálculos renales y se ha descubierto que esta proteína tiene una actividad dual en el proceso, pues a pH alto y baja fuerza iónica, la THP es un fuerte inhibidor de la agregación de cristales, pero a pH bajo y alta fuerza iónica se convierte en un promotor.¹⁶ En sujetos normales mantiene su actividad inhibitoria.²⁵

Muchos modelos experimentales animales basados en la infusión de oxalato o la alimentación con una dieta deficiente en piridoxina, y la administración de precursores del oxalato como etilenglicol, hidroxiprolina, ácido glicólico y ácido

glioxílico por mencionar algunos, se han desarrollado para el estudio de los mecanismos de la nefrolitiasis.²⁶

Los animales más utilizados para la inducción de nefrolitiasis son las ratas, primordialmente ratas Wistar y Sprague Dawley, aunque también se usan en algunos estudios perros y conejos. En estudios recientes se ha tratado de inducir cálculos renales en ratones C57BL/6 mediante la administración intra-abdominal de glioxilato con éxito.²¹ También se pueden inducir cálculos renales utilizando ratones genéticamente modificados o ratones "knockout".²⁷

Okamoto y col. desarrollaron un modelo mediante la administración en la dieta de precursores de ácidos como el cloruro de amonio en ratas tratadas con vitamina D₃²⁸ obteniendo resultados positivos y formación de cálculos renales de fosfato de calcio.

Uno de los modelos experimentales de inducción de nefrolitiasis mayormente utilizado es mediante la administración de etilenglicol^{29,30} vía oral en ratas, esto debido a su sencillez, ya que el etilenglicol es fácil de administrar pues su sabor es dulce y es bien aceptado por los animales en el agua que beben diariamente y se obtiene una producción moderada pero constante de oxalato y en un tiempo corto (3 semanas) se obtienen cálculos renales.³¹

Se han realizado estudios donde se administran diferentes concentraciones de etilenglicol acompañado o no de cloruro de amonio para estudiar hiperoxaluria, cristaluria y la fijación de cristales a las células epiteliales renales en ratas con mínimo daño renal.³²

Modelo Animal de Nefrolitiasis en Ratas Wistar

En ratas Wistar se ha realizado la inducción de nefrolitiasis de diversas maneras para un sin fin de estudios. F. Grases³³ realizó la inducción de cálculos mediante la administración vía oral de etilenglicol y cloruro de amonio suplementando el agua

que beben las ratas con estos compuestos, para estudiar el efecto del ácido fítico en la formación de los cálculos, encontrando que tiene consecuencias que contrarrestan su formación en ratas, más sin embargo éste tratamiento no puede ser usado en humanos. También concluyó que el zinc no tiene efectos considerables sobre éste proceso. O. Miyake¹⁶ generó cálculos renales administrando etilenglicol y vitamina D₃ para examinar la expresión de la THP una glicoproteína urinaria, la cual tiene la función de inhibir la formación de cálculos renales y que podría tener un rol secundario en la formación de los cálculos como un adhesivo. Además concluyeron que la expresión de la THP se debe al daño renal y no a la formación de cristales. F. Atmani,³¹ evaluó el potencial profiláctico que tiene el extracto de una planta llamada *Herniaria hirsuta* en la formación de las piedras de oxalato de calcio mediante la inducción experimental de nefrolitiasis en ratas, obteniendo grandes resultados, también se han evaluado extractos de otras plantas,^{34,35,36} obteniendo una gran diversidad de resultados. También se han hecho estudios para evaluar sustancias para el tratamiento de los cálculos renales.^{37,38} En 2007 J. Liu,²² realizó un estudio comparativo de varios modelos experimentales de formación de cálculos de oxalato de calcio en ratas utilizando lo que el llamó “drogas que inducen la cristalización” (CID) que incluían, etilenglicol, cloruro de amonio, vitamina D₃, gluconato de calcio, oxalato de amonio, gentamicina y l-hidroxiprolina, llegando a la conclusión de que, la administración conjunta de etilenglicol y vitamina D₃ produce grandes cantidades de cristales de oxalato de calcio en el epitelio renal y que la administración de etilenglicol y cloruro de amonio tiene un efecto similar y que son la mejor manera de inducir piedras de oxalato de calcio.

Modelo Animal de Nefrolitiasis en Ratas Sprague Dawley

Para el tipo de rata Sprague Dawley la inducción no es muy diferente al igual que los estudios. Khan y col.³⁰ indujeron cálculos renales administrando solamente etilenglicol aunque por un periodo más largo, para evaluar la expresión y la excreción urinaria de otra glicoproteína urinaria llamada osteopontina la cual es componente de la matriz de los cálculos renales y un fuerte inhibidor de la nucleación y agregación de los cristales de calcio, concluyendo que incrementa la

producción de osteopontina como respuesta a la exposición de oxalato y cristales de oxalato de calcio en las células renales y que puede tener un rol significativo en la nefrolitiasis de oxalato de calcio. Chang y col.²⁶ han propuesto un modelo animal de urolitiasis de oxalato de calcio basado en un inhibidor de la ciclooxigenasa 2 llamado celecoxib, concluyendo que es un modelo que se puede usar para la formación de cálculos. Khan²⁹ utilizó hidroxil-prolina para inducir hiperoxaluria y así generar cálculos en ratas. Otros, han utilizado melanina y ácido cianúrico³⁹ lo cual generó cálculos, pero la difracción de rayos X determinó que estos cálculos eran de nitrógeno y no de calcio. Yamagushi y col.³² realizaron un experimento en el que administraban una concentración de cloruro de amonio estable y variaban la concentración de etilenglicol y en donde administraban etilenglicol solamente obteniendo diferente daño renal de acuerdo a la concentración administrada de los agentes litógenos y proponiendo a éste modelo como uno que sirve para estudiar a la nefrolitiasis en diferentes fases de la enfermedad.

Modelo Animal de Nefrolitiasis en Ratón

En el ratón es un poco más difícil inducir la formación de cálculos de oxalato de calcio, debido a que los valores de la THP son más elevados.² Se ha desarrollado un ratón genéticamente alterado, el cual tiene deficiencia de adenina fosforribosiltransferasa, pero sin producir cálculos de calcio, la difracción de rayos X confirmó que estaban compuestos de $C_5H_6N_5O_2$ [6-amino-2,8(3,9)-purina dion].²⁵ Mo y col.¹⁴ usaron ratones normales y ratones "knockout" con deficiencia de THP (lo que genera una producción espontánea de cristales de calcio) para examinar el rol de defensa de esta glicoproteína en la formación de cálculos renales, y concluyó que la THP es un factor muy importante de defensa y que su deficiencia es un factor que contribuye a la formación de los cálculos urinarios en humanos. Okada y col.²¹ realizaron una formación exitosa de depósitos de cristales de oxalato de calcio utilizando ratones machos C57BL/6 y administrándoles vía intraabdominal glioxilato y proponiendo a éste como un buen modelo para generar nefrolitiasis en ratones normales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Bioensayo

Sujetos de Experimentación

Para realizar el proceso de inducción de la nefrolitiasis se utilizaron ratas Wistar (figura 1) machos de 8 a 9 semanas de edad y un peso promedio de 180 g para cada grupo, seleccionadas de una misma camada, obtenidas del bioterio del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA), quien proporcionó las ratas Wistar para su reproducción y obtención de los sujetos de experimentación. Las ratas se criaron y cuidaron desde su nacimiento hasta la edad correspondiente para el inicio de la inducción de la nefrolitiasis. Durante el periodo experimental los animales se alojaron en una unidad compuesta de jaulas individuales montadas en un “raks” con un cupo de 60 animales, los cuales se mantuvieron en una habitación con un ambiente controlado entre 22 – 24 °C y una humedad de 60 a 70 % de manera constante, con dos periodos de 12 horas cada uno de luz y oscuridad y constante recirculación del aire, agua y alimento se proporcionó *ad libitum*.



Figura 1.- Rata Wistar. Utilizadas para la inducción de la nefrolitiasis.

Formación de Grupos de Experimentación

Se formaron tres grupos de experimentación de seis sujetos cada uno, el grupo control (sujetos 1-6) y grupos Inducido 1 (sujetos 7-12) e Inducido 2 (sujetos 13-18), cada sujeto fue colocado en una jaula individual montadas en un "raks". Los tres grupos de experimentación fueron alimentados con alimento comercial para mantenimiento (alimento balanceado de Harlan TG para roedor con 18 % de proteína). A los grupos Inducido 1 y 2 se les administró etilenglicol y cloruro de amonio (litógenos), vía oral, en el agua que bebieron diariamente y al grupo control se le dio agua normal.

Inducción Experimental de Nefrolitiasis Vía Administración Oral de Etilenglicol y Cloruro de Amonio

Para la inducción de la nefrolitiasis se administró como agua de beber a los grupos Inducido 1 y 2 una solución de etilenglicol al 0.75 % y cloruro de amonio al 1 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA) durante tres días y posteriormente se administró solamente etilenglicol al 0.75 % por 21 días más. Al grupo control se le administró solamente agua y alimento. En esta parte del bioensayo se midió el consumo de alimento, agua ingerida y volumen urinario, así mismo, fue necesario utilizar cajas metabólicas (figura 2) para la toma de la muestra de orina de 24 horas, a la cual se le practicó el análisis químico con tira reactiva y prueba de sedimento urinario. Al finalizar la inducción se sacrificó a las ratas en experimentación y se les extrajeron los riñones para su preparación para la prueba histopatológica.

Obtención de Orina de 24 horas

Para la recolección de orina se introdujeron individualmente a las ratas 1 y 3 del grupo control, 7, 9 y 10 del grupo Inducido 1 y a las 13, 14 y 15 del grupo Inducido 2,

en cajas metabólicas durante 24 horas antes de iniciar la administración de los litógenos y los días 4, 7, 14 y 21 ya iniciada la inducción, dichas cajas están diseñadas para colocar de manera individual a los animales de experimentación y permite recolectar las excretas de los animales de experimentación por separado aprovechando el deslizamiento de la orina a través de las paredes de un embudo.

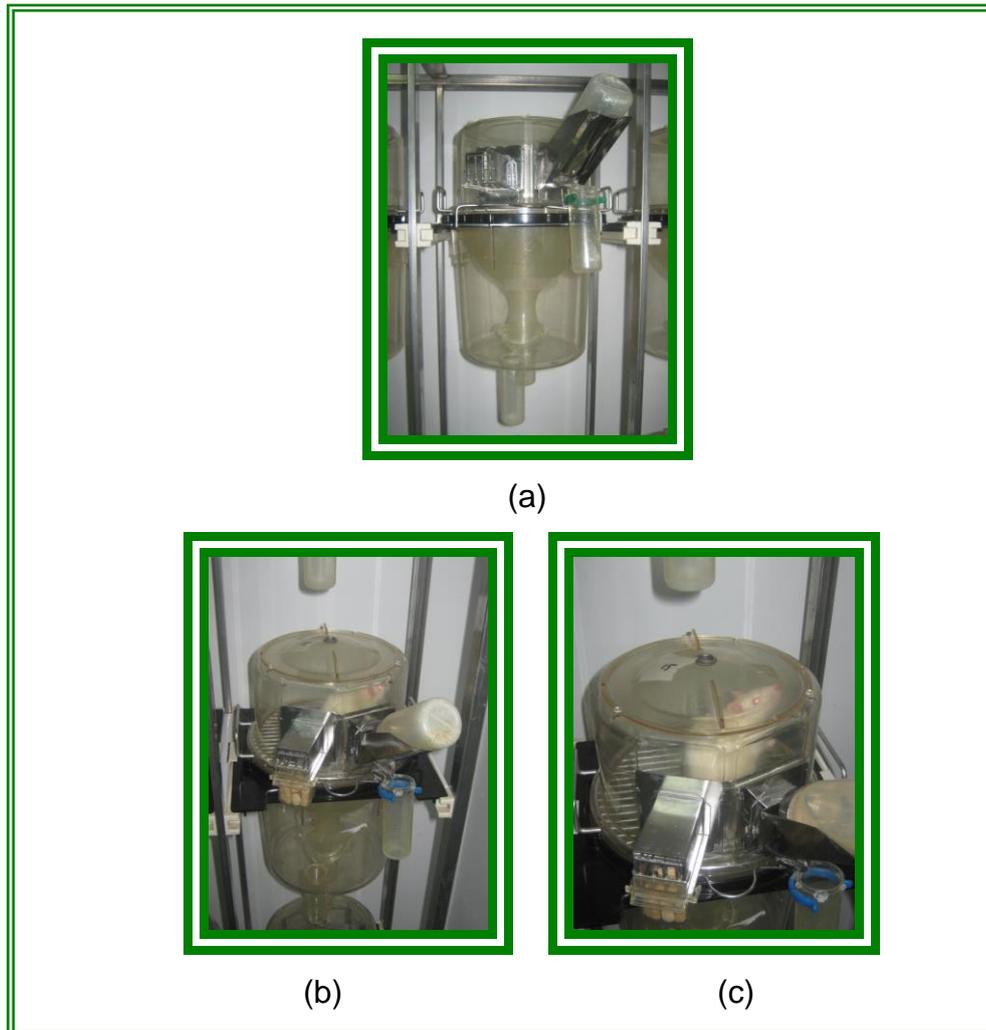


Figura 2.- Caja metabólica utilizada para la recolección de orina de 24 horas. Tanto de ratas control como inducidas antes de iniciar el proceso de inducción y los días 4, 7, 14 y 21 ya iniciada la inducción. (a) Caja metabólica completa, (b) y (c) caja metabólica con rata de experimentación dentro.

Análisis Químico de Orina con Tira Reactiva.

Para realizar esta prueba se utilizaron tiras reactivas para urianalisis de la marca Mission™ fabricada por ACON Laboratories, Inc. La tira evalúa 10 parámetros como son: leucocitos, nitritos, urobilinógeno, proteínas, pH, eritrocitos, densidad, cuerpos cetónicos, bilirrubina y glucosa.

Se tomó la muestra de orina de 24 horas y se sumergió en ella la tira reactiva completamente por un instante, al remover la tira de la orina se corrió el filo de la tira contra el borde del recipiente de ésta para desechar el exceso de orina. Se compararon las áreas reactivas con la correspondiente tabla de colores control para cada caso en el tiempo especificado.

Examen Microscópico de Sedimento Urinario

Para la obtención de sedimento urinario se utilizó una centrifuga (Heraeus Multifuge X3R Centrifuge, Thermo Fisher Scientific, 2009) y se centrifugó la alícuota tomada (10 mL, de la orina recolectada durante 24 horas) y se pasó a un tubo de ensayo, a 2000g durante 8 minutos. Se descartó el sobrenadante por decantación, dejando aproximadamente 1mL para resuspender el sedimento, se tomó una gota de sedimento resuspendido y se colocó entre un portaobjetos y un cubreobjetos. Finalmente se observó en un microscopio óptico con objetivo de 10x, 40x y 60x para la búsqueda de cristales de oxalato de calcio.

