UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLOGÍCAS "DR IGNACIO CHÀVEZ"

MEDICIÓN DE LA TASA DE FILTRADO GLOMERULAR POR ELECTROFORESIS CAPILAR CON TRES MARCADORES RADIOGRÁFICOS EN PERROS

TESIS QUE PRESENTA:

IGNACIO NETZAHUALCOYOTL BARAJAS LÒPEZ

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

DIRECTORA DE TESIS:

D.C. VIRGINIA ANGELICA ROBINSON FUENTES

COMITÉ TUTORIAL:

D.C. JOSE LUIS SOLORIO RIVERA

D.C. MA. SOLEDAD VÁZQUEZ GARCIDUEÑAS

D.C. GERARDO VAZQUEZ MARRUFO

Morelia, Michoacán. Julio de 2010.

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLOGÌCAS “DR IGNACIO CHÁVEZ”

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

TESIS

MEDICIÓN DE LA TASA DE FILTRADO GLOMERULAR POR ELECTROFORESIS CAPILAR CON TRES MARCADORES RADIOGRÁFICOS EN PERROS

QUE PRESENTA:

IGNACIO NETZAHUALCOYOTL BARAJAS LÒPEZ

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

Morelia, Michoacán. Julio de 2010.

Proyecto realizado en el Laboratorio de Desarrollo Analítico de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

AGRADECIMIENTOS

A la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por el financiamiento otorgado dentro del programa de investigación 2009 y a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por la beca de estudio.

A la asesora de este trabajo DC Virginia Angélica Robinson Fuentes, a los profesores del comité tutorial DC Ma Soledad Vázquez Garcidueñas, DC Gerardo Vázquez Marrufo y en especial al DC José Luis Solorio Rivera por su orientación y amistad.

Al cuerpo docente de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por su trabajo tenaz y atención a los estudiantes en esta dependencia.

A la administración de la FMVZ-UMSNH en el periodo 2005-2009: MVZ Alberto Arres Rangel, DC Octavio Calderón y MVZ Fidel Valencia por el apoyo recibido.

A la QFB Judith Ayala García y al QFB Carlos Alonso Muñoz del Laboratorio de Análisis Clínicos de la Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por el apoyo a esta investigación.

Al personal académico, administrativo y estudiantes de la Clínica Veterinaria de la Universidad Michoacana de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo que me apoyaron en el desarrollo de este trabajo, en especial a las MVZ Norma Avilés Torres, MVZ Norma Leticia Anayetzin Alvarado Enriquez, Angélica Gutiérrez Cancino, MVZ Guadalupe Gutiérrez Cancino, MVZ Lucero Loeza Magaña, CP Yira Romero Guzmán, Alejandra Aide Barrera Barriga, Sr. PMVZ Juan Carlos Quintana Jiménez, PMVZ Monserrat Quiroz Regalado, PMVZ Sergio Méndez Delgadillo y María Ivette García Rodríguez.

Al MVZ Miguel Ángel Huitzacua Barajas y familia.

A mis compañeros de la División de Posgrado con quienes compartimos muchos momentos buenos: Alfredo, Andrei, Araceli, Gaby, Gissela, Iliana, Juan Carlos, Kena, Saila, Sonia, Texca y en especial a las D.D. MFB Leticia García Aguilar y MVZ Idalia Fuentes Ambriz.

DEDICATORIA

Muy especialmente a mi amada compañera y amiga Gabriela por su amor e infinita paciencia. Con mucho cariño para Tania Beatriz y Tessa Gabriela a quienes siempre llevo en mis pensamientos.

A mis padres Dr. Santiago Barajas Carrasco†, Sra. Graciela López Aburto† y mis hermanos Graciela, Giselita, Lupita, Flor Cecilia, Lelia Berenice, Santiago, Rafo y familias.

A la Sra Guadalupe Pérez Gónzalez, Sr. Enrique Arnaud Ojeda† e hijos.

A mis tíos, en especial a Rafaela Barajas Carrasco, primos y a todos mis queridos sobrinos labregones.

A los que aman a los animales y abrazan nuestra profesión del cuidado de los animales. A mis compañeros con quienes iniciamos la Asociación Michoacana de Clínicas de Pequeñas Especies en especial a Alfredo Andrade Chávez, Gabriel García Gómez y Eduardo Betancourt Morales.

A la MVZ Gudelia Aglay Carrasco, MVZ Jesús Camacho, Jesús Chávez Arellano y familias.

A los alumnos y egresados de la Clínica Veterinaria de la Universidad Michoacana, con quienes hemos compartido muchas experiencias.

A los estudiantes que se apasionan en el estudio de la salud, el misterio de la enfermedad y la curación en los animales.

A los perros y gatos, que como pacientes o animales empleados en los trabajos de investigación facilitan la formación de buenos profesionistas y nos ayudan a descubrir el funcionamiento del organismo animal y como atender las enfermedades que lo aquejan.

Y en especial a ti…

"Este autor no tiene mucha confianza en el uso de la rata blanca como animal de experimentación para comparación con el hombre como lo tiene con el conejo. Se debe notar que la cepa Wistar, por ejemplo, proviene de la cepa King A albino establecida por Helen Dean King en el Instituto Wistar en 1904, y ha sido criada por 139 generaciones. Aun cuando en años recientes ha sido cruzas no consanguíneas más que cruzas consaguíneas, el efecto biológico real de la selección dentro de esta cepa para la maduración rápida, tamaño de las camadas, docilidad, etc., no han sido evaluadas. Teniendo un par de hermanos de *H. sapiens* o de *Canis familiaris* que hayan sido seleccionados de manera similar para la cruza consanguínea o para el mestizaje por cruza estrecha durante 139 generaciones (calculando 25 años por generación, desde 1525 a.C.), pocos estudiantes de fisiología esperarían que reaccionaran al estrés de manera similar al *H. sapiens* o *Canis familiaris*, ambos de los cuales son generalmente representados en investigaciones de fisiología por individuos criollos"

Homer Smith, 1951.

INDICE

INTRODUCCION ……. 1
I.1 MARCO TEORICO ……. 5
I.1 FUNCIONAMIENTO RENAL ……. 5
I.1.1 Unidad funcional: el nefrón …….. 5
I.1.2 Irrigación en el glomérulo …… 6
I.1.3 Fisiología de la filtración …….. 6
I.2 PATOFISIOLOGÍA DE LA ENFEREMEDAD RENAL…… 10
I.3 PRUEBAS DE VALORACIÓN DE LA FUNCIÓN RENAL …… 11
I. 3.1 Pruebas indirectas de la función renal …… 11
I.3.2 Creatinina y nitrógeno ureico en sangre …… 12
I. 3.3 Pruebas directas de la función renal …… 14
I.4 TASA DE FILTRADO GLOMERULAR …… 14
I.4.1 Antecedentes …… 15
I.4.2 Indicaciones de la medición de la TFG …… 16
I.4.3 Factores que influyen en la TFG …….. 17
I.4.4 Aclaramiento renal…… 18
I.4.5 Características de los marcadores de la TFG …… 20
I.4.6 Influencia de las propiedades del marcador …… 21
I.4.7 Reacciones secundarias de los marcadores iodados renales …… 22
I.4.8 Elección de una técnica de aclaramiento …… 23
I.4.9 Aclaramiento de inulina …… 24
I.4.10 Medición de la TFG con marcadores radioactivos …… 25
I. 4.11 Medición de la TFG con marcadores no radioactivos …… 26
I.5 FUNDAMENTOS DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR …….. 28
I.6 MARCADORES RADIOGÁFICOS USADOS …… 33
I.6.1 Iotalamato …… 33
I.6.2 Iohexol …… 36
I.6.3 Iopamidol …… 40
II JUSTIFICACIÓN …… 44
III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA …….. 45
IV OBJETIVOS …… 46
IV. 1 Objetivo general …… 46
IV.2 Objetivos Particulares …….. 46
V HIPÓTESIS …….. 47
VI MATERIAL Y MÉTODOS …….. 48
VI.1 Tipo de estudio …… 48
VI.2 Grupo de animales …….. 48
VI.3 Criterios de inclusión …….. 49
VI.4 Criterios de exclusión …….. 49
VI.5 Obtención de muestras para laboratorio …… 49
VI.6 Medición de la presión arterial …… 50
VI.7 Toma de biopsia renal …….. 50
VI.8 Protocolo para el aclaramiento renal …… 51
VI.9 Medición de la Tasa de Filtrado Glomerular por ECZ …… 52
VI.9.1 Instrumentación ……... 52
VII RESULTADOS …… 54
VIII DISCUSIÓN …… 69
IX CONCLUSIONES …… 77
X PERSPECTIVAS …… 78
XI BIBLIOGRAFÍA …… 79
XII ANEXOS …… 90
Anexo 1. Resultados de análisis clínicos …….. 90
Anexo 2. Valores de la presión arterial periférica …… 93
Anexo 3. Reportes de estudios histopatológicos renales …… 93

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Representación de una separación electroforética en un capilar …….. 31
Figura 2. Diagrama del aparato de electroforesis capilar …… 32
Figura 3. Estructura química del iotalamato …… 34
Figura 4. Estructura química del iohexol …… 38
Figura 5. Estructura química del iopamidol …… 41
Figura 6. Electroferogramas de los tres marcadores en orina …… 55
Figura 7. Linealidad del sistema para los tres marcadores …… 56
Figura 8. Variabilidad interdía para el iotalama …… 57
Figura 9. Variabilidad interdía para el iohexol …… 57
Figura 10. Variabilidad interdía para el iopamidol …….. 58
Figura 11. EFG de orina y plasma con iotalamato ……. 60
Figura 12. EFG orina y plasma con iohexol ……... 61
Figura 13. EFG orina y plasma con iopamidol ……. 61
Figura 14. Limites de determinación y detección para el iotalamato …… 64
Figura 15. Limites de determinación y detección para el iohexol …… 64
Figura 16. Limites de determinación y detección para el iopamidol …… 65
Figura 17. EFG con concentración m{inima de iohexol …… 65

Tabla 1. Valores reportados de TFG en perros ……. 19
Tabla 2. Análisis de regresión lineal del iotalamato …….. 58
Tabla 3. Análisis de regresión lineal del iohexol ……. 59
Tabla 4. Análisis de regresión lineal del iotalamato …….. 59
Tabla 5. Variabilidad intradía para iotalamato ……... 62
Tabla 6. Variabilidad intradía para el iohexol ……. 62
Tabla 7. Variabilidad intradía para el iopamidol ……. 62
Tabla 8. Variabilidad interdía para el iotalamato ……. 63
Tabla 9. Variabilidad interdía para el iohexol ……... 63
Tabla 10. Variabilidad interdía para el iopamidol …….. 63
Tabla 11. Estimación de la TFG en base a peso corporal ……. 66
Tabla 12. Estimación de la TFG en base a la superficie corporal ……. 66
Tabla 13. Tabla ANOVA ……. 67
Tabla 14. Comparación del iotalamato vs iohexol …… 67
Tabla 15. Comparación del iotalamato vs iopamidol …… 67
Tabla 16. Comparación del iohexol vs iopamidol …… 68