Análisis Histopatológico

La técnica histopatológica se realizó en colaboración con el laboratorio de patología a cargo de la Dra. Adela Rascón Alcántar médico patólogo, y bajo la observación y capacitación del T.H. Francisco Fernando Pacheco Ruiz, ubicado en el Hospital

Infantil del Estado de Sonora (HIES), de la ciudad de Hermosillo Sonora, México. Dicho análisis histopatológico se basa en una serie de procedimientos aplicados a un material biológico para su preparación y observación a través del microscopio. De manera general, para lograr esto se siguieron varias etapas:

- 1) Toma de la muestra.
 - a) Fijación.
 - b) Inclusión.
 - c) Microtomía.
- 2) Coloración o tinción.
 - a) Montaje.

Para realizar la prueba histopatológica fue necesario el sacrificio de las ratas en estudio para la extracción de los riñones.

Toma de la Muestra

Para la obtención de la muestra se realizó una disección a las ratas, se localizaron los riñones y se extrajeron. Inmediatamente después de la extracción se sumergieron en recipientes individuales con formol "buffer", rotulándose como riñón derecho o izquierdo según fuera el caso y el número de sujeto al que pertenecían los órganos.

Fijación

Es un procedimiento cuya finalidad, al aplicarlo es detener la vida de las células e impedir las modificaciones *post mortem* que pueda sufrir la célula, manteniendo la estructura morfológica de células y tejidos sin que ocurran cambios notables en ellos esto mediante agentes químicos denominados fijadores. En éste caso para fijar los riñones extraídos de las ratas, se colocaron las muestras biológicas en celdas de

plástico llamadas unicaset (figura 3) y se sumergieron en formol “buffer” con un pH entre 6.8 a 7.



Figura 3.- Unicaset. Utilizado para la contención de las muestras biológicas (riñones) en formol durante la etapa de fijación en la preparación de los cortes histológicos.

Inclusión

Los tejidos fijados adquieren consistencia y dureza, pero no la suficiente como para de ellos obtener cortes delgados de unas micras, así que después de ser fijados pasan por el proceso de inclusión que es la formación de un bloque de parafina con el material biológico contenido dentro de éste. Hay diferentes sustancias que pueden ser utilizados para dar soporte y dureza al material biológico que en este caso se utilizó parafina. Para este paso primeramente se deshidrató el material biológico ya que se encontraba embebido en agua o alcohol y así resulta imposible que la parafina penetre en el tejido. Para realizar la deshidratación se utilizó un deshidratador automático (Shandon Citadel 2000, Thermo Scientific figura 4) con 12 recipientes, que contienen alcoholes como a continuación se describe: alcohol 60°, alcohol 70°, alcohol 80°, alcohol 96°, alcohol 96°, alcohol absoluto, alcohol absoluto,

alcohol absoluto-xilol, xilol, xilol, xilol-parafina y parafina. Éste procedimiento tiene una duración de 12 horas.

Una vez deshidratadas las muestras se incluyeron en parafina, para esto se utilizó un embebedor de parafina (Shandon Histocentre 3, Thermo Electron Corporation figura 5), se colocó la muestra dentro de un molde, bien orientada para facilitar la obtención de los cortes y observar de manera adecuada el área a explorar. El molde se llenó de parafina caliente pura a 60°C y se enfrió de inmediato para que el bloque se formara de manera homogénea y obtuviera la dureza necesaria para poder realizar los cortes en el microtomo.



Figura 4.- Deshidratador. Utilizado en el proceso de inclusión de las muestras biológicas durante la preparación de los cortes histológicos.



Figura 5.- Centro de inclusión con parafina. Utilizado para la realización de los bloques de parafina con las muestras biológicas.

Microtomía

Para la obtención de los cortes histológicos se utilizó un microtomo semiautomático (Leica RM 2145 figura 6). Cuando el bloque de parafina no fue lo suficientemente rígido para la obtención de buenos cortes, se refrigeró por unos minutos (10 minutos) para asegurar que los cortes fueran de buena calidad (delgado y transparente). La muestra se montó en el microtomo, se ajustó el tamaño de corte de 4 a 5 μm y se realizó el corte, el cual se colocó en un baño María (Tissue Float Bath, Lab Line, figura 7) conteniendo grenetina en donde se extendió el corte histológico realizado y al que la grenetina adhirió al portaobjetos en donde fue colocada la muestra. Se introdujo en un horno (Mettler 854 Schwabach, figura 8) a 50°C aproximadamente hasta que la parafina se evaporó, lo que se llama desparafinar la muestra. Después se continuó con la tinción.



Figura 6.- Microtomo semiautomático. Utilizado para la realización de los cortes histológicos.



Figura 7.- Baño María. Utilizado para la extensión y adhesión de la muestra biológica durante la preparación de los cortes histológicos.



Figura 8.- Horno. Utilizado para la desparafinización de la muestra biológica durante la preparación de los cortes histológicos.

Tinción

Se procedió a la tinción con tres diferentes técnicas para el diagnóstico y observación de los cálculos renales:

- 1) Tinción hematoxilina-eosina (HE).⁴⁰
- 2) Tinción o técnica de Pizzolato.⁴¹
- 3) Tinción de Masson.⁴⁰

Para realizar la tinción primeramente se hidrató la muestra, exponiéndola de nuevo en alcoholes como se describe a continuación: se tomó la muestra y se sumergió en los siguientes alcoholes: xilol, xilol, xilol-alcohol absoluto, alcohol

absoluto, alcohol absoluto, alcohol 96°, alcohol 96°, lo que rehidrató la muestra y posteriormente se realizó la tinción (figura 9).

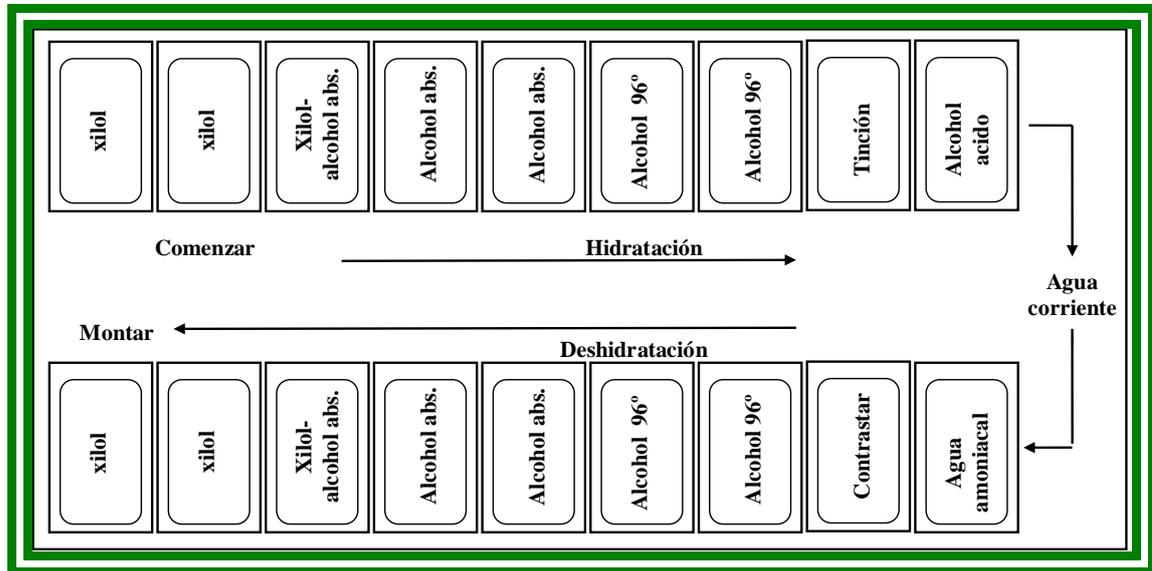


Figura 9.- Esquema general del proceso de rehidratación, tinción y deshidratación de los cortes histológicos.

Tinción hematoxilina-eosina

Se utilizó el método de Harris (ver anexo 1). Primero se desparafinaron las láminas pues la parafina no permite de manera adecuada la penetración del colorante al tejido, posteriormente se hidrataron los cortes, como habitualmente se hace, se tiñó primeramente con hematoxilina de Harris un colorante básico que tiñe el núcleo celular, se lavó en agua corriente y se decoloró en alcohol ácido, se lavó brevemente en agua corriente y se colocaron las láminas en una solución débil de agua amoniacal, se lavó muy bien con agua corriente y se colocó en etanol, posteriormente se realizó una tinción de contraste con eosina, un colorante ácido que tiñe al citoplasma celular, se deshidrató el tejido y aclaró (ver figura 9). Se montó en resina sintética (preparación permanente) y finalmente se observó en un microscopio óptico.

Tinción de Pizzolato

Esta técnica permitió observar los depósitos de calcio en el tejido, de un color oscuro utilizando una mezcla de partes iguales de nitrato de plata y peróxido de hidrógeno. A los cortes ya desparafinados e hidratados, se cubrieron con una mezcla de peróxido de hidrógeno (Merck) el cual reacciona con el oxalato de calcio produciendo carbonato de calcio, y nitrato de plata (Merck) el cual reacciona con el carbonato de calcio en presencia de luz para formar depósitos oscuros, la mezcla fue hecha con partes iguales de cada compuesto (pH = 6), en los casos de producción de burbujas debido a la presencia de albúmina de huevo en el tejido, se removió la mezcla y se agregó mezcla fresca, al finalizar el tiempo indicado, se lavaron los cortes con agua destilada y se contrastó con safranina, después, se deshidrató la muestra de la manera usual, posteriormente se montó en resina sintética (preparación permanente), finalmente se observaron las muestras con un microscopio óptico.

Tinción Tricrómica de Masson

Esta técnica ayuda a observar fibrosis glomerular (anexo 1). La muestra se desparafinó e hidrató como habitualmente se hace y se trató con solución de Bouin durante toda la noche. Cuando las secciones fueron fijadas en solución de Bouin inicialmente se omitió éste paso, se lavó con agua corriente y después con agua destilada, se coloreó con la solución de hematoxilina de hierro de Weigert y posteriormente con agua corriente y se enjuagó con agua destilada, se coloreó con la solución de fucsina ácida-escarlata de Biebrich y se enjuagó con agua destilada. Después se diferenció con la solución de ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico y se contrastó con la solución de anilina, se enjuagó con agua destilada, después se diferenció con ácido acético, se deshidrató y aclaró con diferentes alcoholes. Se montó en resina sintética para finalmente observarse con un microscopio óptico.

RESULTADOS

Para realizar la inducción de nefrolitiasis se tomaron ratas Wistar y se les administró etilenglicol y cloruro de amonio. Durante el periodo de inducción, se evaluó la cantidad de líquido ingerido (ver anexo 2), cantidad de alimento ingerido (ver anexo 3), orina de 24 horas (ver anexo 4) a la cual se le practicó la prueba de tira reactiva y prueba de sedimento urinario para observación de cristales, además se extrajeron los riñones y se le practicó un examen histopatológico para el diagnóstico de nefrolitiasis. Los resultados fueron los siguientes:

Análisis Macroscópico

Una vez extraídos los riñones de las ratas de los grupos Inducido 1 y 2, se observó inflamación o deformación del riñón en todos los casos, de un color pálido o blanquecino (figura 10c) y en algunos casos gránulos de color blanco.

Los riñones extraídos de las ratas del grupo control se mostraron bien definidos sin inflamación o alteración visibles y de un color rojo intenso (figura 10b).

Volumen de Líquido Ingerido

Durante el proceso de inducción de la nefrolitiasis se logró monitorizar la ingesta diaria de líquido de cada rata en estudio, en promedio por grupo se observó que la tendencia del grupo control es más o menos estable y constante durante todo el proceso (ver figura 11), sin embargo para los grupos Inducidos 1 y 2, ambos tuvieron un comportamiento similar pero inestable en comparación con el grupo control, así se pudo observar que iniciaron con una ingesta similar de líquidos, disminuyendo ésta drásticamente durante los primeros 2 días, teniendo una recuperación al tercer día y cayendo de nuevo su ingesta durante el cuarto día, recuperándose para el

sexto día, manteniendo una tendencia más o menos constante hasta el final de la inducción. Así, fue posible determinar que los grupos Inducidos 1 y 2 terminaron ingiriendo una mayor cantidad de líquido que al inicio de la inducción y que las ratas del grupo control.



Figura 10.- Disección y extracción de los riñones de las ratas de los tres grupos de experimentación una vez terminado el periodo de inducción de nefrolitiasis (día 24). La imagen (a) muestra la disección y extracción de los riñones, la imagen (b) muestra riñones sanos y normales (grupo control), la imagen (c) muestra riñones después de ser tratados con etilenglicol y cloruro de amonio (grupos Inducido 1 y 2).

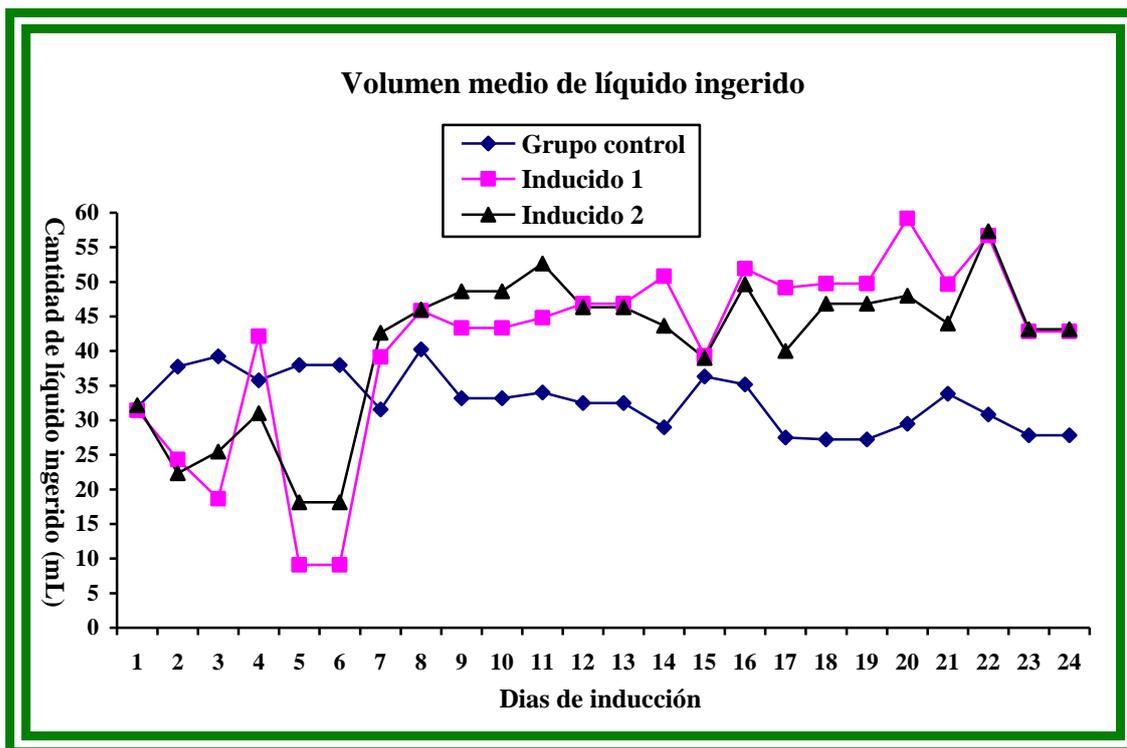


Figura 11.- Volumen medio de líquido ingerido diariamente por grupo de experimentación durante el periodo de inducción de 24 días.