Ecuación 1. Fórmula clásica de Rehberg para cálculo de la TFG …… 15
Ecuación 2. Aclaramiento renal …….. 18
Ecuación 3. Cálculo para la movilidad electroforética …… 29
Ecuación 4. Cálculo de la velocidad electroforética …… 29
Ecuación 5. Fórmula para calcular la TFG por aclaramiento renal en kg …… 53
Ecuación 6. Fórmula para calcular la TFG por aclaramiento renal en m^2 …… 53

INDICE DE ABREVIACIONES

µm	Micrómetro
ADH	Hormona anti diurética
d.e.	Diámetro externo
d.i.	Diámetro interno
Da	Dalton
DL_{50}	Dosis letal cincuenta
DSA	Angiografía por sustracción digital
DTPA	Dietilenetriaminepentacetico
EC	Electroforesis capilar
ECZ	Electroforesis capilar de zona
EDTA	Ácido etilendiaminotetracetico
EFG	Electroferograma
EOF	Flujo electrosmótico
FDA	Agencia Federal de Drogas de los EEUU
IM	Intramuscular
IRC	Insuficiencia renal crónica
IV	Intravenoso
kDa	Kilodalton
kV	Kilo volts
L_d	Longitud del capilar hasta el detector
LIF	Fluorescencia inducida por laser
L_T	Longitud total del capilar
MBG	Membrana basal glomerular
MCR	Medio de contraste radiográfico
mOsm	Miliosmol
NaCl	Cloruro de sodio
NUS	Nitrógeno ureico sanguíneo
pH	Potencial de hidrógeno
PM	Peso molecular
TFG	Tasa de filtrado glomerular
t_m	Tiempo de migración
UV	Ultravioleta
*v*ep	Velocidad electroforética
λ_{max}	Longitud de onda máxima
µep	Movilidad electroforética

INTRODUCCIÓN

Los principales retos con los que se enfrenta el médico en el momento de estudiar a un paciente con enfermedad renal son demostrar la presencia y gravedad del proceso para establecer un diagnóstico y tratamiento correctos. Aunque la historia clínica puede ser útil, el estudio clínico de la función renal depende principalmente de las pruebas de laboratorio, especialmente de la estimación de la tasa de filtrado glomerular (TFG), ya que puede utilizarse para demostrar la presencia, estimar la gravedad y hacer el seguimiento de una enfermedad renal (Rose, 1985).

Es aceptado que las enfermedades renales son un problema común en la clínica de pequeñas especies. La insuficiencia renal es aún una causa importante de morbilidad en especies pequeñas (Rivas *et al.*, 1997; Krawiec y itkin, 1997; Barrera, 2007; Polzin *et. al.*, 2007). La insuficiencia renal crónico (IRC) es el trastorno renal que se diagnostica con mayor frecuencia en perros y gatos (Barrera, 2007). Los desordenes renales crónicos en perros y gatos presentan una elevada incidencia y es una de las principales causas de mortalidad en animales geriátricos (Pugliese *et al., 2005).* Con frecuencia, el origen de la IRC recae en tratamientos que el paciente recibió a lo largo de su vida, no observándose la presencia de enfermedades renales en estos animales, hasta que las condiciones han avanzado a etapas terminales, donde ya existen signos clínicos de uremia (Rivas *et al*., 1997; Cotard, 2009).

Muchos de los perros mantenidos como mascotas aparentan estar sanos a pesar de padecer una enfermedad renal. La mayoría de propietarios de mascotas desconocen la alta incidencia de las enfermedades renales en los perros y gatos. Los estudios realizados por la fundación Animal Morris a partir de 1986 y hasta 1991 concluyeron que la enfermedad renal es la primera causa de muerte no accidental en gatos y la segunda causa de muerte no accidental en perros (Bronson, 1982). Otros investigadores encontraron que la enfermedad renal sólo es superada por el cáncer como la principal causa de muerte en perros. Un tercer

estudio concluyó que el 20% de los perros mayores de 5 años de edad tienen más de un 75% de reducción en la función renal (Allen y Gross, 1996). Sanderson (2005) ha considerado que uno de cada tres gatos y uno de cada cinco perros geriátricos en los Estados Unidos padecen IRC. En la base de datos veterinarios (Veterinary Medical Data Base) de la Universidad de Purdue, EEUU, entre los años de 1983 a 1992 se registró que el 18% de los perros con insuficiencia renal tenían menos de 4 años de edad, el 17% entre 4 y 7 años, el 20% entre 7 y 12.5 años y el 45% más de 10 años. Durante este período, la prevalencia fue de 12.5 por cada 1000 y entre los de más de 15 años de 50 por cada 1000 (Polzin *et al.*, 2007).

Se ha observado que en nuestro medio no se cuenta con bases de datos de expedientes clínicos que permitan el análisis y la evaluación oportuna de los problemas que aquejan a las mascotas en una ciudad, región o a nivel país. Sin embargo, a la IRC se le ha reconocido como una patología que frecuentemente afecta a los perros, y se han identificado como factores de riesgo a las enfermedades gastrointestinales, cardiacas y tratamientos medicamentosos previos (Moreno *et al.*, 2007). Las afecciones del sistema genitourinario han sido reportadas como la cuarta causa de presentación a consulta de perros en una clínica veterinaria de la Ciudad de Morelia, Michoacán (Maldonado, 2003).

La IRC es una afección resultante de la pérdida prolongada, significativa y de forma irreversible del tejido renal funcional, generalmente con una evolución de meses o años. Cuando esta inoperancia funcional se instaura de manera progresiva, se acompaña de inutilización progresiva de las nefronas y se expresa mediante una disminución lenta y progresiva de la TFG (Barrera, 2007; Senior, 2005). Como consecuencia de la inespecificidad de los signos clínicos que muestran los animales con IRC, el diagnóstico laboratorial se manifiesta como una herramienta fundamental para el diagnóstico y control de la enfermedad, ya que los hallazgos laboratoriales suelen ser el resultado del fallo en los mecanismos de excreción renal (Barrera, 2007). En consecuencia, el sitio del veterinario en el

tratamiento de esta enfermedad se dirige a detectarla temprano y disminuir la progresión de la afección (Krawiec y Itkin, 1997).

La insuficiencia renal puede diagnosticarse por métodos cualitativos y cuantitativos. Los primeros identifican la enfermedad pero describen mal la magnitud de la disfunción. El diagnóstico cualitativo de insuficiencia renal primaria se basa en detectar azotemia aunada a la incapacidad para concentrar orina. En muchos casos, esta valoración cualitativa es el punto final del proceso diagnóstico y el inicio del terapéutico. En ciertos casos, es importante seguir más el caso desde el punto de vista diagnóstico mediante una valoración cuantitativa de la función renal (Krawiec y Itkin, 1997).

Actualmente en medicina veterinaria, el funcionamiento renal en los perros se valora usualmente por la medición de la urea y la creatinina en suero que es un reflejo crudo de la TFG, así como la densidad urinaria. Uno de los problemas más persistentes con la valoración de la función renal es la baja sensibilidad diagnostica de los parámetros tradicionales de laboratorio de la función renal ya que la creatinina sérica, uno de los analitos más usados, solamente se incrementa después que se ha perdido más del 75% de la masa renal y además la urea es afectada por condiciones extrarenales como la dieta, la función hepática y flora bacteriana intestinal (Reyers, 2003). Usualmente las pruebas clínicas usadas en veterinaria para la valoración de la función renal sólo permiten el diagnóstico de la enfermedad cuando se ha perdido más del 60% de la masa renal funcional (Polzin, 2007).

La base de la formación de la orina es la ultrafiltración del plasma en el glomérulo. La medición de la magnitud de esta filtración por lo tanto es generalmente aceptada como el mejor índice general de la función renal (Levey, 1989). La TFG no se puede ser medida directamente pero es certeramente estimada usando el aclaramiento de un marcador del filtrado. Los nefrólogos continúan argumentando sobre el problema de cómo cuantificar el daño renal. A pesar de existir un

incremento adaptativo de la filtración por glomérulo en los riñones, la medición de la TFG continúa siendo el único índice cuantitativo de la función renal (Aurell, 1994). La determinación de la TFG es considerado en general como el parámetro más importante de la cuantificación de la función renal (Frennby *et al.,* 1996), otras funciones del riñón como la producción de eritropoyetina, activación de la vitamina D y el transporte de iones y solutos también se reducen cuando disminuye la TFG (Schwartz y Furth, 2007).

La medición de la TFG es crítica en el manejo de los pacientes enfermos. La cuantificación rigurosa de la TFG requiere de pruebas de aclaramiento renal. La prueba de aclaramiento con la inulina es considerada la prueba "estándar de oro" (Rose, 1985), sin embargo, este método clásico de aclaramiento no es accesible universalmente, la inulina se vende como compuesto de grado analítico pero no garantiza la esterilidad (Kerl y Cook, 2005), requiere infusión intravenosa y la recolección completa de orina, lo que la hace una técnica tediosa, además requiere un análisis químico complejo, del que no disponen la mayor parte de los laboratorios, haciendo difícil el procesamiento central de muestras (Hall y Rolin, 1995), por lo que no es práctico su uso en la clínica ni en los estudios de investigación (Barbour *et al.*, 1975).

Como consecuencia, nuevos marcadores alternativos y métodos de aclaramiento se han desarrollado y validado (Gaspari *et al.,* 1991). En este trabajo se planteo el desarrollo de un método sencillo de Electroforesis Capilar de Zona (ECZ) para usar tres marcadores radiográficos como alternativas para la determinación de la TFG por aclaramiento renal en perros.

I MARCO TEORICO

I.1 FUNCIONAMIENTO RENAL

El 70% del organismo es agua y a pesar de esta proporción “constante” en condiciones normales son muchos los mecanismos que intervienen en su regulación. Uno de estos es el riñón, que posee una gran área de filtrado glomerular que le permite regular la cantidad de diversos solventes y solutos excretados por la orina (Frandson y Spurgeon, 1995).

Los riñones en el perro son uniformes, tienen aproximadamente el mismo tamaño, y representan aproximadamente el 0.5% del peso corporal (Osborne y Fletcher, 1995). Sin embargo, reciben del 20 al 25% del gasto cardiaco para filtrar el plasma y los constituyentes plasmáticos de la sangre, posteriormente son reabsorbidas de manera selectiva el agua y las sustancias útiles del filtrado y se excretan finalmente el exceso de agua y los productos de desecho del plasma (Frandson y Spurgeon, 1995).

Además de la producción y liberación de hormonas por el riñón que juegan una función vital en el control de la presión sanguínea sistémica, regulación del fósforo y calcio en el organismo, y en la producción de glóbulos rojos. Esta diversidad de funciones renales ayudan a mantener la homeostasis del cuerpo (Cunninghan, 2005).

I.1.1 Unidad funcional: el nefrón

La unidad anatómica y funcional del riñón es el nefrón (Alanís, 1988), que está compuesto del corpúsculo renal y de túbulo contorneado proximal, asa de Henle y túbulo contorneado distal, continuado por el túbulo colector (Steven y Lowe, 1998). Se estima que en cada riñón en el perro existen un total de 400, 000 nefrones, en el gato 200,000 y 1,000, 0000 en el hombre (Steinhausen *et al.*, 1990).

I.1.2 Irrigación en el glomérulo

El corpúsculo renal está compuesto por el glomérulo y cápsula de Bowman (cápsula glomerular), todos los glomérulos son localizados en la parte cortical del riñón (Frandson y Spurgeon, 1995; Burkitt *et al*., 1993). El glomérulo es una red de capilares anastomosados que se encuentran suspendidos dentro de la cápsula de Bowman. La sangre llega en el glomérulo por la arteriola aferente. La ultrafiltración de la sangre se realiza al nivel de la red capilar glomerular y el ultrafiltrado avanza del espacio de Bowman para después ingresar al sistema tubular. La sangre abandona posteriormente el glomérulo por la arteriola eferente para irrigar el sistema tubular (Banks, 1993). La arteriola eferente es de un diámetro más pequeño que la arteriola aferente. Así permite el mantenimiento de un gradiente de presión que interviene en la filtración del plasma (Burkitt *et al*., 1993).

El glomérulo es un sistema de filtración por alta presión, compuesto de una red capilar especializada, que genera un ultrafiltrado libre de sangre y con cantidades no significativas de proteínas sanguíneas. El daño renal o alteraciones en la función glomerular afectan la habilidad renal para remover metabolitos de la sangre hacia la orina (Lulich y Osborne, 1990).

I.1.3 Fisiología de la filtración glomerular

El volumen del flujo sanguíneo que recibe el riñón excede las necesidades requeridas por el parénquima renal de oxígeno. Este flujo facilita la filtración de la sangre y resulta en la eliminación de muchos metabolitos de desecho del cuerpo (Guyton y Hall, 2000).

La pared del capilar glomerular está constituida por tres capas: el endotelio capilar fenestrado, la membrana basal glomerular (MBG) y las células epiteliales (podocitos) que se encuentran unidos a la MBG por procesos podálicos discretos. La MBG es derivada del material producido por las células epiteliales y endoteliales, incluyendo colágeno IV, laminina, nidogen, y proteoglicanos de heparan sulfato. La laminina y nidogen forman uniones apretadas que facilitan la

adhesión celular. El proteoglicano de heparan sulfato pueden contribuir a la barrera de carga eléctrica en la filtración de macromoléculas aniónicas (Schwartz y Furth, 2007).

Una de las principales funciones del glomérulo es permitir la filtración de moléculas pequeñas, como el sodio, urea y agua, mientras restringe el paso de de moléculas grandes. Esto permite al riñón mantener la homeostasis por la excreción de desechos nitrogenados derivados de la dieta, mientras se preservan las moléculas proteicas esenciales mayores del plasma (Schwartz y Furth, 2007). El paso potencial de una sustancia a través de la barrera de filtración glomerular (del plasma al ultrafiltrado) en individuos sanos depende de: a) el tamaño molecular: cerca del 100% de las moléculas con radio <2.5 nm la atravesarán. Casi ninguna molécula con radio >3.4 nm la pasará; b) La carga eléctrica: sustancias cargadas positivamente y eléctricamente neutras pasan la barrera mejor que las sustancias con cargas negativas debido a que la membrana basal contiene moléculas cargadas negativamente (Stockham y Scott, 2008), moléculas más cationicas son más permeables, y c) la presión capilar (Mc Gavin y Zachary, 2007).

Los solutos de un tamaño menor de la inulina (PM 5 200) son libremente filtrados, mientras que la mioglobina (PM 17 000) son filtrados menos completamente que la inulina, y la albumina (PM 69 000) es filtrada solo en menor grado. La filtración está también limitada para iones o fármacos que se encuentre unidas a proteínas (Schwartz y Furth, 2007).

La TFG está influenciada por los factores de la tasa de filtración individual de cada nefrón, también referida como la TFG de un nefrón individual (TFGNI) y la suma del número de nefrones filtrando. La sangre ingresa por la arteriola aferente en el lecho capilar (enramillado capilar) del glomérulo y sale por la arteriola eferente. A lo largo del enramillado capilar glomerular una porción del plasma es ultrafiltrado hacia el espacio de Bowman, el cual, después de ser procesado en los túbulos

renales y ductos colectores, origina la formación de la orina (Schwartz y Furth, 2007).

La filtración glomerular depende de varios factores, los tres más importantes son:

- La presión hidrostática de la sangre dentro del capilar que es elevada en las arteriolas (fenómeno pasivo).
- La presión oncótica del fluido en el espacio Bowman (en el ultrafiltrado). Esta suele ser insignificante, ya que las proteínas de alto y medio peso molecular no se filtran (Cunninghan, 2005).
- La naturaleza misma del filtrado (morfología y permeabilidad) (Finco *et al.*, 1999).

Las constantes de permeabilidad de la pared dependen de dos factores:

- La superficie: que puede ser modificada por la contracción de células mesangiales. Contienen actina que es capaz de contraerse en respuesta a la angiotensina II y a la hormona antidiurética (ADH). Las contracciones provocan entonces una disminución de la superficie y, por consiguiente, una disminución de la filtración glomerular. Ciertas patologías pueden provocar una obliteración de los glomérulos, y así disminuir la superficie de contacto.
- El porocito: factor que es experimentalmente difícil de diferenciar de la superficie (Finco, 1995).

Además de determinar la permeabilidad hídrica de la barrera de filtración, las características estructurales y químicas de la pared capilar glomerular establecen también su permeabilidad selectiva (Cunninghan, 2005).

El flujo de líquido a través del glomérulo es gobernado por las fuerzas de Starling, siendo proporcional a la permeabilidad de la pared capilar glomerular y al balance entre las presiones hidrostáticas y oncóticas (Schwartz y Furth, 2007).

Las fuerzas responsables de la filtración son las siguientes:

- La presión hidrostática en la luz del capilar, es la fuerza de entrada del fluido a través de la capsula de Bowman, este pasaje está ligado directamente a la presión en la arteriola aferente.
- La presión oncótica en la capsula de Bowman potencializa la filtración. Pero da el hecho de una concentración en proteína débil (1 a 100 mg/L) Esta no es considerada como un factor mayor de filtración (Guyton y Hall, 2000).

Las mayores fuerzas opuestas a la filtración son:

- La presión oncótica dentro del capilar glomerular (Cunninghan, 2005). La concentración en proteínas es más importante en el plasma que en la ultrafiltración. Esta concentración en proteínas se opone a la filtración, ya que el movimiento de los fluidos tiene que permitir un equilibrio de las concentraciones (Guyton y Hall, 2000).
- La presión hidrostática en el espacio Bowman (Cunninghan, 2005).

La diferencia entre las fuerzas opuestas en cuestión provocan una presión de filtración, comprendida entre 6 y 14 mmHg (Guyton y Hall, 2000). El filtrado glomerular es un mecanismo muy eficaz que permite para un perro de 25 kg el filtrar 60 a 80 litros por día, sea una filtración glomerular de 2 a 4 mL/kg/min (Frandson y Spugeon, 1995).

Así la naturaleza de la orina primitiva es a poco grados equivalentes aquella del plasma salvo las proteínas de PM superior 68 kDa que no difunden, las proteínas de PM inferior a 68 kDa y no ligadas a las proteínas plasmáticas (la fracción libre) son filtradas (Guyton y Hall, 2000).

I. 2 PATOFISIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD RENAL

Debido a que el tejido renal tiene limitadas vías de respuesta a las enfermedades que sufre, los patrones de lesiones y su evolución que inicialmente pudieron ser distintivos en enfermedades severas y prolongadas suelen terminar en un punto terminal similar de enfermedad e insuficiencia renal crónica (Mc Gavin y Zachary, 2007). La causa primaria responsable del comienzo del proceso de daño renal (que puede ser congénita, familiar o adquirida) está frecuentemente ausente o es irreconocible cuando se realiza el diagnóstico de la enfermedad renal crónica (Barrera, 2007).

El daño renal inicia con la pérdida de nefrones funcionales desarrollándose atrofia y fibrosis en los glomérulos, túbulos renales o tejido peritubular. Los cambios funcionales incluyen la disminución del flujo sanguíneo renal, disminución de la TFG y reducción de la capacidad para concentrar la orina. La patogénesis de los procesos siempre presentan la misma progresión: a) en las fase inicial del daño renal, se observa hipertrofia de estos nefrones con incremento en la tasa de filtración por los nefrones funcionales remanentes para mantener la homeostasis del organismo; esta fase de enfermedad es caracterizada por la pérdida hasta del 67% de la función renal antes de manifestar signos clínicos en los pacientes; b) es posible observar un incremento de la presión intraglomerular y desarrollo de esclerosis en los nefrones remanentes; la pérdida de de tejido renal continúa resultando en un desbalance y la presentación de signos digestivos y urinarios en los pacientes, que se pueden tornar muy severos; c) Con la pérdida del 67 al 75% de la tasa de filtración se presenta poliuria y polidipsia severas, cando la falla se incrementa (de 75 a 90% de pérdida de la masa renal) la acumulación en sangre de productos nitrogenados del catabolismo determinan la manifestación de signos sistémicos como anorexia, pérdida de peso y apatía, así como signos específicos como vómito y diarrea; d) Cuando la función renal residual es menos del 10% la uremia está presente, se asocia con signos neurológicos (encefalopatía urémica) que indica el estado terminal de la enfermedad (Polzin *et al.*, 2000).

La detección temprana de la falla renal y la aplicación subsecuente de un tratamiento adecuado puede prevenir la progresión a estados más severos de insuficiencia renal previniendo morbilidad y mortalidad, así como los costos que implican (Hoste *et al.*, 2005). La modificación de la dieta ha sido una estrategia efectiva en el manejo clínico de perros con enfermedades renales crónicas (Pugliese *et al.*, 2005;).