Cantidad de Alimento Ingerido

También se dio seguimiento a la cantidad de comida ingerida. Esto se realizó en un total de 4 ensayos, con un periodo de 3 días cada uno. En el anexo 3 se puede ver las cantidades ingeridas de alimento promedio de estos ensayos realizados durante el periodo de inducción de nefrolitiasis. Así podemos observar en la figura 12 que el tratamiento si alteró el apetito de las ratas inducidas en estudio disminuyendo su ingesta de alimento, pero solamente durante el periodo de administración de cloruro de amonio, ya que una vez suspendido hubo una notable recuperación en el apetito de las ratas de los grupos Inducido 1 y 2 ya que la alimentación del grupo control fue más o menos constante durante el periodo de inducción a comparación de los grupos Inducidos 1 y 2 que comieron de menos a más, recuperando el apetito hasta normalizarse junto al grupo control.

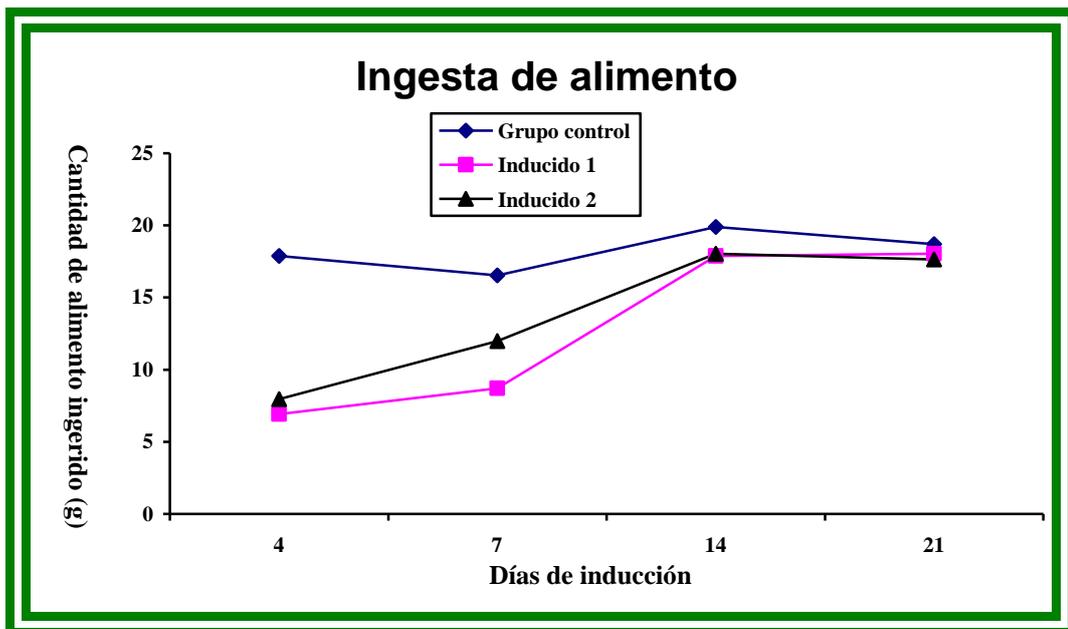


Figura 12.- Ingesta de alimento promedio por grupo de experimentación durante el periodo de inducción de nefrolitiasis de 24 días. El primer ensayo fue practicado los días 2, 3 y 4, el segundo ensayo fue practicado los días 7, 8 y 9, el tercer ensayo fue practicado los días 13, 14 y 15, y el cuarto ensayo fue practicado los días 19, 20 y 21, durante el periodo de inducción.

Volumen Urinario

El volumen urinario también fue monitorizado. Para medir el volumen urinario se utilizaron cajas metabólicas y se tomaron 5 muestras de 24 horas cada una, antes y durante el periodo de inducción. Los resultados se muestran en el anexo 4. En la figura 13 se observa una tendencia en aumento del volumen urinario durante el periodo de inducción, que va de acuerdo al volumen de líquido ingerido.

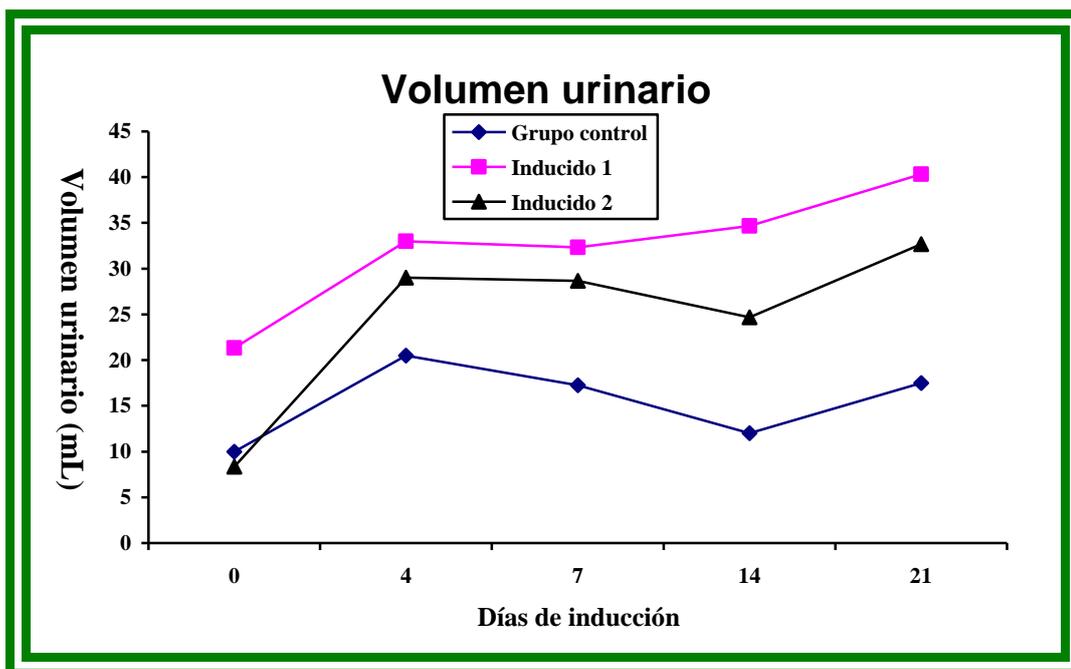


Figura 13.- Volumen urinario promedio por grupo de experimentación durante el periodo de inducción de nefrolitiasis de 24 días. La primer muestra fue recolectada antes de iniciar la administración de los litógenos (día 0), la segunda muestra fue recolectada durante el día 4, la tercer muestra fue recolectada durante el día 7, la cuarta muestra fue recolectada durante el día 14 y la quinta muestra fue recolectada durante el día 21, una vez iniciada la inducción.

Análisis Químico de Orina con Tira Reactiva

Como anteriormente se mencionó, se tomó muestra de orina de 24 horas sólo a 2 ratas del grupo control, 3 ratas del grupo Inducido 1 y 3 ratas del grupo Inducido 2, fueron 5 muestras las que se tomaron antes y durante el transcurso de la inducción. Los resultados del análisis químico de orina con tira reactiva se muestran en el anexo 5.

Los resultados de la prueba de tira reactiva, dan una idea sobre el funcionamiento renal de las ratas en experimentación y una idea de cómo va el proceso de inducción de la nefrolitiasis. Con esta prueba se pudo observar una disminución del pH, la presencia de proteinuria que se mantuvo desde un inicio y cómo es que después se presentó hematuria y cuerpos cetónicos al final de la inducción. Es decir que los resultados muestran, una afectación del sistema urinario pero sin precisar.

Examen Microscópico de Sedimento Urinario

Esta prueba fue realizada para buscar cristales de oxalato de calcio específicamente, en la orina. Se tomaron 5 muestras, antes y durante la inducción, tomándose en total 40 muestras. Las observaciones representativas por grupo de las diferentes muestras tomadas de las ratas en estudio se muestran en la figura 14, los resultados y observaciones de cada sujeto se pueden observar en el anexo 6.

La primer muestra fue tomada un día antes de iniciar la inducción (día 0), para poder constatar que las ratas de experimentación de éste estudio estaban sanas y que las muestras tomadas eran normales. Así pues las observaciones que se hicieron de esta muestra demostraron que así era, pues aunque se observaron abundantes bacterias en las muestras de todos los grupos, éstas no se asocian a infección, ya que el examen químico con tira reactiva nunca dio positivo para leucocitos ni se observaron estos al microscopio. Esta observación de abundantes bacterias es debida al tratamiento de la muestra y al tiempo de recolección de la orina.

La segunda muestra fue tomada durante el transcurso del día 4 de iniciada la inducción con etilenglicol y cloruro de amonio día en que se eliminó el uso del segundo.

Las muestras de las ratas del grupo control fueron normales, sin presencia de cristales de oxalato de calcio, ni de eritrocitos, ni leucocitos, aún cuando hubo abundantes bacterias presentes.

Sin embargo para las ratas de los grupos Inducidos 1 y 2 se logró observar una abundante cantidad de cristales de oxalato de calcio, comprobándose así la cristaluria esperada, aunque no hubo presencia de eritrocitos o leucocitos, ni de células epiteliales (figura 14)

La muestra 3 fue tomada durante el transcurso del día 7, ya iniciada la administración de etilenglicol solamente, durante este periodo.

Las muestras de las ratas control continuaron normales hasta este día, sin presencia de leucocitos o eritrocitos ni células epiteliales, así tampoco se observaron cristales de oxalato de calcio.

Sin embargo en las ratas de los grupos Inducidos 1 y 2, continuó la presencia de cristales de oxalato de calcio pero en menor cantidad, quizás debido a la suspensión del cloruro de amonio o a la retención de los cristales en los túbulos renales o en alguna parte del sistema urinario. También se observó la presencia de eritrocitos en algunos casos (ratas 10, 13, 14 y 15) lo que indicó que hubo algún tipo de daño renal o de vías urinarias debido a la administración de los agentes litógenos. También se observaron células o restos celulares epiteliales (figura 14).

La muestra 4 fue tomada durante el transcurso del día 14, una vez iniciada la administración de los litógenos, durante este periodo se continuó con la administración de etilenglicol solamente.

Las muestras de las ratas del grupo control siguieron normales, sin la presencia de eritrocitos o leucocitos ni células epiteliales, así como de cristales de oxalato de calcio. Las muestras de las ratas de los grupos Inducidos 1 y 2 continuaron con la presencia de cristales de oxalato de calcio, en algunos casos con menor intensidad, así también continuó la presencia de eritrocitos y células

epiteliales lo que indica que la presencia de cristales de oxalato de calcio está causando daño renal (figura 14).

La muestra 5, fue la última muestra que se tomó y fue durante el transcurso del día 21 de iniciada la administración de los litógenos. Durante éste periodo se administró solamente etilenglicol.

Las muestras de las ratas control continuaron normales hasta el día 21 sin la presencia de cristales de oxalato de calcio, no se observaron eritrocitos, leucocitos o células epiteliales.

Las muestras de las ratas de los grupos Inducido 1 y 2 mostraron la presencia de cristales de oxalato de calcio pero muy escasamente (menos de un cristal por campo) y de un tamaño muy pequeño en comparación con los cristales que se observaron en las muestras 2, 3 y 4, esto debido al daño renal provocado por el tratamiento, ya que los cristales se estuvieron reteniendo dentro de los túbulos renales, pudiendo salir solamente muy pocos o los más pequeños. También continuó la presencia de eritrocitos en casi todos los casos así como de células epiteliales debido al daño renal provocado por los agentes litógenos (figura 14).

El tratamiento combinado de etilenglicol con cloruro de amonio dio como resultado nefrolitiasis en todas las ratas al cabo de 3 semanas.³⁰

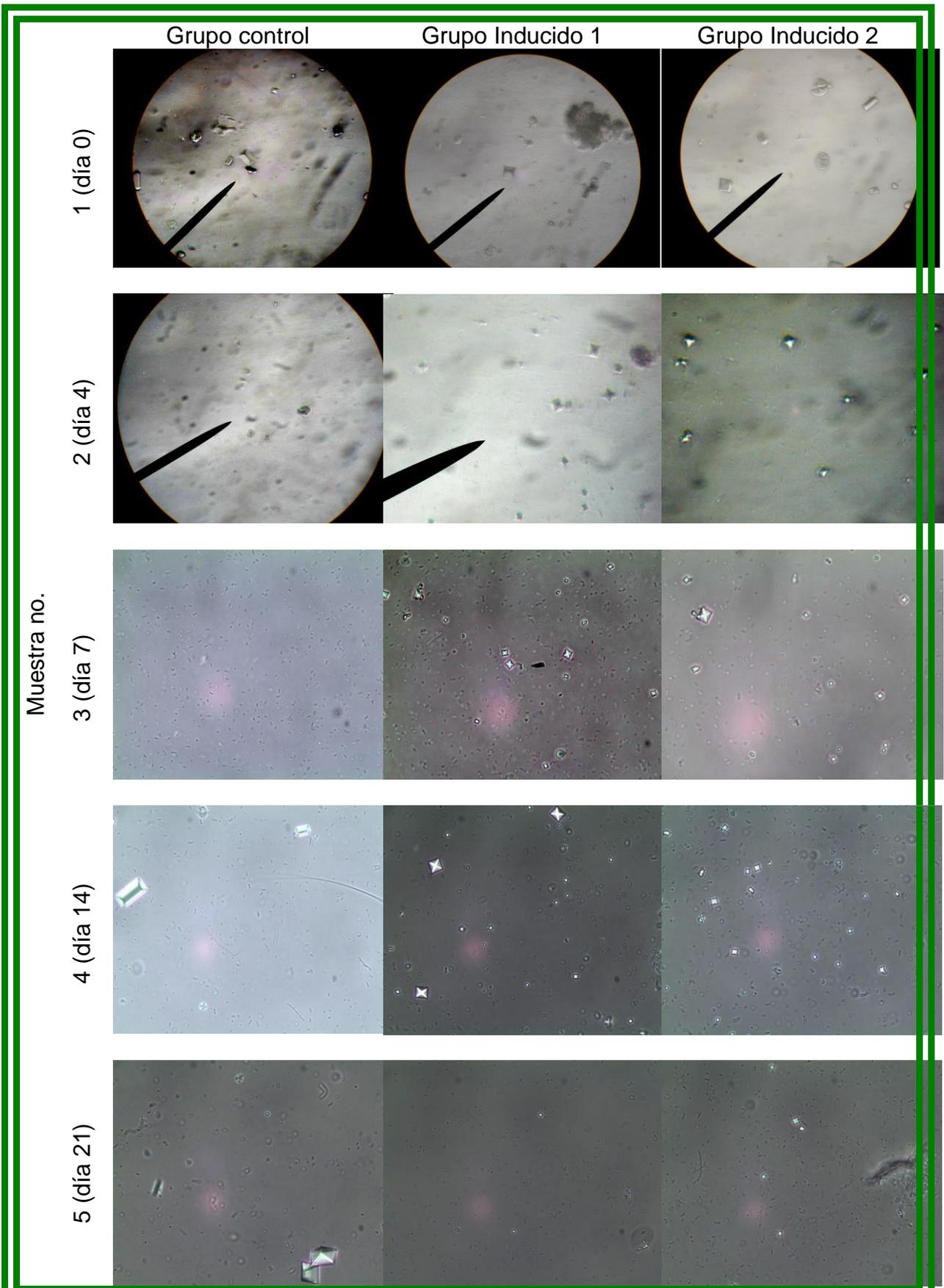


Figura 14. Resultado representativo por grupo del examen microscópico de sedimento urinario. Observaciones a 60 x.