I.3 PRUEBAS DE VALORACIÓN DE LA FUNCIÓN RENAL

I. 3.1 Pruebas indirectas de la función renal

Los métodos de rutina para valorar la función renal han permanecido sin cambios por muchos años (MacGregor *et al.*, 2006) y la determinación de la creatinina en suero permanece como la prueba de laboratorio más comúnmente usada para valorar la función renal (Van Lente y Sult, 1989).

Las pruebas para la valoración de la función renal que son usadas actualmente en la Medicina Veterinaria son la medición de creatinina y urea en sangre que reflejan la TFG. Cuando estos valores de urea y creatinina se observan elevados (azotemia) recurrentemente por un periodo de tres meses junto con la densidad urinaria menor a 1.030 se diagnostica insuficiencia renal en el perro (Polzin, 2007). Estos analitos son el reflejo crudo de la TFG y son usados como marcadores del deterioro de la función renal (Brown *et al.,* 2006). Sin embargo, estas pruebas tienen la limitación de ser poco específicas y no permiten establecer un diagnóstico temprano del daño renal (Polzin *et al.*, 2007).

La enfermedad renal crónica se acompaña de una daño renal continuo caracterizado por la disminución de la TFG (Schwartz y Furth, 2007). La concentración plasmática de creatinina es de fácil acceso pero es un indicador menos sensible que la determinación TFG (Aurrel, 1994), por lo tanto, la medición de creatinina en plasma no es un reflejo exacto de la TFG (Shemesh *et al.*, 1985).

Durante la fase silenciosa clínica temprana de la IRC, encaminando al punto donde la TFG es reducida a 25-30% de lo normal, los riñones pasan por una serie de adaptaciones funcionales y anatómicas (Senior, 2005).

I.3.2 Creatinina y nitrógeno ureico en sangre

La medición de la urea y creatinina en sangre han sido usados como los analitos convencionales para estimar la TFG (Chew y DiBartola, 2007).

Las células musculares toman la creatina producida por el hígado, donde cambia en forma irreversible a creatinina. La creatinina es excretada por filtración glomerular en perros y gatos, y también en una pequeña cantidad por secreción del túbulo proximal en perros. La producción de creatinina puede alterarse por la cantidad de masa muscular, y así presentar diferencias entre géneros, edad, y raza que alteran la concentración de creatinina en plasma. Sin embargo, esto es poco tomado en cuenta en medicina veterinaria. Los normogramas para determinar los intervalos normales de la concentración de creatinina en plasma en personas consideran otros factores. La presencia de cromógenos no creatinínicos en el plasma de perros y gatos normales complican la interpretación de las concentraciones de creatinina en plasma, particularmente con incrementos moderados (Brown, 2003).

Es conocido que el monitoreo de la creatinina sérica es una prueba relativamente limitada para detectar disfunción renal, si se considera los efectos que tienen sobre sus valores la dieta, consumo de carne, metabolismo endógeno, y las rutas extrarenales de excreción (Giudice *et al.*, 2008).

Las estimaciones de la TFG basadas en la medición de creatinina (aclaramiento de creatinina, creatinina sérica, y sus reciprocas) han mostrado una imprecisión significativa por la secreción tubular altamente variable de la creatinina, la cual está influenciada por los efectos de la dieta, medicación, y presión sanguínea (Hall y Rolin, 1995).

La creatinina en suero es usualmente medida por un método colorímetro cinético de picrato alcalino (basado en la reacción de Jaffé), y menos comúnmente por el método enzimático. El método de picrato alcalino es sujeto a la interferencia de otros cromógenos incluyendo cetonas y glucosa, dando valores artificialmente elevados de la creatinina sérica. Otras sustancias que interfieren como la bilirrubina y pueden causar una valores menores de la creatinina sérica (MacGregor *et al.*, 2006).

El intervalo de valores de creatinina en sangre es amplio en perros o gatos cuando se consideran grupos de animales, pero es mucho más estrecho para un animal en lo individual. El grupo IRIS (International Renal Interest Society, 2006) ha recomendado que el límite superior normal para la creatinina en perro sea menor de 1.6 mg/dL. Estos valores superiores son sustancialmente menores que los valores de referencia proporcionados por la mayoría de los laboratorios comerciales. Cuando estos valores son usados, más animales con enfermedad renal pueden ser detectados pero también animales algunos animales normales pueden ser incluidos en este grupo basados únicamente en los valores de la creatinina sérica. Con el incremento de la atención en el bienestar y evaluación de los animales geriátricos, variaciones individuales en la creatinina sérica se pueden detectar si el mismo laboratorio es usado para hacer las determinaciones de los valores de la creatinina. El análisis de la concentración de creatinina sérica en un mismo laboratorio ofrece resultados muy constantes, al contrario de cuando se hace la medición en diversos laboratorios. El incremento secuencial de la creatinina sérica aun dentro de los rangos normales pueden sugerir la pérdida progresiva de masa renal (Chew y DiBartola, 2007).

La creatinina, aunque no es influenciada significativamente por la dieta, es aun menos sensitiva en pacientes con reducción de la masa muscular como la observada en pacientes emaciados o caquéxicos, pero solamente se incrementa después de que se ha perdido el 75% de la masa renal funcional (Chew y DiBartola, 2007; Reyers, 2003).

La urea es el producto del ciclo hepático, que inicia con el metabolismo de los aminoácidos y excreción de nitrógeno. La urea es pasivamente filtrada a través del glomérulo renal. Debido a que algunos segmentos del epitelio tubular son permeables a la urea, la urea puede salir o entrar del fluido tubular, reciclándose pasivamente durante el proceso de concentración de la orina. Por lo tanto, el nitrógeno ureico en sangre (NUS) no solo refleja la TFG sino también la producción de urea por el hígado y la tasa de flujo de fluido tubular. Por lo tanto, la ingestión de alimentos ricos en proteínas, hemorragia gastrointestinal, la presencia de un estado catabólico, y la deshidratación pueden elevar el NUS aun sin cambios en la TFG. En contraste, la insuficiencia hepática, dietas pobres en proteínas, estados anabólicos, y poliuria tienden a disminuir los niveles del NUS independiente de los cambios en la TFG. Estos importantes factores extrarenales complican la interpretación de los valores del NUS (Brown, 2003).

La observación de cambios en la capacidad de concentración urinaria máxima puede dar pistas de que la masa de nefrones está disminuyendo. La habilidad para concentrar al máximo la orina se va perdiendo progresivamente a partir del daño de más del 50% de la masa renal hasta presentar valores de isostenuria (densidad urinaria de 1.007 a 1.017) que se registran cuando el 67% o más de la masa renal está dañada (Chew y DiBartola, 2007). En perros, la capacidad de concentrar la orina se observa cuando aproximadamente 66% de la masa renal funcional se ha perdido (DiBartola, 2000).

I. 3.3 Pruebas directas de la función renal

En estas pruebas se evalúa la función a través de la estimación de la TFG.

I.4 TASA DE FILTRADO GLOMERULAR

La TFG representa el volumen de plasma ultrafiltrado presentado a los nefrones por unidad de tiempo en el proceso de formación de orina (Schwartz y Furth, 2007). La medición de la TFG se realiza indirectamente midiendo la tasa de

excreción urinaria de algún compuesto endógeno o exógeno que sea libremente filtrado en el glomérulo renal y que cumpla con las características de un marcador para este propósito (Barbour *et al.*, 1975), se ha definido como el volumen de plasma que puede ser completamente aclarado (limpiado) de una sustancia en particular por los riñones en una unidad de tiempo (Heymsfield *et al*., 1983).

La TFG es considerada el mejor índice para evaluar la función renal en sujetos sanos y enfermos. Esta medición es usada para estimar la efectividad de los tratamientos que se aplican para disminuir el avance de la enfermedad renal o valorar la condición de riñones trasplantados (Rose, 1985). La evaluación exacta del flujo sanguíneo renal y la TFG son también necesarios para ayudar a los fisiólogos y farmacólogos para interpretar los datos clínicos y experimentales (Boschi y Marchesini, 1981), y es superior a las mediciones en plasma de creatinina y la cistatina C y otras pruebas sencillas de la función renal (Bexfield *et al.*, 2008). Hjorth *et al.* (2002) concluyeron que en niños la determinación de la creatinina y la cistatina C plasmáticas, así como formulas basadas en la altura del paciente y la creatinina en sangre proporcionan datos imprecisos de la TFG. La TFG se reduce antes de la presentación de signos y síntomas de la falla renal, relacionándose con la severidad de las anormalidades estructurales en la enfermedad renal crónica (Nankivell, 2001).

I.4.1 Antecedentes de la determinación de la TFG

Rehberg en 1926, propuso que el aclaramiento podía ser usado para medir algunas funciones renales, tal como la tasa de filtración glomerular y analizar mecanismos excretorios para sustancias específicas como la urea. Reconoció que el aclaramiento de una sustancia que es libremente filtrada y no está sujeta ni a secreción ni a reabsorción tubular puede ser usada para medir la tasa de filtración glomerular (Torres, 1988). Rehberg aplicó la fórmula clásica:

$$TFG = \frac{U \times V}{P} \qquad (1)$$

donde U es la concentración del marcador en la orina (mg/mL), V es la tasa de flujo de orina (mL/min) y P es la concentración en el plasma del marcador (mg/mL) (Frennby y Sterner, 2002). Pero a Homer Smith, Jefe del Departamento de Fisiología de la Universidad de New York, realmente le corresponde el mérito de reconocer y utilizar el tremendo potencial del concepto de aclaramiento para medir cuantitativamente muchos parámetros de la función renal; fue por el año de 1937, gracias a la aplicación de esta técnica pudo medir la tasa de filtración glomerular empleando la inulina, un carbohidrato que se comprobó que sólo es excretada por filtración glomerular (Torres, 1988).

I.4.2 Indicaciones de la medición de la TFG

La TFG es el indicador más importante de la función renal y es de crucial importancia en el paciente con enfermedad renal crónica (Schwartz *et al.*, 2006). La medición de la TFG es de mucho valor en varias circunstancias como la detección temprana de daño renal, para dosificar correctamente fármacos que son eliminadas vía renal, monitorear pacientes donadores y receptores de trasplantes renales evaluar a los pacientes que recibirán terapia o agentes radiográficos potencialmente nefrotóxicos (Gaspari *et al.,* 1997b; Hoste *et al.*, 2005; Schwartz y Furth, 2007).

Clínicamente la medición de la TFG aparte del monitorear la función renal en pacientes con enfermedades nefro-urológicas, está indicada en pacientes con cáncer para predecir la toxicidad de fármacos contra el cáncer excretadas por vía renal, aunque no son nefrotóxicas, son tóxicas para otros órganos, en especial la medula ósea, y en pacientes con enfermedades que son tratadas efectivamente por medicamentos, los cuales no son excretados principalmente a través de los riñones, y sin embargo son nefrotóxicos, por ejemplo la ciclosporina en el tratamiento de la psoroasis y fármacos con platino usadas en el tratamiento de algunos tipos de cáncer (Peters, 2003).