Prueba Histopatológica

Esta prueba se realizó para el diagnóstico de nefrolitiasis, la observación de los cálculos renales o depósitos de calcio así como el daño renal generado por la administración de los agentes litógenos. Esta prueba se realizó solamente a las ratas 1 y 6 del grupo control, a todas las ratas del grupo Inducido 1 y a las ratas 13, 14 y 15 del grupo Inducido 2 ya que las ratas 16, 17 y 18 murieron durante la segunda semana de la inducción debido al daño generado por el tratamiento.

Se realizaron tres técnicas de tinción diferentes para el diagnóstico de la nefrolitiasis dos de ellas de rutina para el diagnóstico solicitados por la Dra. Adela Rascón Alcántar, médico patólogo responsable del laboratorio de patología del Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES); estas dos pruebas son la tinción de Hematoxilina Eosina de Harris (HE) y la tinción de Masson. Además se realizó una tercera tinción para la observación de los cálculos renales o depósitos de calcio que fue la tinción de Pizzolato, en la que se observaron los depósitos de calcio de un color oscuro o negro.

Los resultados y las observaciones representativas por grupo del examen histopatológico se puede ver en la figura 15. Las imágenes (a), (b) y (c) son de cortes histológicos de las ratas del grupo control es decir de sujetos sanos, que fueron tomados como controles negativos para valorar la inducción de la nefrolitiasis con etilenglicol y cloruro de amonio. Las imágenes de la (d) a la (i) son representativas de los grupos Inducido 1 y 2, sujetos en tratamiento con etilenglicol y cloruro de amonio para la inducción de nefrolitiasis.

Las imágenes (d), (e) y (f) muestran los cortes histológicos de las ratas del grupo Inducido 1. Como puede observarse en la imagen (d), tinción HE, hay áreas dilatadas (túbulos renales) ocupadas por material eosinófilo, con infiltrado linfocitario leve debido al daño ocasionado por el depósito de cristales de oxalato de calcio, y aunque esta tinción no es específica para observarlos se pueden ver. La imagen (e) correspondiente a la tinción de Masson, muestra que hay fibrosis glomerular focal o total.

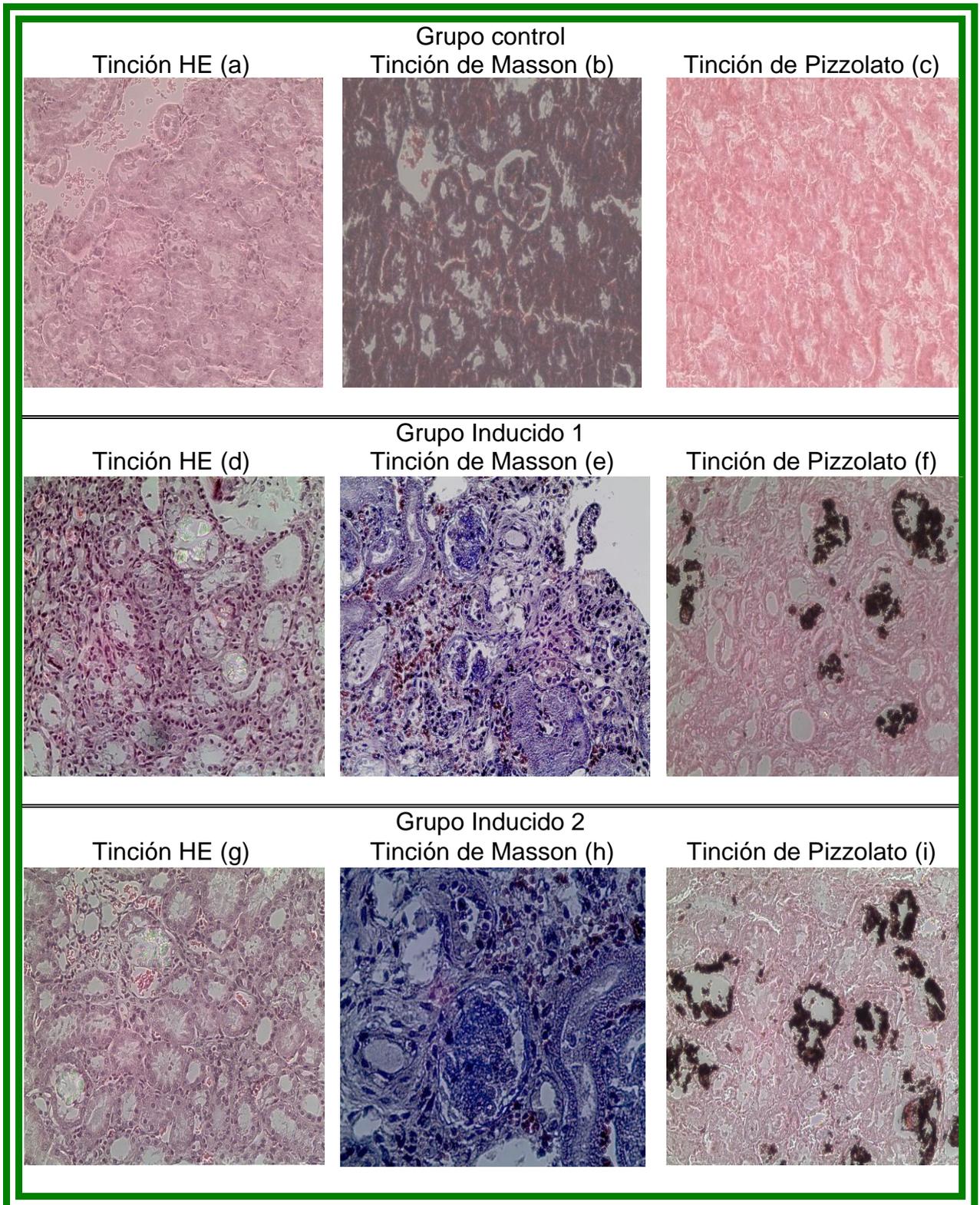


Figura 15. Resultados y observaciones representativas por grupo del examen histopatológico realizado al finalizar el periodo de inducción (día 24) a todas las ratas de experimentación. Resolución 60 x.

Además de las tinciones antes mencionadas, se realizó una tercera técnica, la tinción de Pizzolato observada en la imagen (f) en la que se muestra los depósitos de calcio intratubulares teñidos de un color oscuro, siendo ésta una tinción específica para la observación de cálculos de oxalato de calcio en tejido. En esta tinción se utiliza una mezcla de peróxido de hidrogeno (el cual reacciona con el oxalato de calcio produciendo carbonato de calcio) y nitrato de plata (el cual reacciona con el carbonato de calcio en presencia de luz para formar depósitos oscuros).⁴¹ Las observaciones de los cortes de cada sujeto en estudio se pueden observar en el anexo 7.

Las imágenes (g), (h) e (i), son representativas de los resultados y observaciones del grupo Inducido 2, como puede observarse se obtuvieron los mismos resultados que con el grupo Inducido 1.

Otros Resultados

Durante el proceso de inducción también se observó la caída de pelo de las ratas del grupo Inducido 1 y 2 de manera muy similar en ambos casos, así también se observó el deceso de tres ratas de experimentación del grupo Inducido 2 (ratas 16, 17 y 18) debido al tratamiento que se les administró.

DISCUSIÓN

El objetivo de éste trabajo fue el de implementar un modelo animal de nefrolitiasis mediante la administración vía oral de etilenglicol y cloruro de amonio, esto debido a que Sonora es un estado donde se cumple con los principales factores de riesgo como obesidad (en el año 2006, 73.2% de la población mayor de 20 años en Sonora presentaron sobrepeso u obesidad),²⁴ la diabetes, que sin control alguno pasa a ser otro factor de riesgo ya que causa daño en riñones,⁴² la deshidratación, que causa la concentración de sustancias en la orina que puedan precipitar,^{1,17,11} en combinación con un consumo bajo de agua aumenta el riesgo de formación de cálculos, así también, otro factor de riesgo es un alto consumo de proteínas, en el año de 1990 en el noroeste del país incluyendo a Sonora, se posicionaba en el onceavo lugar en el consumo de proteína animal en México, para el año 1997 la zona noroeste de México se posiciona ya como el mayor consumidor de proteínas.⁴³

De esta manera, ésta puede ser la pauta que marque el inicio de nuevos trabajos o investigaciones en la búsqueda de principios activos para esta problemática, así como en la corroboración de la efectividad de medicamentos ya existentes en el mercado, además de poder desmentir los mitos de ciertos remedios naturales utilizados en la región, o bien confirmar su efectividad.

De acuerdo con los resultados obtenidos es posible asegurar que la inducción de nefrolitiasis mediante la administración vía oral de etilenglicol y cloruro de amonio en ratas Wistar, es una forma muy viable para la implementación de un modelo animal debido a su sencillez, disponibilidad de los litógenos y vía de administración, así como los resultados obtenidos, siendo éste un modelo muy utilizado para el estudio de los mecanismos que envuelven los procesos en el desarrollo de la enfermedad^{14,30} (promotores, inhibidores, formación de la matriz mucoproteica,⁴⁴ retención de cristales) así como la evaluación de sustancias^{38,45} y extractos provenientes de la herbolaria regional y mundial.^{34,46}

En cuanto a la ingesta de alimento no hay reporte en la bibliografía revisada acerca del comportamiento de las ratas en tratamiento sobre la misma, sin embargo

se ha reportado que el peso corporal aumenta en ratas tratadas solo con etilenglicol y tiende a disminuir en ratas tratadas con etilenglicol y cloruro de amonio,³² sin indicar el porque de la disminución de peso en este ultimo caso. Este antecedente y los resultados obtenidos de la monitorización realizada de la ingesta de alimento en la implementación del modelo animal de nefrolitiasis, indica que el tratamiento de etilenglicol en conjunto con cloruro de amonio si tuvo algún efecto sobre la ingesta de alimento, ya que los resultados hacen ver una diferencia muy notoria entre los grupos en inducción y el grupo control negativo o no inducido en relación a esta variable, sin ser este un resultado indicativo de la formación de los cálculos renales.

Los resultados de la monitorización de líquido ingerido son comparables con los reportados por Atmani y col.³¹ Mientras que el grupo control tuvo una ingesta de líquido de manera constante, los grupos inducido 1 y 2 muestran al inicio del periodo de inducción un descenso en esta variable y una notable recuperación al cuarto día de tratamiento una vez suspendida la administración de cloruro de amonio, para finalizar el periodo de inducción (día 24) con una ingesta de liquido mayor a la del grupo control.

Además se monitorizó el volumen urinario. En la bibliografía revisada se reporta una tendencia en aumento de la excreción de orina de manera gradual a lo largo del periodo de inducción (14 días).³¹ En la implementación de este modelo se observó una tendencia constante en la excreción de orina para el grupo control a diferencia de los grupos inducido 1 y 2 en los cuales se observó un aumento en la excreción urinaria en ambos casos, en acorde con los reportes antes mencionados.

También se puede decir que en la monitorización del proceso de formación de los cálculos renales con el análisis químico de orina con tira reactiva, no es contundente para este caso, pero nos da una idea de si hay daño renal una vez iniciada la administración de los litógenos sin ser este de una fuente infecciosa.

Por otro lado con el examen microscópico de sedimento urinario se puede monitorizar la presencia de cristales en orina (cristaluria) un requisito indispensable en la formación de cálculos.² Más sin embargo, la presencia de cristales no asegura la formación de los cálculos.

La prueba histopatológica resulto ser una estrategia metodológica contundente y 100% confiable en la observación y diagnóstico de los cálculos renales.

En comparación con otros modelos como los de ratones genéticamente modificados,¹⁵ se puede decir que se obtienen resultados similares en cuanto a la observación y desarrollo de los depósitos de calcio en los riñones, más sin embargo en este modelo implementado no se pueden estudiar factores genéticos.

En cuanto a los modelos que utilizan o administran diferentes litógenos al etilenglicol y cloruro de amonio se pueden obtener resultados diferentes como la obtención de cálculos compuestos por fosfato de calcio,²⁷ e inclusive se pueden obtener los mismos resultados pero con diferencias en el tiempo de formación de los cálculos, sencillez en la administración de los litógenos y cantidad de cálculos formados.²²

En comparación con los modelos en ratón no genéticamente modificado aquí se obtuvieron resultados muy parecidos, aunque hay reportes de que los cálculos formados en los ratones disminuyen o desaparecen después de cierto tiempo.^{21,47}

CONCLUSIONES

- 1) En conclusión y en base a los resultados aquí mostrados puede afirmarse que la administración vía oral de etilenglicol al 0.75% y cloruro de amonio al 1% durante tres días (días 1, 2 y 3) y la posterior administración solamente de etilenglicol al 0.75% por tres semanas más (días 4 a 24) en ratas Wistar produce nefrolitiasis en todas las ratas Inducidos al finalizar el periodo de inducción.
- 2) La administración de etilenglicol y cloruro de amonio vía oral a ratas Wistar en el agua que beben diariamente, es la forma más sencilla de administrar los litógenos, sin causar un elevado nivel de estrés en las ratas en estudio.
- 3) El análisis químico de orina con tira reactiva no es una prueba suficientemente confiable en la monitorización de la formación de los cálculos renales, más sin embargo sirve como un indicativo de daño en algún sitio del sistema urinario una vez iniciada la administración de los litógenos.
- 4) El examen microscópico de sedimento urinario no es una prueba contundente en la monitorización de la formación de los cálculos renales, pero si puede determinar la presencia de cristales en orina, un requisito muy importante en éste modelo experimental de nefrolitiasis.
- 5) La prueba histopatológica de los riñones de las ratas de experimentación es la más eficiente y confiable en la observación de depósitos de calcio y en el diagnóstico de litiasis renal.