La estimación de la TFG es ampliamente usado en la investigación pero también puede ser muy útil en la clínica en los paciente con signos vagos y que presenten

elevaciones moderadas de la concentración plasmática de creatinina, la TFG puede indicar cuando están enfermos o no. La estimación de la TFG ayuda a identificar enfermedades intrínsecas renales de una lista de diagnósticos diferenciales en pacientes no azotémicos con poliuria, proteinuria, o hematuria. La determinación exacta puede facilitar la decisión de pronóstico en pacientes con una enfermedad renal establecida. La medición de la TFG facilita el ajuste correcto de la dosis en pacientes viejos o críticos y en situaciones de monitoreo de fármacos terapéuticas (Heiene y Moe, 1998).

Las indicaciones para la medición precisa de la TFG en medicina veterinaria son muy amplias. Se incluye la búsqueda de enfermedad en animales con poliuria no azotemicos o incrementos moderados de la concentración plasmática de creatinina, monitoreo en razas con predisposición a una enfermedad renal familiar, monitoreo pre quirúrgico o posterior a un tratamiento, para guiar la dosificación cuando se emplean fármacos que tengan eliminación por vía renal y para evaluar los efectos de la dieta u otras intervenciones terapéuticas sobre la función renal. La medición secuencial de la TFG también provee información útil sobre las alteraciones de la función renal con el paso del tiempo (Bexfield *et al*., 2008).

I. 4.3 Factores que influyen en la TFG

El rango normal de TFG varía de acuerdo a la masa renal y consecuentemente a la masa corporal. Sin embargo, en adición a la edad, existen un gran número de condiciones fisiológicas y patológicas que pueden afectar la TFG, incluyendo la gestación, hipertensión, medicación y enfermedad renal (Nankivell, 2001). En el perro la TFG puede ser influenciada por varios factores no renales como el consumo de proteína, estado de hidratación, balance del sodio, género, edad, y la raza, como también la variación circadiana en el error individual. Por lo tanto el rango de valores de referencia en animales sanos es amplio (Levey, 1989; Izzat y Rosborough, 1989).

Los estudios de aclaramiento deben realizarse durante un periodo hemodinámico estable. El aclaramiento total corporal es la suma de todos los procesos de eliminación del cuerpo, principalmente aclaramiento renal y hepático. La eliminación a través de la saliva, sudor, y de otras rutas es comúnmente insignificante. El aclaramiento plasmático refleja el aclaramiento total corporal. El aclaramiento renal equivale al aclaramiento plasmático y al aclaramiento corporal total si la sustancia marcadora es excretada únicamente a través del riñón (Heiene y Moe, 1998).

I.4. 4 Aclaramiento renal

El término aclaramiento renal o aclaramiento urinario es usado para describir el cálculo de aclaramiento usando ambos datos de plasma y orina. El aclaramiento renal mide la cantidad de marcador actualmente excretado en la orina y deben realizarse después que se ha obtenido una distribución completa de la sustancia en los tejidos corporales, en donde el radio de distribución de la droga en el tejido:plasma es constante.

El aclaramiento renal es calculado por la fórmula:

$$Cl_{renal} = \frac{U \times Cu}{Cp} \qquad (2)$$

donde U= flujo de orina en mL/min, C_u=concentración del marcador en la orina en mg/mL, y C_p= concentración del marcador en el plasma en mg/mL. La aproximación exacta es proporcionada si la colección de orina es completa.

En la práctica, es comúnmente difícil asegurarse que se vació completamente la vejiga después de la colección urinaria, y el vaciamiento incompleto de la vejiga provocará la subestimación de la TFG. Además la colocación de un catéter vesical es un factor de riesgo para el desarrollo de infección (Heiene y Moe, 1998).

TABLA 1. Valores reportados de la tasa de filtrado en perros con función renal normal por varios métodos.

Método	X ± s	Unidades	Referencia
Aclaramiento de inulina en orina	3.55 ±0.14	mL/min/kg	Fenman *et al.,* 1985
Aclaramiento de creatinina endógena en orina	3.77±0.77	mL/min/kg	Bovée y Joyce, 1979
Aclaramiento de creatinina exógena en orina	3.45±0.7	mL/min/kg	Watson *et al.*, 2002
Aclaramiento de creatinina exógena en plasma	3.0±0.52	mL/min/kg	Labato y Ross, 1991
Aclaramiento de iohexol en plasma	2.22±0.86	mL/min/kg	Brown *et al.*, 1996
Aclaramiento plasmático de iohexol	2.91±0.60	mL/min/kg	Goy-Thollot *et al.*, 2006
Aclaramiento plasmático de iohexol	2.4±0.55	mL/min/kg	Bexfield *et al.*, 2008
Aclaramiento plasmático de iohexol	4.1±0.5	mL/min/kg	Laroute *et al.*, 2005
Aclaramiento plamático de iotalamato	3.1 ± 0.39	mL/min/kg	Mourou, 2002
TC-99m-DTPA- centelleo renal	2.56± 0.99	mL/min/kg	Moe y Heiene, 1995
Aclaramiento plasmático de iohexol	80.5±15.5	mL/min/m^2	Goy-Thollot *et al.*, 2006
Aclaramiento de creatinina endógena en orina	57.6±9.3	mL/min/m^2	Bovée y Joyce, 1979
Aclaramiento plasmático de iohexol	39-84	mL/min/m^2	Moe y Heiene, 1995
Aclaramiento plasmático de ^{131}I-iotalamato	41-106	mL/min/m^2	Moe y Heiene, 1995

Con el método tradicional de inulina, el aclaramiento renal es comúnmente medido a una concentración sanguínea relativamente constante durante la infusión intravenosa continua de un marcador, pero el aclaramiento renal puede ser también ser medido después de la inyección única, cuando la distribución es completa (Pihl, 1974; Pihl y Nosslin, 1974; Florijn *et al.*, 1994).

El aclaramiento de una sustancia en un compartimiento es definido como el radio entre la tasa de eliminación de la sustancia (mg/min) de ese compartimiento y la concentración de la sustancia (mg/mL) en el mismo compartimiento. El aclaramiento de un marcador de la TFG es un valor abstracto calculado que se expresa en mL por m^2 o por kilogramo de peso corporal (Frennby y Sterner, 2002).

En la práctica veterinaria no existe un método perfecto para determinar la TFG (Heiene y Moe, 1998). La ventaja cuando se colecta orina para determinar la TFG es que la ecuación (ecuación 5) que se expresa en mL/kg/min es fácilmente calculada y entendida (Kerl y Cook, 2005). En la tabla 1 se presentan valores reportados de la TFG.

I.4.5 Características de los marcadores de la TFG

Las características que debe tener un marcador de filtración ideal son:

- Que no altere la permeabilidad capilar glomerular durante la filtración glomerular
- No se una a los glóbulos rojos o a las proteínas plasmáticas en la circulación
- No exista escape extrarenal (a menos que sea completamente reversible, como en el líquido del espacio intersticial)
- No exista secreción tubular (aun que si bien se ha probado que el indicador es completamente retenido en el epitelio tubular, la reabsorción tubular es teóricamente permitida si el aclaramiento plasmático está siendo medido)
- Que no exista difusión a través de la membrana tubular siguiendo la filtración (la cual ocurre si existe necrosis tubular extrema, pero también a bajas tasas en otras formas clínicas menos obvias de daño tubular, como en la nefrotoxicidad por ciclosporinas) (Peters, 2003).

Además, un marcador de la filtración atraviesa libremente la membrana glomerular, y no es reabsorbido o metabolizado por los túbulos renales. Las sustancias que han sido usadas como marcadores del filtrado glomerular son: A) polisacáridos como la inulina; B) quelatos solubles radioactivos como ^{51}Cr-Etilendiaminotetracetico (EDTA), ^{99}Tc- Dietillenetriaminepentacetico (DTPA) y quelantes no radioactivos como el Gd-DTPA; C) medios de contraste radioactivos como el ^{131}I-iotalamato; y D) medios de contraste urológicos no radioactivos como los monómeros iónicos (p. ej.: metrizoato, diatrizoato, iotalamato), y los monómero no iónicos (p. ej.: iohexol, iopamidol, iopromida) (Frennby y Sterner, 2002).

I.4.6 Influencia de las propiedades del marcador

La mayoría de los protocolos usados en la determinación plasmática o renal se basan en asumir que la distribución de la droga es completa dentro de la primeras 1 a 2 horas posteriores a la aplicación del marcador. La mayoría de los muestreos del aclaramiento renal se inician después de un periodo en un intento de muestrear cuando la distribución del marcador es completa. Sin embargo, las propiedades de los marcadores generalmente no son conocidas completamente (Heiene y Moe, 1998).

Se espera que un marcador usado para determinar la TFG no sea tóxico para el paciente. Un método común para estimar la TFG utiliza a la creatinina endógena como marcador. La TFG es por lo tanto evaluada a partir de la concentración en plasma de la creatinina sola o del aclaramiento renal, calculado como el radio entre la tasa de excreción de creatinina en orina y la concentración de creatinina en plasma. La medición de la creatinina sérica sola o la medición del aclaramiento renal de la creatinina puede sobre estimar la “TFG verdadera” en un 50 a 100% si se compara con un marcador exógeno, esto se ha relacionado a la secreción en los túbulos renales y posible reabsorción en varias especies, por lo que el uso de creatinina únicamente como marcador para la determinación de la TFG en

pacientes con enfermedad glomerular no es justificable en situaciones de investigación y es poco deseable en muchas situaciones clínicas (Shemesh *et al.*, 1985).

Ha existido un incremento en el uso de medios de contraste no radioactivos como marcadores en la medición de la TFG. El iohexol, un monómero no iónico ha venido siendo uno de los marcadores de la TFG más comúnmente usado en Europa. Se asume que otros monómeros no iónicos, como el iobitridol, iomeprol, iopamidol, ioversol y el iopromide, son igualmente efectivos como marcadores de la TFG debido a sus características farmacocinéticas similares (Frennby y Sterner, 2002).

I.4.7 Reacciones secundarias de los marcadores iodados

La nefrotoxicidad es un efecto adverso bien conocido de los medios de contraste radiográficos (MCR), aun cuando su incidencia es baja (2%) en la población general (Goldfarb *et al.*, 2009). La patogénesis de la nefrotoxicidad inducida por MCR no está completamente entendida, a pesar de la superioridad de los MCR no iónicos sobre los MCR iónicos considerando la nefrotoxicidad demostrada en varios modelos experimentales. La vasoconstricción, resultante en hipoxia medular renal, y la toxicidad en el epitelio celular tubular son considerados como los factores primarios responsables de la nefrotoxicidad por MCR (Uozumi *et al.*, 2001).