RECOMENDACIONES

Una vez determinado o implementado el modelo animal de nefrolitiasis se recomienda:

1. Realizar exámenes más detallados para la monitorización del proceso de inducción como por ejemplo, determinación de creatinina, oxalato, calcio, etc.
2. El estudio de nuevas sustancias o sustancias ya conocidas para el tratamiento de la nefrolitiasis
3. Aún más importante, se recomienda el estudio de la herbolaria regional sonoreense en busca de sustancias activas que puedan ayudar en la prevención o tratamiento de esta enfermedad.
4. Realizar estudios más detallados sobre la implementación de un modelo de nefrolitiasis en ratón, por la facilidad de manipulación.

BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Brener ZZ, Winchester JF, Bergman M. 2011. Calcium nephrolithiasis. *Clinic Rev Bone Miner Metab.* DOI 10.1007/s12018-011-9103-9.
- ² Kahn SR. 1997. Animal models of kidney stone formation: an analysis. *World J Urol.* 15:236-243.
- ³ López M, Hoppe B. 2010. History, epidemiology and regional diversities of urolithiasis, *Pediatr Nephrol.* 25:49–59.
- ⁴ Wasserstein AG. 2011. Epidemiology and natural history of nephrolithiasis. *Clinic Rev Bone Miner Metab.* DOI 10.1007/s12018-011-9097-3.
- ⁵ Ryall RL, Chauvet MC, Grover PK. 2005. Intracrystalline proteins and urolithiasis: a comparison of the protein content and ultrastructure of urinary calcium oxalate monohydrate and dihydrate crystals. *BJU Int.* 96:654–663.
- ⁶ Graff SL 1987. *Análisis de Orina Atlas Color.* Editorial Médica Panamericana.
- ⁷ Stoller ML, Meng MV. *Urinary stone disease: a practical guide to medical and surgical management.* Current Clinical Urology.
- ⁸ http://es.wikipedia.org/wiki/C%C3%B3lico_nefr%C3%ADtico#cite_ref-schwartz_1-1
- ⁹ Medina-Escobedo M, Zaidi M, Real-de León E, Orozco-Rivadeneira S. 2002. Prevalencia y factores de riesgo en Yucatán, México, para litiasis urinaria. *Salud Pública de México.* 44:541-545.
- ¹⁰ Orozco BR, Camaggi, MC. 2010. Evaluación metabólica y nutricional en litiasis renal. *Rev. Med. Clin. Condes.* 21:567-577.

- ¹¹http://aprendeenlinea.udea.edu.co/lms/moodle/file.php/218/Unidad_4_Enfermedades_renales/Nefrolitiasis.pdf
- ¹² Curhan GC, Willett WC, Knight EL, Stampfer M. 2004. Dietary factors and the risk of incident kidney stones in younger women: nurses' health study II. *Arch Int Med.* 164:885–91.
- ¹³ http://es.wikipedia.org/wiki/C%C3%A1lculos_renales.
- ¹⁴ Ringold S. 2005. Litiasis renal (cálculos renales). *Am J Med Assoc.* 293:1158.
- ¹⁵ Argeri NJ, Lopardo, HA. 1993. Análisis de orina fundamento y prácticas. Editorial Médica Panamericana. 6:133-140.
- ¹⁶ Mo L, Huang HY, Zhu XH, Shapiro E, Hasty DL, Wu XR. 2004. Tamm-Horsfall Protein is a critical renal defense factor protecting against calcium oxalate crystal formation. *Kidney Int.* 66:1159-1166.
- ¹⁷ Liu Y, Mo L, Goldfarb DS, Evan AP, Liang F, Khan SR, Lieske JC, Wu XR. 2010. Progressive renal papillary calcification and ureteral stone formation in mice deficient for Tamm-Horsfall protein. *Am J Physiol Renal Physiol.* 299:F469–F478.
- ¹⁸ Finlayson B, Kahn SR, Hackett RL. 1990. Theoretical chemical models of urinary stone. In: *Renal tract stone – metabolic basis and clinical practice.* Churchill Livingstone, New York. 133-147.
- ¹⁹ Kahn SR. 1991. Pathogenesis of oxalate urolithiasis: lessons from experimental studies with rats. *Am J Kid Dis.* 17:398-401.
- ²⁰ Okada A, Nomura S, Higashibata Y, Hirose M, Gao B, Yoshimura M, Itoh Y, Yasui T, Tozawa K, Kohri K. 2007. Successful formation of calcium oxalate crystal deposition in mouse kidney by intraabdominal glyoxylate injection. *Urol Res.* 35:89-99.

- ²¹ Jihong L, Zhengguo C, Zhaohui Z, Siwei Z, Zhangqun Y. 2007. A Comparative Study On Several Models of Experimental Renal Calcium Oxalate Stones Formation in Rats. *Journal of Huazhong University of Science and Technology*. 27:83-87.
- ²² Oropeza A C, y col. 2006. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. Resultados por entidad federativa, Sonora. Primera edición, diciembre de 2007. INSP. 2:84.
- ²³ <http://zonamedica.com/sistema-urinario/urolitiasis-litiasis-renal/>
- ²⁴ Miyake O, Yoshioka T, Yoshimura K, Honda M, Yamaguchi S, Koide T, Okuyama A. 1998. Expression of Tamm-Horsfall protein in stone-forming rat models. *Br J Urol*. 81:14-19.
- ²⁵ Hess B. 1994. Tamm-Horsfall glycoprotein in calcium nephrolithiasis. *Miner Electrolyte Metab*. 20:393-398.
- ²⁶ Jeong BC, Park MY, Kawak C, Kim BS, Kim JI, Kim HH. 2005. An animal model of calcium oxalate urolithiasis based on a cyclooxygenase 2 selective inhibitor. *Urol Res*. 33: 453-459.
- ²⁷ Evan AP, Bledsoe SB, Connors BA, Deng L, Liang L, Shao C, Fineberg NS, Grynepas MD, Stambrook PJ, Youshi S, Sahota A, Tischfield JA. 2001. Sequential analysis of kidney stone formation in the *Aprt* knockout mouse. *Kidney Int*. 60:910-923.
- ²⁸ Okamoto N, Aruga S, Tomita K, Takeuchi T, Kitamura T. 2007. Chronic acid ingestion promotes renal stone formation in rats treated with vitamin D3. *J Urol Int*. 14:60–66.
- ²⁹ Khan SR, Glenton PA, Byer KJ. 2006. Modeling of hyperoxaluric calcium oxalate nephrolithiasis: Experimental induction of hyperoxaluria by hydroxy-L-proline. *Kidney Int*. 70:914–923.

- ³⁰ Khan SR, Johnson JM, Peck AB, Cornelius JG, Glenton PA. 2002. Expression of osteopontin in rat kidneys: induction during ethylene glycol induced calcium oxalate nephrolithiasis. *J Urol*. 168:1173–1181.
- ³¹ Atmani F, Slimani Y, Mimouni M, Hacht B. 2003. Prophylaxis of Calcium Oxalate Stones by *Herniaria hirsute* on Experimentally Induced nephrolithiasis in Rats. *BJU Int*. 92:137-140.
- ³² Yamaguchi S, Wiessner JH, Hasegawa AT, Hung LY, Mandel GS. 2005. Study of a rat model for calcium oxalate crystal formation without severe renal damage in selected conditions. *J Urol Int*. 12:290-298.
- ³³ Grases F, Garcia-Gonzalez R, Torres JJ, Llobera A. 1998. Effects of phytic acid on renal stone formation in rats. *Scand J Urol Nephrol*. 32:261-265.
- ³⁴ Anbu J, Suman S, Kumar KS, Kumar RS, Nithya S, Kannadhasan R. 2011. Antiurolithiatic Activity of Ethyl Acetate Root Extract of *Ichnocarpus frutescens* using Ethylene Glycol Induced Method in Rats. *J Pharm Sci & Res*. 3:1182-1189.
- ³⁵ Portilla-de Buen E, Ramos L, Aguilar A, Ramos A, García-Martínez D, Cárdenas A, Rodríguez-Reynoso S, Leal C. 2008. *Larrea tridentata* en urolitiasis. Efecto en un modelo no metabólico en ratas, *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*: 46:519-522.
- ³⁶ Khan NI, Shinge JS, Naikwade NS. 2010. Antilithiatic effect of *helianthus annuus* linn. leaf extract in ethylene glycol and ammonium chloride induced nephrolithiasis. *Int J Pharm Sci*. 2:180-184.
- ³⁷ Ashok P, Koti BC, Vishwanathswamy AHM. 2010. Anthiuroliithiatic and antioxidant activity of *Mimusopsn elengi* on ethylene glycol-induced urolithiasis in rats. *Indian J Pharmacol*. 42:380–383.
- ³⁸ Al-Attar AM. 2010. Antilithiatic influence of spirulina on ethylene glycol-induced nephrolithiasis in male rats. *Am. J. Biochem. & Biotech*. 6:25-31.

- ³⁹ Kobayashi T, Okada A, Fujii Y, Niimi K, Hamamoto S, Yasui T, Tozawa K, Kohri K. 2010. The mechanism of renal stone formation and renal failure induced by administration of melamine and cyanuric acid. *Urol Res.* 38:117–125.
- ⁴⁰ Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH. 1992. .Métodos Histotecnologicos. Instituto de patología de las fuerzas armadas de los E.U.A (AFIP).
- ⁴¹ Pizzolato P. 1963. Histochemical recognition of calcium oxalate. *J Histo.* 12:333-336.
- ⁴² Benítez C G. 2007. Aumenta diabetes infantil en Sonora. *La Voz del Puerto.*
- ⁴³ [ESNA] Servicio de Planificación, Estimación y Evaluación de la Nutrición de la FAO. 2003. FAO – Perfiles nutricionales por países. ONU. 3:20-21.
- ⁴⁴ Yasui T, Fujita K, Sasaki S, Sato M, Sugimoto M, Hirota S, Kitamura Y, Nomura S, Kohri K. 1999. Expression of bone matrix proteins in urolithiasis model rats. *Urol Res.* 27:255-261.
- ⁴⁵ Jarald EE, Kushwah P, Edwin S, Asghar S, Patni SA. 2011. Effect of Unex on ethylene glycol-induced urolithiasis in rats. *Indian J Pharmacol.* 43:466-468.
- ⁴⁶ Koide T, Yamaguchi S, Utsunonziya M, Yoshioka T, Sugiyawias K. 1995. The inhibitory effect of kampo extracts on *in vitro* calcium oxalate crystallization and *in vivo* stone formation in an animal model. *Int J Urol.* 2:81-86.
- ⁴⁷ Hirose M, Tozawa K, Okada A, Hamamoto S, Shimizu H, Kubota Y, Itoh Y, Yasui T, Kohri K. 2008. Glyoxylate induces renal tubular cell injury and microstructural changes in experimental mouse. *Urol Res.* 36:139–147.

ANEXOS

ANEXO 1

Técnicas de Tinción Histológicas

Tinción Hematoxilina-eosina.

Se utilizó el método de Harris que se describe a continuación:

1. Primero se desparafinaron las láminas y se hidrataron los cortes, como ya se describió anteriormente.
2. Se tiñó primeramente con hematoxilina de Harris, filtrada recientemente, de 6 a 15 minutos.
3. Se lavó en agua corriente de 2 a 5 minutos.
4. Se decoloró en alcohol ácido al 1%, uno o dos lavadas solamente.
5. Se lavó brevemente en agua corriente.
6. Se colocaron las láminas en una solución débil de agua amoniacal 1 ó 2 lavadas rápidas.
7. Se lavó muy bien con agua corriente.
8. Se colocó en etanol al 80% por un minuto.
9. Se realizó una tinción de contraste con eosina al 1% por 2 minutos.

10. Se deshidrató el tejido y aclaró como sigue: inmersión en alcohol 96°, alcohol 96°, alcohol absoluto, alcohol absoluto, alcohol absoluto-xilol, xilol, xilol, dos minutos en cada uno (ver figura 10).

11. Se montó en resina sintética (preparación permanente)

Tinción de Pizzolato

Esta técnica permitió observar los depósitos de calcio en el tejido de un color oscuro utilizando una mezcla de partes iguales de nitrato de plata y peróxido de hidrógeno. Los pasos a seguir fueron los siguientes:

1. Los cortes desparafinados e hidratados, se cubrieron con una mezcla de peróxido de hidrógeno al 30% (Merck) y nitrato de plata (Merck) al 5% en partes iguales, (pH = 6).
2. Se expusieron los cortes a la luz de 15 a 30 minutos. En los casos de producción de burbujas debido a la presencia de albúmina de huevo en el tejido, se removió la mezcla y se agregó mezcla fresca.
3. Al finalizar el tiempo indicado, se lavaron los cortes con agua destilada y se contrastó con safranina de 3 a 5 minutos, después, se deshidrató como a continuación se describe: se montaron las muestras en un soporte para láminas y se sumergieron en alcoholes como sigue: alcohol 96°, alcohol 96°, alcohol absoluto, alcohol absoluto, alcohol absoluto-xilol, xilol, xilol, dos minutos en cada uno. Posteriormente se montó en resina sintética (preparación permanente).

Tinción Tricrómica de Masson

Esta técnica ayuda a observar fibrosis glomerular.

1. La muestra se desparafinó e hidrató.
2. Se trató con solución de Bouin durante toda la noche a temperatura ambiente. Cuando las secciones fueron fijadas en solución de Bouin inicialmente se omitió este paso.
3. Se lavó con agua corriente hasta que las secciones se aclararon. Se enjuagó con agua destilada.
4. Se coloreó con la solución de hematoxilina de hierro de Weigert durante 10 minutos.
5. Se lavó con agua corriente por 10 minutos. Se enjuagó con agua destilada.
6. Se coloreó con la solución de fucsina ácida-escarlata de Biebrich, durante 15 minutos (se conservó la solución y, se enjuagó con agua destilada).
7. Se diferenció con la solución de ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico durante 10 a 15 minutos. Se observó y cuidó que el colágeno no se tornara rojo, en caso contrario se repitió el paso 7.
8. Se contrastó con la solución de anilina durante 5 a 10 minutos. Se enjuagó con agua destilada.
9. Se diferenció con ácido acético al 1%, de 3 a 5 minutos.
10. Se deshidrató y aclaró a través de alcohol 96°, alcohol 96°, alcohol absoluto, alcohol absoluto, alcohol absoluto-xilol, xilol, xilol.