En personas, las mediciones de aclaramiento por cromatológráfia lquída de alta resolución requieren la administración IV lenta de 5 a 20 mL de iohexol que contiene 300 mg de yodo/mL. Esto contrasta con los 50 a 100 mL de iohexol que se aplican IV rápido en los estudios radiográficos. Estas diferencias en volumen y velocidad de aplicación pueden explicar el porqué actualmente no se reportan reacciones adversas al iohexol en estudios de aclaramiento. Obviamente los medios iodados deben ser evitados en pacientes con reacciones conocidas a los medios de contraste radiográficos (Aurell, 1994).

I.4.8 Elección de una técnica de aclaramiento

Las diferentes técnicas de aclaramiento varían con la aplicación y el muestreo de los marcadores exógenos de la TFG. Cada técnica de aclaramiento presenta ventajas como también desventajas. El método clásico de aclaramiento para determinar la TFG es la eliminación renal con inulina, incluyendo la infusión intravenosa del marcador para conseguir una concentración plasmática constante del marcador, seguida de del muestreo múltiple y colección temporal de la orina por un catéter intravesical. Esta técnica elimina el problema del equilibrio entre diferentes compartimientos corporales. El tiempo requerido para administración por infusión continúa de la inulina y el análisis químico laborioso de la concentración de la inulina en el plasma y la orina hacen al aclaramiento de inulina caro e impráctico en la práctica clínica diaria. Para evitar la aplicación de infusiones intravenosas, el marcador de TFG puede ser aplicado IV en bolo (dosis única) (Frennby y Sterner, 2002).

La medición de la creatinina en sangre como marcador único para monitorear la TFG en pacientes con enfermedades glomerulares no es justificable en estudios de investigación y no es óptimo en muchas situaciones clínicas (Walser *et al.,* 1988; Walser *et al.*, 1993). Se ha reportado una baja correlación entre la creatinina plasmática y la TFG en perros (Finco *et al., 1999).* En humanos existen formulas en las que a partir de la cistatina C (Hjorth *et al.*, 2002) y de la creatinina sérica se calcula la TFG en base al peso, altura, edad, genero e inclusive origen étnico del paciente (Hjorth *et al.*, 2002; Imai *et al.*, 2007), pero en perros y gatos no se pueden aplicar por la gran variación de tamaño de las razas existentes (Heiene y Moe, 1998).

El aclaramiento renal como el plasmático puede realizarse después de la aplicación IV en bolo del marcador. La realización del aclaramiento renal es más compleja que el aclaramiento plasmático (aclaramiento corporal), debido a la necesidad de colectar la orina temporalmente y a la colocación de una sonda en la vejiga. Para evitar la cateterización de la vejiga, se puede colectar la orina

evacuada pero esto introduce errores de la orina no colectada o por el vaciado incompleto de la vejiga que se refleja en valores falsos de la TFG (Frennby y Sterner, 2002).

I.4.9 Aclaramiento de inulina

La determinación de la TFG requiere la utilización de una sustancia que sea libremente filtrada por el glomérulo y no sea secretada o absorbida en los túbulos renales (Barbour *et al*., 1975). Desafortunadamente, no hay sustancias endógenas que se puedan usar para la evaluación exacta, y por lo tanto es necesario administrar al paciente un compuesto adecuado para la medición de la TFG y flujo sanguíneo renal (Boschi y Marchesini, 1981). La inulina que es un polisacárido de fructosa, de 5200 Da, ha sido usado como marcador exógeno ideal que ha sido usado como el estándar para comparar otros marcadores de aclaramiento (Gaspari *et al*., 1991; Rose, 1985).

La determinación estándar de aclaramiento de inulina con la infusión intravenosa continúa y recolección de muestras de orina en periodos de tiempo determinados es tedioso, impráctico y especialmente inconveniente para los pacientes (Jung *et al*., 1992), además que en personas con anomalías en el tracto urinario bajo (p. ej. reflujo uretrovesical, uréteres ectópicos), en animales y en niños es difícil colectar la orina en los tiempos precisos siendo necesario sondear a los pacientes (Hellerstein *et al.*, 1993).

La infusión intravenosa de inulina o creatinina en perros para determinar la TFG presenta las desventajas experimentales: a) la infusión de líquidos por periodos prolongados puede alterar el estado normal de la volemia y la función renal, y b) la colocación aguda o crónica de un catéter intravenoso es requerido, con el subsecuente riesgo de infección (Lee *et al*., 1983), además de la posibilidad de que se salga del espacio intravascular, que se obstruya y no se administre la dosis exacta deseada en especial en animales pequeños o pre púberes .

El método de aclaramiento usando a la inulina no es práctico de realizar ni a nivel clínico, ni de investigación por su dificultad de determinar el analito, ya que es costoso y existen pocas casas comerciales que oferten los reactivos necesarios, además de la existencia limitada de laboratorios que procesen la prueba, se requiere infusión intravenosa continua y suele requerir el sonseo vesical del paciente. Como resultado se han desarrollado otros métodos más precisos de aclaramiento y medición de la TFG (Black *et al.*, 1979).

I.4.10 Medición de la TFG con marcadores radioactivos

La inulina y el ácido p-aminohipúrico fueron usados como marcadores para la medición del TFG por muchos años antes de que los marcadores radioactivos fueran accesibles (Boschi y Marchesini, 1981). Los compuestos radioactivos, se usaron como una alternativa de marcadores que ofrecen la medición exacta y precisa de la TFG (Hall y Rolin, 1995).

Los marcadores radioactivos usados para el aclaramiento renal ^{55}Cr-EDTA y el ^{99m}DTPA han mostrado limitaciones, el EDTA radioactivo no han sido aprobados por la Agencia Federal de Drogas de los Estados Unidos de Norteamérica (FDA), y el DTPA radioactivo presenta una vida media limitada y es impráctico si es requerido un centro de procesamiento de las muestras para la medición de la TFG. El método desarrollado que tuvo más aceptación como marcador alternativo de la filtración renal en humanos fue el ^{125}I-Iotalamato (Hall y Rolin, 1995; Gaspari *et al.*, 1991). En perros experimentalmente se ha hecho la medición de la TFG con el ^{125}I-Iotalamato y ^{9m}DTPA, observándose una estrecha correlación con la prueba de infusión de inulina (Barbour *et al*., 1975; Duffee *et al.*, 1990).

Los estudios con compuestos radioactivos tienen las desventajas de la dificultades del manejo seguro para su traslado, el manejo de los desechos y los problemas de administración de material radioactivo a humanos que aumentan los riesgos para los pacientes, es costoso en parte debido al deterioro y vida media limitada de los

radioisótopos, requiere instalaciones más complejas, *licencias* especiales y personal especializado (Bajaj *et al*., 1996).

Además, para la determinación simultánea de la TFG y el flujo sanguíneo renal, es necesaria la aplicación de dos isotopos diferentes y frecuentemente no es fácil distinguirlos entre los dos. Esto motivó el desarrollo del métodos de cromatografía de líquidos de alta resolución con iotalamato y o-iodohipurato no radioactivos, que han sido determinados en plasma y orina de pacientes humanos. Esta técnica tiene la inconveniencia de requerir mucho tiempo de procesamiento y no pueden ser procesadas más que algunas docenas demuestras al día (Boschi y Marchesini, 1981; Gaspari *et al*., 1991; Hall y Rolin, 1995).

También se ha utilizado el análisis de fluorescencia confiable para medir la concentración de medios de contraste no tritiado. Otros investigadores han medido la TFG con medios de contraste no radioactivos, que incluyen el iotalamato y el iohexol por cromatografía liquida de alta resolución. Su aclaramiento renal provee una exactitud similar a aclaramiento con inulina en la medición de la TFG renal en el humano (Gaspari *et al.*, 1998).

I. 4.11 Medición de la TFG con marcadores no radioactivos

Algunos métodos se han descrito en la literatura que describen el procedimiento para la determinación de la concentración de iotalamato de sodio (Boschi y Marchesini, 1981). Meucci *et al.* (2004), realizaron la medición del flujo de plasma renal y TFG en perros con la administración intravenosa de iohexol y ácido p-aminohipurico por cromatografía de líquidos de alta resolución. Estos métodos evitan el uso de radioisótopos pero requieren una labor intensa, por lo tanto, no han sido ampliamente aceptados para su uso de rutina. Otros métodos se han enfocado en la medición de la concentración de iohexol en plasma por fluorescencia de rayos X y estimar el aclaramiento con una o dos muestras de sangre. La técnica con fluorescencia evita los problemas asociados a los radioisótopos pero es menos sensitivo y requiere la aplicación de dosis

relativamente elevadas del fármaco en los sujetos para medir la TFG (Brown *et al.*, 1991).

Experimentalmente Watson *et al.* (2002), compararon en perros con daño renal inducido quirúrgicamente las pruebas de aclaramiento de creatinina endógena en orina en 24 horas, el aclaramiento de creatinina exógena en orina y plasma, el aclaramiento en plasma de iotalamato por cromatografía liquida de alta resolución, y el aclaramiento en orina de ^{14C}-inulina, observándose la disminución de la TFG en forma similar por el aclaramiento de creatinina y de iotalamato en plasma.

Se ha probado el uso de iohexol como medio de aclaramiento con la técnica de cromatografía líquida de alta resolución en sangre en perros (Bexfield *et al.*, 2008). El aclaramiento de una variedad de sustancias, como el iohexol en perros, es determinado por una serie de mediciones de la concentración plasmática de la sustancia indicadora que es técnicamente más fácil que la determinaciones de aclaramiento en orina y puede ser usado para estimar la TFG. Estas técnicas proveen una medición más confiable de la TFG que la determinación de creatinina y urea en plasma, pero son menos confiables que los procedimiento de aclaramiento en los que se muestrea la orina (Brown *et al.*, 2006; Sarkar *et al.*, 2005).

Desde mediados de los años noventas publicaron una prueba nueva, la cistatina C, que es menos dependiente de los factores renales. La cistatina C es un inhibidor de la proteasa de cistatina, producido por las células somáticas y liberado a una tasa relativamente constante y reabsorbido en el túbulo proximal, se ha reportado que tiene menos influencia de factores como la condición corporal y el metabolismo del amoniaco como lo tienen la urea y creatinina plasmática respectivamente. En medicina veterinaria existe experiencia limitada con el uso de la cistatina C, no se ha demostrado una mayor sensibilidad, comparada con la creatinina, o si existe interferencia con la presencia de hemoglobinemia o hiperbilirrubinuria, que interfieren con las determinaciones de la creatinina. Esta prueba podría ser más sensible en la estimación de la TFG, pero son necesarios

mayores estudios que lo prueben (Sarkar *et al.*, 2005; Reyers, 2003; Schwartz y Furth, 2007).

I.5 FUNDAMENTOS DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR

La electroforesis capilar (EC) es una técnica relativamente nueva e inovativa que separa moléculas cargadas o no cargadas en un capilar delgado lleno de solución buffer por la aplicación de un voltaje muy alto. La EC combina la separación selectiva de la electroforesis estándar con la precisión y control de instrumentación de la cromatografía de alta resolución (Stocking *et al*., 1998). La electroforesis se refiere a la migración de especies eléctricamente cargadas en solución o suspensión en un electrolito, cuando se les hace pasar una corriente. Los cationes migran hacia el electrodo cargado negativamente (ánodo) y los aniones son atraídos hacia el electrodo cargado positivamente (cátodo). Los solutos neutros no son atraídos a ninguno de los electrodos. La separaciones por EC son extremadamente rápidas: algunas son obtenidas en menos de 5 minutos, con estudios de reproductividad que comúnmente muestran una covarianza menor del 2% (Jenkins, 2000).

La electroforesis capilar es un método de separación que se basa en las diferencias de la velocidad de migración de especies cargadas, sometidas a un campo eléctrico. Los componentes básicos de un sistema de electroforesis incluyen una fuente de voltaje (que proporcione hasta 60 kV), un capilar de sílice fundida con un diámetro interno de menor a 200 µm, 2 reservorios con buffer donde se introducen cada uno de los extremos del capilar y un par de electrodos (platino), también en cada extremo, conectados a la fuente de voltaje, y un detector (ver Figura 2).

El capilar es llenado con el buffer al pH deseado, la muestra se diluye en buffer para ser introducida en capilar y se aplica el voltaje, entonces las especies iónicas de la muestra migran a través del capilar de acuerdo a su movilidad electroforética. Eventualmente las moléculas pasan por el detector (UV, LIF) y se

registra la señal del detector. Dicha señal analítica se conoce como electroferograma (EFG). La movilidad electroforética es una propiedad característica de cada partícula y está determinada por su carga y masa. Puede calcularse a partir de la teoría de Debye-Huckel-Henry (ecuación 3), donde la movilidad está dada por la carga de la partícula (*q*), la viscosidad del buffer (η) y el radio de Stokes la partícula (γ) (Altria, 1999; Linhardt y Toida, 2002).

La separación en electroforesis está basada en las diferencias de velocidad de migración de los solutos en un campo eléctrico. La velocidad de un ión está en función de su movilidad electroforética y del voltaje aplicado en los capilares de diámetro interno reducido (20-200 µm d.i.) para realizar separaciones eficientes tanto de moléculas pequeñas como grandes (Robinson-Fuentes, 2006).

En la práctica, la movilidad electroforética (µep=cm2/Vs) se calcula a través de la velocidad electroforética (*v*ep=cm/s) y la fuerza del campo eléctrico (*E*=V/cm), la relación entre estos factores se muestran en la ecuación 4:

$$\mu ep = \frac{-q}{6\pi n\gamma} \qquad (3)$$

$$\mu ep = \frac{vep - Ld/tm}{EV/Lt} \qquad (4)$$

Donde la velocidad electroforética se mide a través de la longitud del capilar hasta el detector (L_d) y el tiempo de migración (t_m), es decir el tiempo que le toma a un soluto moverse desde la entrada del capilar hasta la ventana del detector. La fuerza del campo eléctrico está determinada por el voltaje aplicado (V) en la longitud total del capilar (L_T). La µep es independiente del voltaje y la longitud del capilar, pero es altamente dependiente del tipo de buffer y pH (Beckman, 1991).

Además de la movilidad electroforética, otra fuerza que rige el proceso electroforético es el flujo electrosmótico (EOF, del inglés, Electrosmotic flow). Este fenómeno se produce a consecuencia de la superficie cargada de la pared del

capilar. Los capilares de sílice fundida tienen grupos silanol (Si-OH) que cuando se ionizan (en contacto con el buffer) producen una carga negativa (ver Figura 1). Las paredes cargadas negativamente atraen iones cargados positivamente, creando una doble capa eléctrica. El grado de ionización es controlado principalmente por el pH de buffer y cuando se aplica el voltaje a través del capilar, los cationes en la parte difusa de la doble capa migran en dirección al cátodo, arrastrando agua con ellos. El resultado es un flujo neto de solución buffer en dirección al electrodo negativo. El EOF se genera en toda la longitud del capilar, es pequeño a pH bajo y alcanza su máximo a pH 11. Gracias al EOF es posible el análisis simultáneo de especies neutras, cationes y aniones, pues el EOF actúa como una bomba que impulsa todas las moléculas hacia el detector (Ciccone, 2001; Odda y Landers, 1996).

En la EC, la separación de los analitos de basa en sus movilidades electroforéticas diferenciales, pero se discute en términos de resolución y eficiencia. La resolución es esencialmente una medida de calidad de una separación y la eficiencia se refiere a que tan estrechos son los picos. Basados en el ancho del pico a la mitad de la altura del pico, de forma similar que en la cromatografía de líquidos las eficiencias se calculan en términos de platos teóricos, a mayor número de platos teóricos, la separación es más eficiente. El cálculo de la resolución usa el tiempo de migración de dos picos y el ancho de la base de los picos. A mayor resolución, mejor separación de 2 picos. Entre mejor separación, los resultados del análisis son más confiables (Harris, 2001; Desai y Armstrong 2003).

Los principales parámetros a considerar en un análisis electroforético son el voltaje aplicado, el pH y concentración del buffer así como la longitud del capilar. El aumento o disminución de estas condiciones determinan variablemente la migración y por lo tanto la exitosa separación de los componentes de la muestra a través del capilar (Odda y Landers, 1996).

La movilidad de un ión en un medio particular es constante y característica de ese ión. La movilidad del ión es resultado de dos factores. El ión es atraído al electrodo

de carga contraria, jalándolo a través del medio. Al mismo tiempo, las fuerzas friccionales tratan de prevenir el movimiento. El balance de ambas determina la movilidad total.

Un ión pequeño tendrá menor fuerza friccional y por tanto, se moverá a través del capilar más rápido que uno más grande. De manera similar, un ión con carga múltiple experimentará más atracción al electrodo y se moverá más rápido.

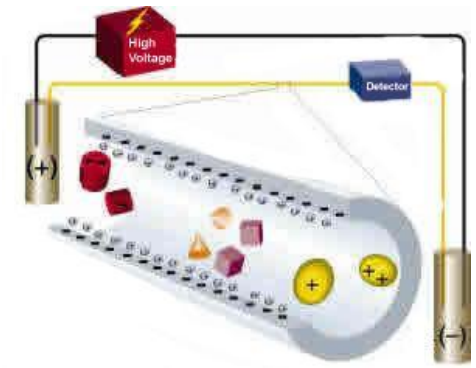

Figura 1. Representación de una separación electroforética en un capilar.

Es la diferencia en la velocidad de migración de los solutos es la responsable del efecto de separación en la electroforesis. La EC ha tenido una gran aceptación ya que ofrece algunas ventajas sobre la electroforesis convencional que son:

- Posibilidad de automatización.
- Menores tiempos de análisis.
- Uso de voltajes más altos.
- El calor generado se disipa fácilmente por las paredes del capilar.
- La detección de las bandas puede realizarse dentro del capilar mismo.

La configuración básica del instrumento de EC es relativamente simple. Todo lo que se requiere es un capilar de sílice fundido con una ventana óptica, una fuente de poder con voltaje controlable, dos electrodos, dos recipientes para el buffer y un detector de UV. Los extremos del capilar se colocan en los recipientes del buffer y la ventana óptica se alinea al detector. Después de llenar el capilar con buffer, se puede introducir la muestra sumergiendo el extremo del capilar en la solución que contiene la muestra y elevando el capilar inmerso un pie aproximadamente por encima del extremo del capilar donde está colocado el buffer. Virtualmente todo el trabajo que se realizó antes de 1988 se llevó a cabo en aparatos de construcción casera siguiendo la configuración básica que se acaba de describir. Estos instrumentos fueron muy útiles para experimentar pero inconvenientes para el análisis rutinario y demasiado imprecisos para el análisis cuantitativo.

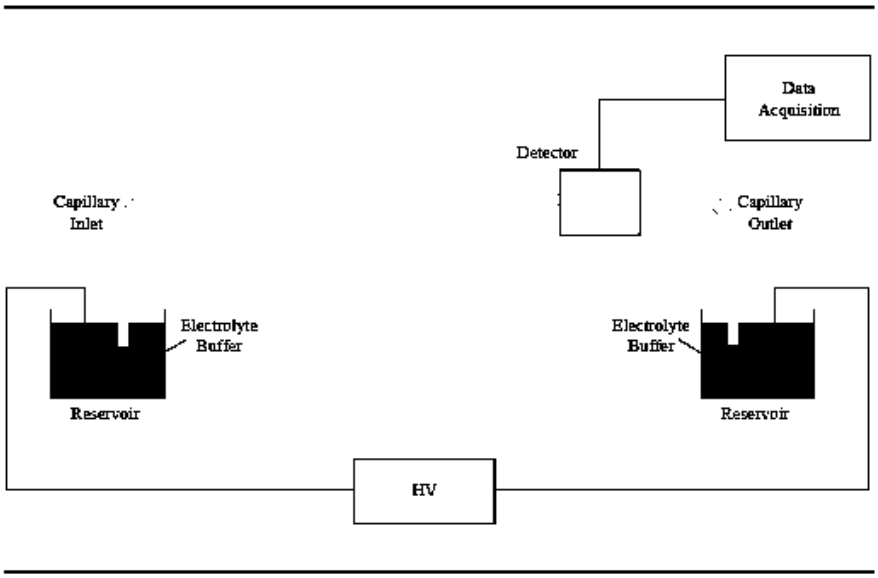

Figura 2. Diagrama del aparato de electroforesis capilar.

El diagrama de un moderno instrumento se ilustra en la Figura 2. Comparado con los instrumentos iníciales, éste ofrece una completa operación de todos los procesos vía computadora, inyección por presión o electrocinética, colector de fracciones o automuestreador, desarrollo de métodos automatizados, control preciso de la temperatura y un sistema avanzado de disipación de temperatura. La automatización es crítica en EC ya que se requieren operaciones repetibles para un análisis cuantitativo preciso (Robinson-Fuentes, 2006).