11. Se montó en resina sintética.

ANEXO 2

Volumen de Líquido Ingerido Diariamente

		Agua purificada						Agua con litógenos											
		Grupo control						Grupo inducido 1						Grupo inducido 2					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Días de inducción	1	32	29.5	27	38	36.5	28.5	30.5	31	28.5	50	17.5	31	32	32	32.5	39	34	27.5
	2	50.5	38.5	35.5	46.5	26	49.5	20.5	25.5	22	17	33	28	16	36	15	8	10.5	29
	3	29.5	36.5	34	41	40	42	16.5	18	10	28	21.5	18	16	32	28.5	19.5	41	20.5
	4	30	30	43.5	48.5	32	30.5	45	1	48	34	56	69	46.5	30.5	16	51.5	64.5	64
	5	39.5	39	39	38	36	38	9.5	0.5	0.5	16.5	11.5	16	20	6.5	28	2	3.5	9
	6	39.5	39	39	38	36	38	9.5	0.5	0.5	16.5	11.5	16	20	6.5	28	2	3.5	9
	7	8	38	35	48	29	31.5	43	37.5	43	45	31.5	35	44	40	44	6	5.5	10.5
	8	46	38	49	48	29	31.5	46	37.5	93	32	31.5	35	41	56	41	6	5.5	10.5
	9	30.5	37	30	39.5	32.5	27	50	48.5	42.5	32	44	43	47.5	49	49.5	X	X	X
	10	30.5	37	30	39.5	32.5	27	50	48.5	42.5	32	44	43	47.5	49	49.5	X	X	X
	11	32	40	30	44	28	30	60	44	44	43	46	32	47	44	67	X	X	X
	12	27.5	47.5	27.5	36.5	29.5	26.5	49	48.5	49	49	44.5	41	47	43	49	X	X	X
	13	27.5	47.5	27.5	36.5	29.5	26.5	49	48.5	49	49	44.5	41	47	43	49	X	X	X
	14	26	40	27	31	26	24	50	60	57	46	47	45	46	33	52	X	X	X
	15	38	43	38	42	31	26	50	32	44	52	34	24	37	25	55	X	X	X
	16	30	54	28	39	28	32	56	50.5	60	56	48	41	48	45	56	X	X	X
	17	25	36	23	30	24	27	45	54	50	54	52	40	38	30	52	X	X	X
	18	29	23.5	22	37	26	26	54.5	53.5	55.5	52.5	44	38.5	45	41.5	54	X	X	X
	19	29	23.5	22	37	26	26	54.5	53.5	55.5	52.5	44	38.5	45	41.5	54	X	X	X
	20	29	23	27	38	28	32	58	90	52	65	50	40	40	39	65	X	X	X
	21	40	30	20	48	30	35	40	85	55	28	50	40	46	35	51	X	X	X
	22	36	24	27	38	29	31	63	61	60	71	46	39	56	49	67	X	X	X
	23	26.5	27.5	18	36	30.5	28.5	47.5	48	39	50	43	29.5	42.5	37	50	X	X	X
	24	26.5	27.5	18	36	30.5	28.5	47.5	48	39	50	43	29.5	42.5	37	50	X	X	X
Vol. ½		31.5	35.4	30.0	39.7	30.5	30.9	43.5	44.5	43.3	41.2	39.1	35.6	39.9	36.7	46.0	16.7	21	22.4
Vol. ½ por grupo		33						41.2						40.9					

ANEXO 3

Comida Ingerida por Rata de Experimentación

Para la monitorización de la ingesta de alimento, se realizaron cuatro ensayos con periodos de 3 días cada uno, durante el periodo del proceso de inducción. El primer ensayo se realizó durante los días 2, 3 y 4, el segundo ensayo fue practicado los días 7, 8 y 9, el tercer ensayo fue practicado los días 13, 14 y 15, y el cuarto ensayo fue practicado los días 19, 20 y 21.

(g)								
Rata	Consumo de 3 días				Consumo diario			
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4
1	50.1	39.3	57.8	56.8	16.7	13.1	19.26	18.93
2	62.8	53.4	66	49.8	20.93	17.8	22	16.6
3	48.7	48.5	53	46.3	16.23	16.16	17.66	15.43
4	42.9	49.1	66	72.3	14.3	16.36	22	24.1
5	55.4	46.6	56.9	55.1	18.46	15.53	18.96	18.36
6	62.3	61	58.5	56.3	20.76	20.3	19.5	18.76
7	22.1	27.8	59.2	57.4	7.36	9.26	19.73	19.13
8	20.6	1.1	48.4	48.7	6.86	0.36	16.13	16.23
9	22.2	8.6	46.1	58.9	7.4	2.86	15.36	19.63
10	24.2	38.5	51	47.1	8.06	12.83	17	15.7
11	13.5	32.4	58.4	55.7	4.5	10.8	19.46	18.56
12	21.9	48.7	59	57	7.3	16.23	19.66	19
13	17.8	47.7	55.7	56.2	5.93	15.9	18.56	18.73
14	42.7	20	52	49	14.23	6.6	17.3	16.33
15	11.1	40.4	54.8	53.7	3.7	13.46	18.26	17.9
16	27	7.9	X	X	9	2.63	X	X
17	23.2	15.9	X	X	7.73	5.3	X	X
18	25.8	19.2	X	X	8.6	6.4	X	X

ANEXO 4

Volumen Urinario.

Las muestras de orina fueron tomadas en periodos de 24 horas cada una, la primer muestra fue tomada antes de iniciar el proceso de inducción de nefrolitiasis, las muestras 2, 3, 4 y 5 fueron tomadas los días 4, 7, 14 y 21 respectivamente. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

(mL)					
	Muestra No.				
Rata	1	2	3	4	5
1	15	18	15.5	14	28
3	5	23	19	10	7
7	19	32	38	35	37
9	29	31	37	43	50
10	16	36	22	26	34
13	9	38	32	29	34
14	5	26	21	18	21
15	11	23	33	27	43

ANEXO 5

Resultados del Análisis Químico de Orina con Tira Reactiva

Muestra 1 día 0										
RATA	PARÁMETROS									
	LEU	NIT	URO	PRO	pH	BLO	SG	KET	BIL	GLU
1	-	-	0.2	15	6.5	-	1.025	-	-	-
3	-	+	0.2	15	6	-	1.025	-	1	-
7	-	-	0.2	30	6	-	1.020	-	1	-
9	-	-	0.2	30	7	-	1.010	-	-	-
10	-	+	0.2	15	7	-	1.020	-	-	-
13	-	+	0.2	-	7	-	1.015	-	-	-
14	-	-	0.2	15	6.5	-	1.030	-	-	-
15	-	-	0.2	-	6	-	1.025	-	-	-
LEU: leucocitos, NIT: nitritos, URO: urobilinógeno, PRO: proteínas, BLO: eritrocitos, SG: densidad, KET: cuerpos cetónicos, BIL: bilirrubina, GLU: glucosa.										
URO, PRO, KET, BIL, GLU: mg/dL; LEU, ERI: cél/μL										

En la tabla anterior se muestran los resultados de la primera muestra de orina recolectada antes de iniciar la administración de los litógenos y como pudo observarse la mayoría de los sujetos en estudio presentan proteinuria quizás debido al tipo de alimentación. Así también se puede decir que ninguno tuvo algún tipo de infección o algún tipo de daño en vías urinarias así que se pueden considerar sanos hasta este momento (día 0).

Muestra 2, día 4										
RATA	PARÁMETROS									
	LEU	NIT	URO	PRO	pH	BLO	SG	KET	BIL	GLU
1	-	-	0.2	15	7	-	1.010	-	1	-
3	-	-	0.2	15	6	-	1.020	-	1	-
7	-	-	0.2	15	7	-	1.010	-	-	-
9	-	-	0.2	15	6	-	1.010	-	-	-
10	-	+	0.2	15	6	-	1.010	-	-	-
13	-	-	0.2	15	6	-	1.010	-	-	-
14	-	-	0.2	-	6	-	1.015	-	-	-
15	-	-	0.2	15	6	-	1.015	-	-	-
LEU: leucocitos, NIT: nitritos, URO: urobilinógeno, PRO: proteínas, BLO: eritrocitos, SG: densidad, KET: cuerpos cetónicos, BIL: bilirrubina, GLU: glucosa.										
URO, PRO, KET, BIL, GLU: mg/dL; LEU, ERI: cél/μL										

En la tabla anterior se muestran los resultados de la muestra 2, tomada el día 4, ya iniciada la inducción de la nefrolitiasis. Puede observarse que el pH de la orina disminuyó en casi todos los sujetos inducidos y en los sujetos control se mantuvo o aumentó.

Muestra 3, día 7										
RATA		PARÁMETROS								
No.	LEU	NIT	URO	PRO	pH	BLO	SG	KET	BIL	GLU
1	-	-	0.2	15	7	-	1.010	-	1	-
3	-	-	0.2	15	6	-	1.020	-	1	-
7	-	-	0.2	15	6.5	-	1.010	-	-	-
9	-	-	0.2	15	6	-	1.010	-	-	-
10	-	-	0.2	30	7	+++	1.015	-	-	-
13	-	-	0.2	15	6	+++	1.020	-	-	-
14	-	-	0.2	15	6	-	1.010	-	-	-
15	-	-	0.2	15	7	++	1.015	-	-	-
LEU: leucocitos, NIT: nitritos, URO: urobilinógeno, PRO: proteínas, BLO: eritrocitos, SG: densidad, KET: cuerpos cetónicos, BIL: bilirrubina, GLU: glucosa.										
URO, PRO, KET, BIL, GLU: mg/dL; LEU, ERI: cél/ μ L										

En la tabla anterior se muestran los resultados del análisis químico de orina con tira reactiva de la muestra 3, tomada el día 7, ya iniciada la administración de los litógenos. Pudo observarse que los sujetos presentaron proteinuria, y que el pH aumentó ligeramente en algunos casos, así también puede decirse que hubo algún tipo de daño en vías urinarias debido a que presentaron hematuria 3 de los 6 sujetos inducidos (sujetos 10, 13 y 15), en cambio, los sujetos control se mantuvieron sin cambio con respecto al inicio de la inducción.

Muestra 4, día 14										
RATA	PARÁMETROS									
	LEU	NIT	URO	PRO	pH	BLO	SG	KET	BIL	GLU
1	-	-	0.2	30	6.5	-	1.020	5	-	-
3	-	+	0.2	30	7	-	1.020	5	1	-
7	-	-	0.2	30	5	-	1.010	-	-	-
9	-	-	0.2	-	5	50 E/ μ L	1.005	-	-	-
10	-	-	0.2	15	5	+++	1.010	-	-	-
13	-	-	0.2	15	6	50E/ μ L	1.015	5	-	-
14	-	-	0.2	15	5	+	1.015	-	-	-
15	-	-	0.2	30	5	50E/ μ L	1.010	-	-	-
LEU: leucocitos, NIT: nitritos, URO: urobilinógeno, PRO: proteínas, BLO: eritrocitos, SG: densidad, KET: cuerpos cetónicos, BIL: bilirrubina, GLU: glucosa.										
URO, PRO, KET, BIL, GLU: mg/dL; LEU, ERI: cél/ μ L										

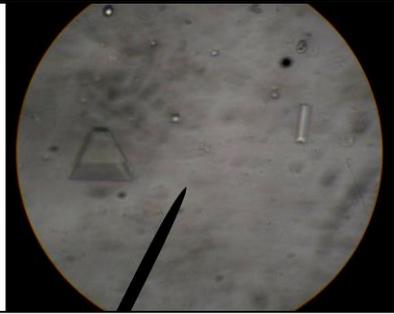
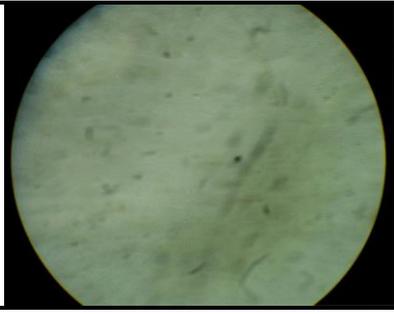
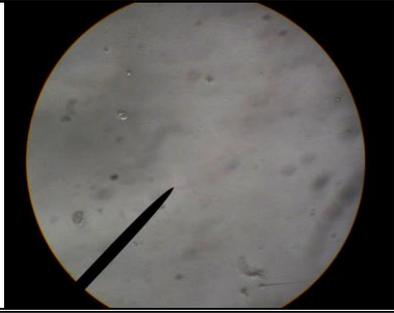
En la tabla anterior se muestran los resultados de la prueba de tira reactiva de la muestra 4 recolectada el día 14 ya iniciada la administración de los litógenos. Puede observarse que presentaron proteinuria aún los sujetos control (no inducidos), también se observó la disminución del pH y puede observarse hematuria ya muy marcada en casi todos los sujetos inducidos, lo que indica que hubo algún tipo de daño renal o en las vías urinarias.

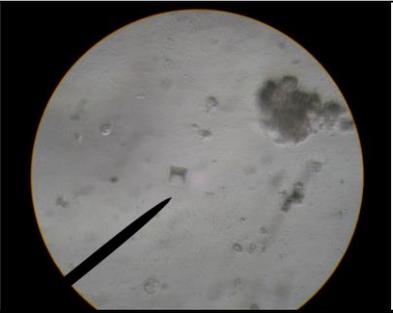
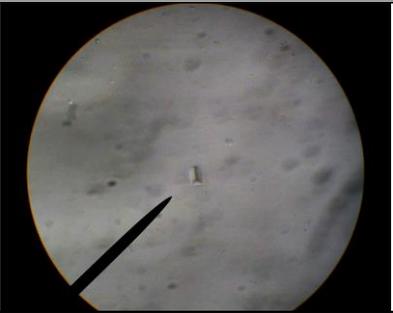
Muestra 5, día 21										
RATA	PARÁMETROS									
	LEU	NIT	URO	PRO	pH	BLO	SG	KET	BIL	GLU
1	-	-	0.2	30	7	-	1.010	40	-	-
3	-	-	0.2	100	6.5	-	1.020	15	1	-
7	-	-	0.2	15	6	50 E/ μ L	1.010	40	-	-
9	-	-	0.2	15	5	-	1.010	40	-	-
10	-	-	0.2	15	5	50 E/ μ L	1.015	40	-	-
13	-	-	0.2	15	6	+++	1.020	40	-	-
14	-	-	0.2	30	5	50 E/ μ L	1.020	40	-	-
15	-	-	0.2	15	5	\pm	1.015	40	-	-
LEU: leucocitos, NIT: nitritos, URO: urobilinógeno, PRO: proteínas, BLO: eritrocitos, SG: densidad, KET: cuerpos cetónicos, BIL: bilirrubina, GLU: glucosa.										
URO, PRO, KET, BIL, GLU: mg/dL; LEU, ERI: cél/ μ L										

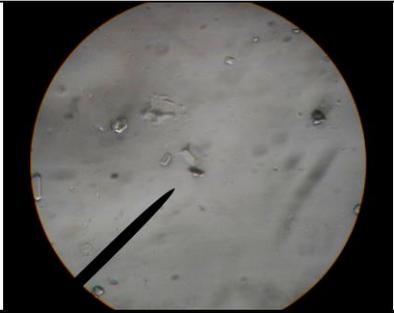
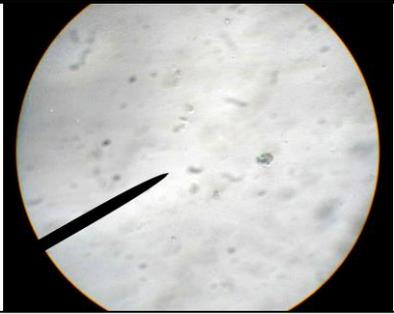
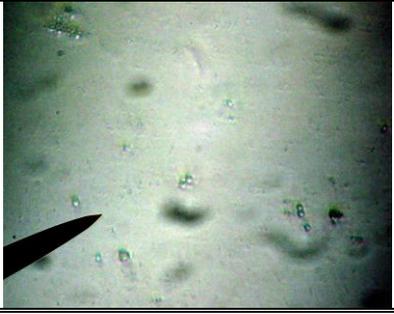
En la tabla anterior se ilustran los resultados de la prueba de tira reactiva de la muestra 5, recolectada el día 21, ya iniciada la administración de los litógenos. Puede observarse que aún siguieron presentando proteinuria, así como que el pH continuó bajo y que ahora hubo presencia de cuerpos cetónicos, lo que habla de una cetoacidosis, así también se siguió observando hematuria lo que indica daño renal o en vías urinarias, sin infección debido a que no hubo alteración de los leucocitos.

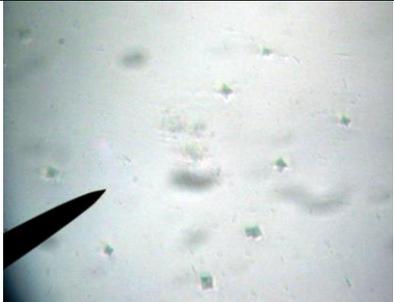
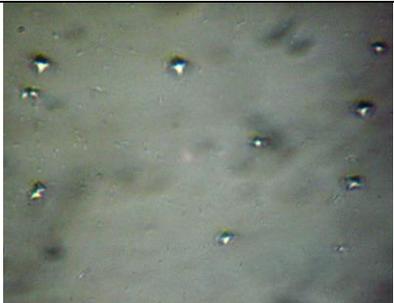
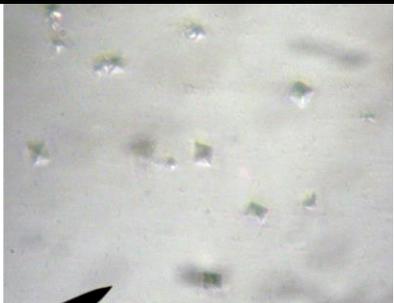
ANEXO 6

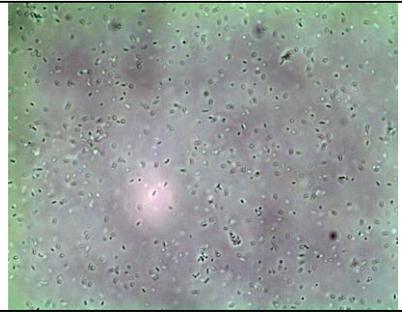
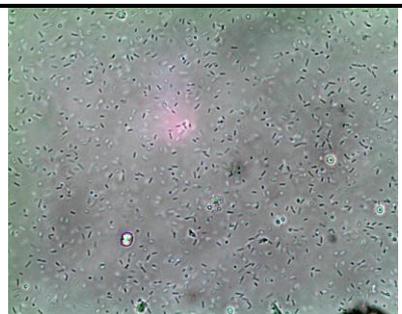
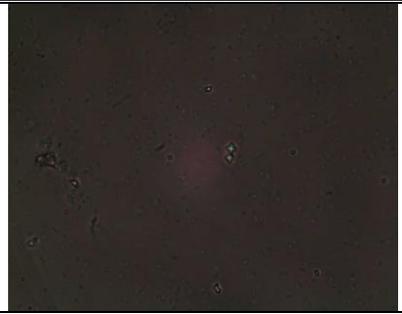
Resultados y Observaciones del Examen Microscópico de Sedimento Urinario

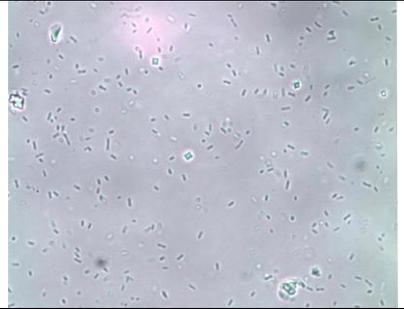
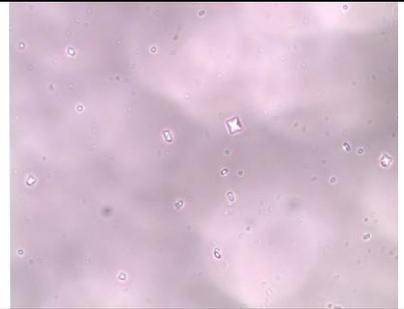
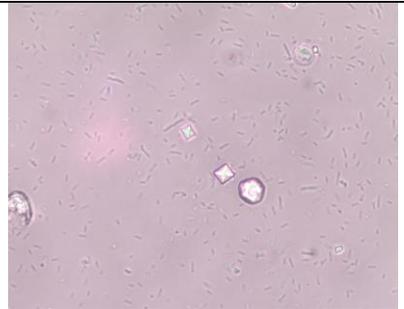
Muestra 1 (día 0)	
Grupo control	
Sujeto 1	
	<p>Bacterias abundantes, cristales de fosfato triple, escasos, leucocitos y eritrocitos negativos, células epiteliales negativas.</p>
Sujeto 3	
	<p>Bacterias abundantes, leucocitos y eritrocitos negativos, células epiteliales negativas</p>
Grupo Inducido 1	
Sujeto 7	
	<p>Bacterias abundantes, cristales negativos, eritrocitos y leucocitos negativos, células epiteliales negativas.</p>
Sujeto 9	
	<p>Bacterias negativas, cristales negativos, eritrocitos y leucocitos negativos, células epiteliales negativas.</p>

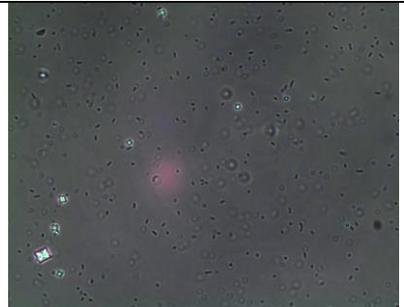
Muestra 1 (día 0)	
Grupo Inducido 1	
Sujeto 10	
	<p>Bacterias abundantes, cristales de fosfato triple, escasos, leucocitos y eritrocitos negativos, células epiteliales negativas.</p>
Grupo Inducido 2	
Sujeto 13	
	<p>Bacterias abundantes, cristales de fosfato triple, escasos, leucocitos y eritrocitos negativos, células epiteliales negativas.</p>
Sujeto 14	
	<p>Bacterias abundantes, cristales negativos, leucocitos y eritrocitos negativos, células epiteliales negativos.</p>
Sujeto 15	
	<p>Bacterias abundantes, leucocitos y eritrocitos negativos, células epiteliales negativas</p>

Muestra 2 (día 4)	
Grupo control	
Sujeto 1	
	Bacterias negativas, cristales de fosfato triple, escasos, leucocitos y eritrocitos negativos, células epiteliales negativas.
Sujeto 3	
	Bacterias negativas, cristales negativos, leucocitos y eritrocitos negativos, células epiteliales negativas.
Grupo Inducido 1	
Sujeto 7	
	Bacterias escasas, cristales de oxalato de calcio abundantes (++++), leucocitos y eritrocitos negativos, células epiteliales negativas.
Sujeto 9	
	Bacterias negativas, cristales de oxalato de calcio, escasos, leucocitos y eritrocitos negativos, células epiteliales negativas.

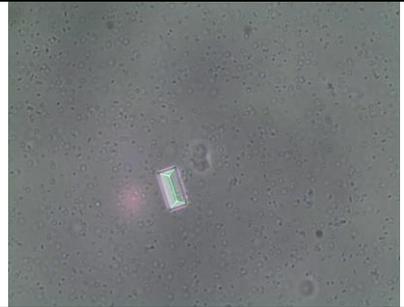
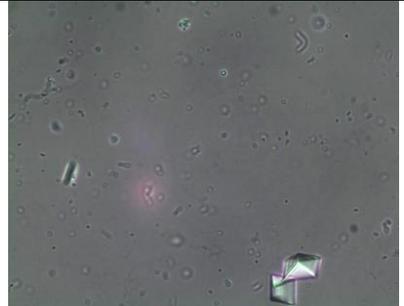
Muestra 2 (día 4)	
Grupo Inducido 1	
Sujeto 10	
	Bacterias negativas, cristales de oxalato de calcio, positivos, leucocitos y eritrocitos negativos, células epiteliales negativas.
Grupo Inducido 2	
Sujeto 13	
	Bacterias negativas, cristales de oxalato de calcio, positivos, leucocitos y eritrocitos negativos, células epiteliales negativas.
Sujeto 14	
	Bacterias escasas, cristales de oxalato de calcio, abundantes, leucocitos y eritrocitos negativos, células epiteliales negativas.
Sujeto 15	
	Bacterias negativas, cristales de oxalato de calcio, abundantes, leucocitos y eritrocitos negativos, células epiteliales negativas.

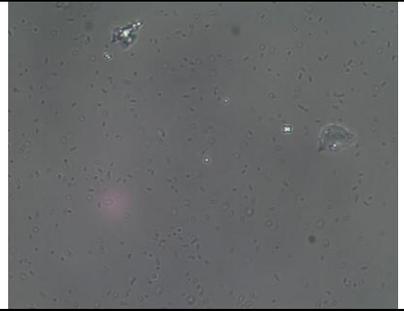
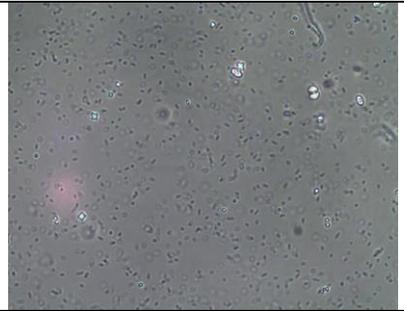
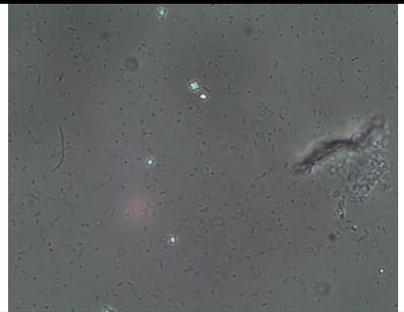
Muestra 3 (día7)	
Grupo control	
Sujeto 1	
	Abundantes bacterias, cristales negativos, leucocitos negativos, eritrocitos negativos, células epiteliales negativas.
Sujeto 3	
	Abundantes bacterias, cristales negativos, leucocitos negativos, eritrocitos negativos, células epiteliales negativas.
Grupo Inducido 1	
Sujeto 7	
	Bacterias abundantes, cristales de oxalato de calcio, positivos, leucocitos y eritrocitos negativos, restos celulares escasos.
Sujeto 9	
	Bacterias abundantes, cristales de oxalato de calcio, escasos, leucocitos y eritrocitos negativos, restos celulares negativos.

Muestra 3 (día 7)	
Grupo Inducido 1	
Sujeto 10	
	Bacterias abundantes, cristales de oxalato de calcio, escasos, leucocitos negativos, eritrocitos positivos (++) , restos celulares, escasos.
Grupo Inducido 2	
Sujeto 13	
	Bacterias escasas, cristales de oxalato de calcio positivos, leucocitos negativos, eritrocitos positivos (+++), restos celulares escasos.
Sujeto 14	
	Bacterias abundantes, cristales de oxalato de calcio, escasos, leucocitos negativos, eritrocitos positivos (+++), restos celulares escasos.
Sujeto 15	
	Bacterias abundantes, cristales de oxalato de calcio, escasos, leucocitos negativos, eritrocitos positivo (++) , restos celulares escasos.

Muestra 4 (día 14)	
Grupo Inducido 1	
Sujeto 1	
	Bacterias abundantes, cristales de fosfato triple, escasos, leucocitos y eritrocitos negativos, células epiteliales negativas.
Sujeto 3	
	Bacterias abundantes, cristales negativos, leucocitos y eritrocitos negativos, células epiteliales negativas.
Grupo Inducido 1	
Sujeto 7	
	Bacterias abundantes, cristales de oxalato de calcio, escasos, leucocitos negativos, eritrocitos negativos, células epiteliales negativas.
Sujeto 9	
	Bacterias abundantes, cristales de oxalato de calcio, escasos, leucocitos negativos, eritrocitos abundantes, células epiteliales abundantes.

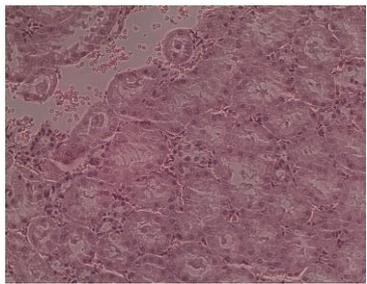
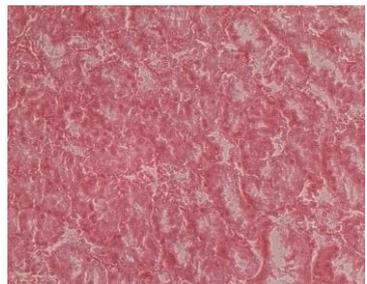
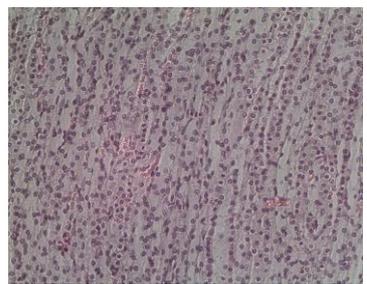
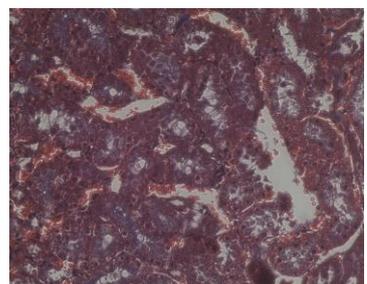
Muestra 4 (día 14)	
Grupo Inducido 1	
Sujeto 10	
	Bacterias abundantes, cristales de oxalato de calcio positivos, leucocitos negativos, eritrocitos positivos (+++), células epiteliales abundantes.
Grupo Inducido 2	
Sujeto 13	
	Bacterias abundantes, cristales de oxalato de calcio abundantes pero pequeños, leucocitos negativos, eritrocitos positivos (++++), células epiteliales abundantes.
Sujeto 14	
	Bacterias abundantes, cristales de oxalato de calcio abundantes pero pequeños, leucocitos negativos, eritrocitos positivos (+), células epiteliales abundantes.
Sujeto 15	
	Bacterias abundantes, cristales de oxalato de calcio escasos, leucocitos negativos, eritrocitos positivos (++++), células epiteliales abundantes.

Muestra 5 (día 21)	
Grupo control	
Sujeto 1	
	Bacterias abundantes, cristales de fosfato triple, escasos, leucocitos negativos, eritrocitos negativos, células epiteliales negativas.
Sujeto 3	
	Bacterias abundantes, cristales escasos, leucocitos negativos, eritrocitos positivos, células epiteliales negativas
Grupo Inducido 1	
Sujeto 7	
	Bacterias abundantes, cristales de oxalato de calcio escasos, leucocitos negativos, eritrocitos abundantes (++++), células epiteliales abundantes.
Sujeto 9	
	Bacterias abundantes, cristales de oxalato de calcio, escasos, leucocitos negativos, eritrocitos negativos, células epiteliales escasas.

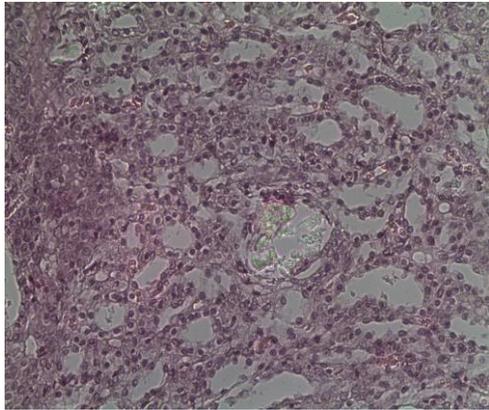
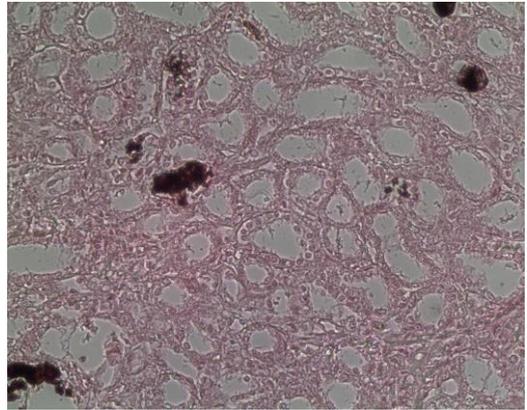
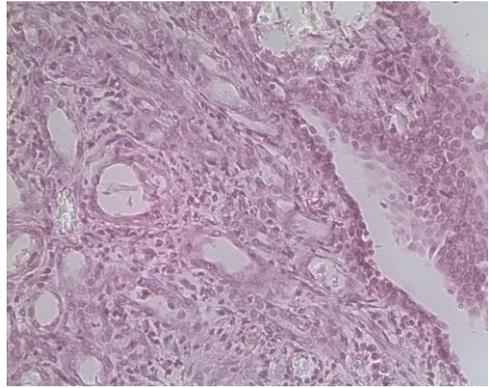
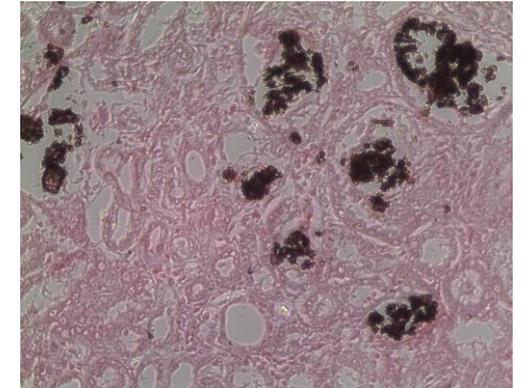
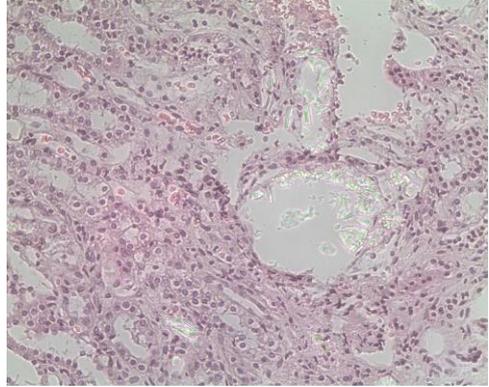
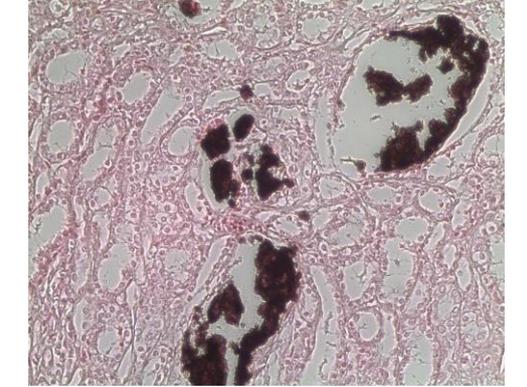
Muestra 5 (día 21)	
Grupo Inducido 1	
Sujeto 10	
	Bacterias abundantes, cristales de oxalato de calcio, escasos, leucocitos negativos, eritrocitos abundantes, células epiteliales abundantes.
Grupo Inducido 2	
Sujeto 13	
	Bacterias abundantes, cristales de oxalato de calcio, escasos, leucocitos negativos, eritrocitos positivos (+++), células epiteliales abundantes.
Sujeto 14	
	Bacterias abundantes, cristales oxalato de calcio, escasos, leucocitos negativos, eritrocitos abundantes, células epiteliales abundantes.
Sujeto 15	
	Bacterias abundantes, cristales de oxalato de calcio positivo, leucocitos negativos, eritrocitos escasos, células epiteliales escasas.

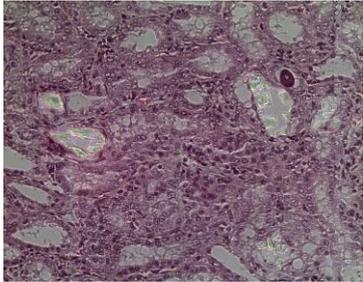
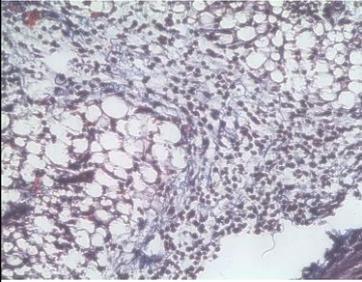
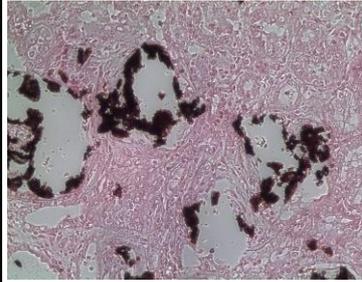
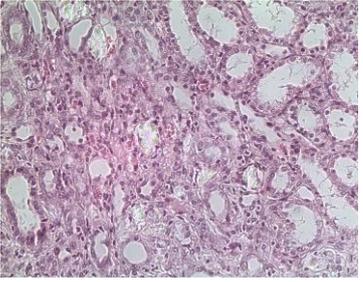
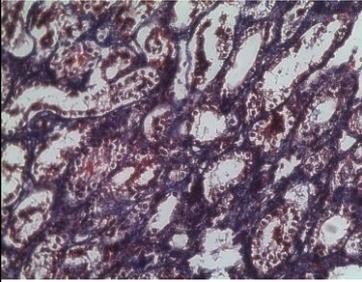
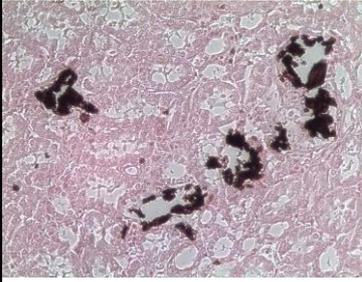
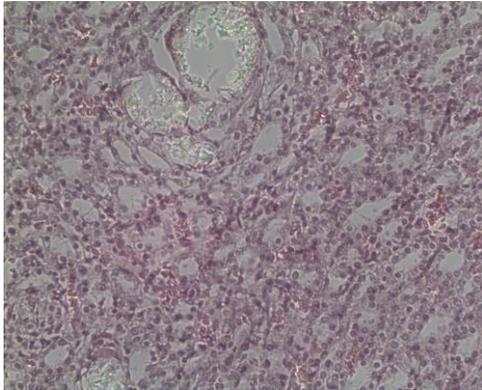
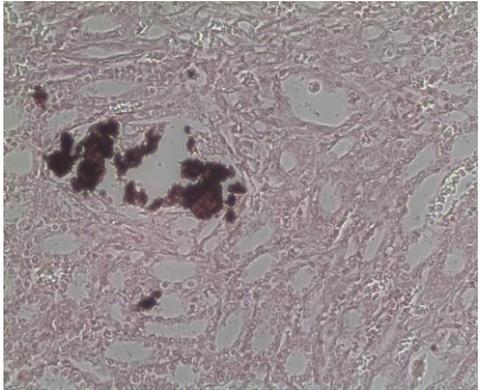
ANEXO 7

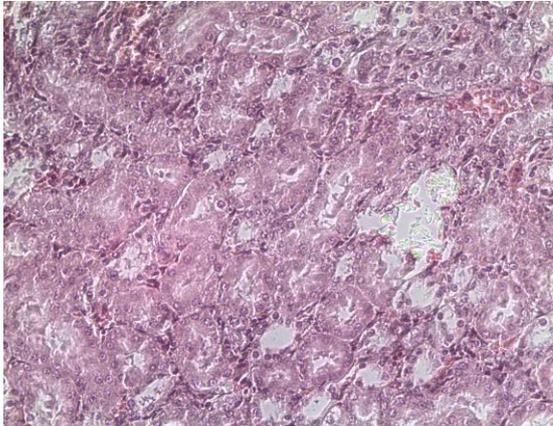
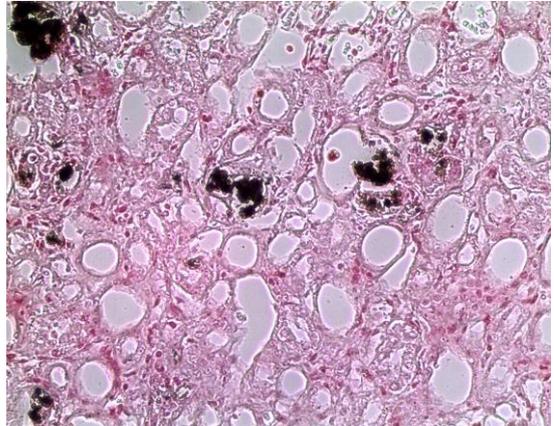
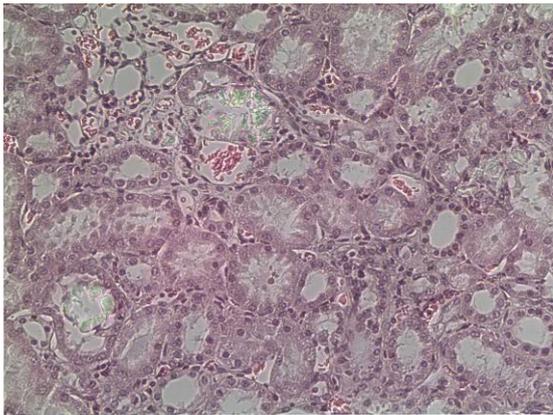
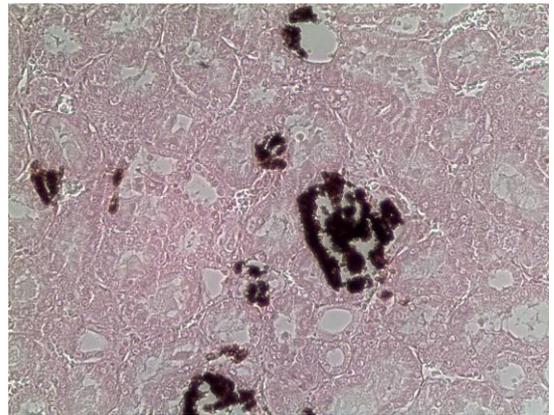
Resultados y Observaciones del Examen Histopatológico.

Grupo control		
Sujeto 1		
Tinción HE (a)	Tinción de Masson (b)	Tinción de Pizzolato (c)
		
Sujeto 6		
Tinción HE (d)	Tinción de Masson (e)	Tinción de Pizzolato (f)
		

Aquí puede observarse cortes histológicos de riñón de sujetos sanos del grupo control. De igual manera puede observarse en las imágenes (a) y (d) uniformidad celular y núcleos bien formados y normales, en las imágenes (b) y (e) no se observa algún tipo de daño o fibrosis glomerular y en las imágenes (c) y (f) no puede observarse depósito de calcio alguno.

Grupo Inducido 1	
Sujeto 7	
Tinción HE (a)	Tinción de Pizzolato (b)
	
Sujeto 8	
Tinción HE (c)	Tinción de Pizzolato (d)
	
Sujeto 9	
Tinción HE (e)	Tinción de Pizzolato (f)
	

Grupo Inducido 1		
Sujeto 10		
Tinción HE (g)	Tinción de Masson (h)	Tinción de Pizzolato (i)
		
Sujeto 11		
Tinción HE (j)	Tinción de Masson (k)	Tinción de Pizzolato (l)
		
Sujeto 12		
Tinción HE (m)	Tinción de Pizzolato (n)	
		

Grupo Inducido 2	
Sujeto 13	
Tinción HE (a)	Tinción de Pizzolato (b)
	
Sujeto 14	
Tinción HE (c)	Tinción de Pizzolato (d)
	
Sujeto 15	
Tinción HE (e)	Tinción de Pizzolato (f)