I.6 MARCADORES RADIOGÁFICOS

I.6.1 Iotalamato

El ácido de iotalámico (ácido 5-acrtamido-2,4,6 triiodo-N-metillisoftalámico) es un medio de contraste radiográfico, ácido derivado del ácido triiodo-benzoico. Su formula comprende una función ácida en posición 1 del ciclo y de los radicales de importantes en posición 3 y 5 (figura 3) (Jayewardene *et al*., 1994). Comercialmente está disponible como Conray® del laboratorio Mallinckrodt. Medical Inc., EEUU. El iotalamato es un medio de contraste radiopaco iodado, iónico, indicado para angiografía, nefrografía y urografías, que se vende a una concentración de 282 mg/mL de iodo. Es hidrosoluble, se ha estimado una vida media de 45 min y tiene un peso molecular de 821.138 g/mol, (Wilson *et al.,* 1999)

Características físico químicas

El iotalamato (Figura 3) tiene un peso molecular de 643 Da (Bourin *et al.,*1997; Ghouila, 1994). Presenta tres importantes características físico químicas de estabilidad, solubilidad, hidrofilia, viscosidad y la osmolaridad. Es un monómero iónico, a una temperatura de 20ºC y para una solución de 300 mg/dL presenta una densidad de 1.34 g/mL. El iotalamato en solución se disocia en un anión y un catión. El anión posee los átomos de iodo que son radiopacos (Bourin *et al.,* 1997; Prueksaritanon *et al.,* 1986). La osmolalidad del iotalamato es de 1500 mOsm/kg H_2O. El coeficiente de partición es de 0.039. Este coeficiente de partición es 25

veces superior al coeficiente de partición del butanol, que se refleja en una importante hidrofilia.

Farmacocinética del iotalamato

La vía de administración del iotalamato es vía IV. El pico de concentración es inmediato (posterior a su aplicación IV). La farmacocinética del iotalamato, se basa en un modelo bicompartimental, comprende un compartimiento plasmático y el compartimiento extracelular. El volumen de distribución del iotalamato es de 0,13 ± 0,03 L/kg. Este volumen de distribución corresponde al volumen de líquido extracelular. Debido a su baja liposubilidad el iotalamato difunde rápidamente en el espacio intersticial (Bourin *et al.,* 1997). La existencia de un aclaramiento extra renal es mínimo en los individuos con una función renal normal. Por el contrario este aumenta cuando la función renal disminuye (Prueksaritanon *et al.,* 1986).

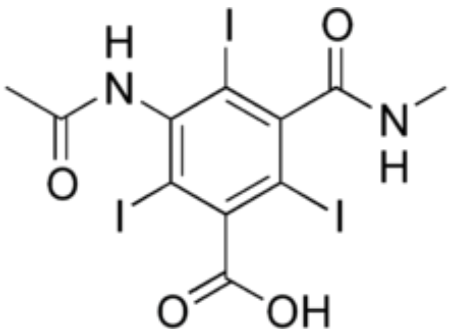

Figura 3. Estructura química del iotalamato.

Metabolismo y eliminación

Este agente no es metabolizado (Bourin *et al.,* 1997). La principal vía de eliminación en el perro es urinaria. El tiempo de vida media, en el perro, se estima entre 0.7 y una hora (Prueksaritanon *et al.,* 1986). Se ha mostrado que el iotalamato y otros agentes podrían tener, en el hombre, una eliminación extra renal en los casos de disminución importante de las funciones renales. Esta vía extra renal es la bilis. La eliminación biliar en el perro no ha sido claramente

establecida. El iotalamato ha sido encontrado en la bilis, tanto en el hombre como en el conejo, después de una inyección IV del producto (Prueksaritanon *et al.,* 1986). Estudios extensivos en laboratorio del iotalamato han mostrado resultados ambiguos de que el iotalamato es activamente secretado por la células tubulares proximales y puede también ser reabsorbido en los túbulos (Odlind *et al.*, 1985), debido a estas condiciones ha sido cuestionado el uso del iotalamato como marcador ideal para la medición de la TFG (Schwartz y Furth, 2007)

Toxicidad

El efecto tóxico más importante de los productos de contraste parece ser su nefrotoxicidad. La aparición de insuficiencia extra renal puede resultar por el uso de MCR (Gale *et al.*, 1984; Ihle y Kostolich, 1991; Katzberg, 1997). La nefrotoxicidad de los productos de MCR es la tercera causa de aparición de insuficiencia renal en un medio hospitalario en el hombre (Deray y Jacobs, 1995; Katzberg, 1997).

Mecanismos de acción

La osmolaridad juega un papel importante en este mecanismo. En efecto, la inyección de productos de contraste va a provocar una baja importante de la resistencia vascular renal, y por lo tanto una caída del producto de filtración glomerular. Pero estas perturbaciones hemodinámicas están asociadas a factores de riesgo: insuficiencia renal, los mielomas, la deshidratación, la acción de otros agentes neurotóxicos, hipotensión, isquemia renal (Deray y Jacobs, 1995; Deray y Jacobs, 1996; Idee y Bonnemain, 1996; Morkos y Nahas, 1998).

Estas alteraciones van a provocar una activación del retro control tubuloglomerular (aparato yuxtaglomerular). Este retro control desata una modulación de la producción de los mediadores vasoactivos (prostaglandinas, adenosina angiotensina) que provocara una vasoconstricción de las arteriolas aferentes (Arakawa *et al.,* 1996). Esta activación va a depender de la osmolaridad del producto de contraste. La respuesta es más importante si la osmolaridad es elevada (Morkos, 1998; Nygren y Ultendahl, 1998). La disminución de la

producción urinaria, la caída de la TFG y la reabsorción del sodio (Morkos, 1998) van a tener por consecuencia efectos sobre el túbulo, las funciones renales, los mediadores sistémicos, las células sanguíneas y los mediadores vasoactivos intra renales (p. ej. endotelina, adenosina) (Deray y Jacobs, 1995; Morkos, 1998).

En los animales, el efecto vasoconstrictor es transitorio, y no es suficiente para provocar disfunciones renales, pero se acumula con los efectos tóxicos de esos mismos productos en las células tubulares (Deray y Jacobs, 1995). Además esos efectos directos sobre el riñón pueden estar asociados a agregaciones plaquetarias, pudiendo favorecer la formación de trombos pudiendo significar una IRA pre renal (Arakawa *et al.*, 1996).

Prevención de efectos secundarios

Numerosos estudios recomiendan prevenir los efectos secundarios de los MCR. Estas recomendaciones preventivas incluyen la hidratación del paciente, el uso de diuréticos, de teofilina y de dopamina (Morkos, 1998; Thomsen y Bush, 1998), corticosteroides (prednisona), de antihistamínicos (difenihdramina) y de adrenalina antes de la administración del iotalamato. El 95 % de las reacciones secundarias debidas al iotalamato, tienen lugar durante los 20 minutos después de su aplicación (Thomsen y Bush, 1998).

Utilización para la medida de la TFG

La molécula del iotalamato es filtrada únicamente por el glomérulo. Cuando se aplica por vía IV se elimina rápidamente dado que 75 % de la dosis inyectada es eliminada en 24 horas (Jayewardene *et al.*, 1994). La medición de la TFG por aclaramiento renal con el iotalamato como marcador por ECZ esta reportado en el hombre (Wilson *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 1999), pero no en el perro.

I.6.2 Iohexol

El iohexol (Figura 4), es un medio de contraste radiográfico (Omnipaque®), iodado no iónico, que tiene bajo peso molecular que lo hace seguro y no tóxico en estudios angiográficos y urológicos y de tomografía axial computarizada (Back *et*

al., 1988a). Debido a que el iohexol puede ser cuantificado en pequeñas cantidades, se puede muestrear tanto de vasos venosos como capilares (Krutzel *et al.*, 1990).

Farmacocinética del iohexol

La farmacocinética del iohexol es similar a otros compuestos que no se unen a las proteínas como a otros monómeros usados como MCR, y presentan una cinética de primer orden con una fase inicial de eliminación rápida en las 2 a 3 hrs, seguida por una fase lenta linear de disminución con una vida media de 2 h en pacientes con función renal normal y una prolongación de la vida media en pacientes con la TFG disminuida (Shihabi y Constantinescu, 1992). En humanos con función renal normal, la distribución se completa dentro de aproximadamente las 2 horas (Frennby, 1997; Laroute *et al.*, 1999). La vida media en plasma es de ~90 minutos, es distribuido en el espacio extracelular and presenta una unión menor del 2% a las proteínas plasmáticas (Krutzen *et al.*, 1984; Krutzen *et al.*, 1990). El iohexol es eliminado del plasma exclusivamente por filtrado glomerular, con una recuperación del 100% en las 24 hrs después de la aplicación. La eliminación extra renal del iohexol es insignificante en situaciones de reducción de la TFG (Nilsson-Ehle y Grubb, 1994). Estudios de aclaramiento en perros y gatos con iohexol indican que este marcador tiene un comportamiento similar en estas especies (Heiene y Moe, 1999).

Metabolismo y eliminación

Una vez aplicado el iohexol no es metabolizado en el organismo (Gleadhill y Michell, 1996), ni se une a la proteínas plasmáticas, secretado o absorbido por los túbulos renales, y es libremente filtrado en el glomérulo (Shihabi *et.al.*, 1993; Lindblad y Berg, 1994), haciéndolo un marcador adecuado en estudios de la TFG. En ratas y perros el iohexol es rápidamente distribuido y se encuentra casi exclusivamente en el espacio extracelular (Miyamoto, 2001). En un estudio usando 3 perros, 98% de la dosis de iohexol fue excretada sin cambios por la orina (Heiene y Moe, 1998), apoyando su utilidad como marcador para la medición de la

TFG. Estudios de aclaramiento usando al iohexol han coincidido fuertemente con los métodos tradicionales usados para estimar la TFG en varias especies.

Toxicidad

Es conocido que algunos medios de contraste iónicos como el diatrizoato han mostrado tener efectos potencialmente nefrotóxicos (Humes *et al.,* 1986), este parece no ser el caso con el iohexol. Tiene una baja prevalencia de reacciones secundarias después de su aplicación IV, aun en personas muy jóvenes o geriátricas (Rudnick *et al.,* 1995*)*.

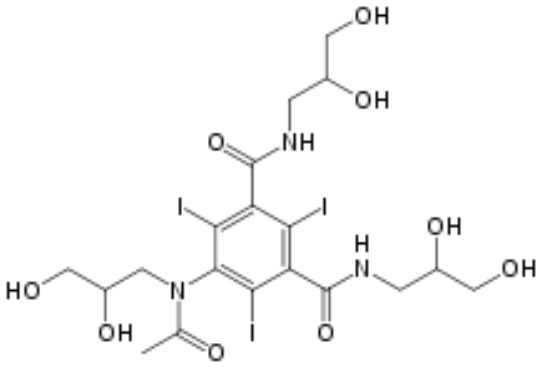

Figura 4. Estructura química del iohexol.

Uso en la medición de la TFG

El iohexol es comúnmente usado para estimar la TFG en humanos (Frennby, 1997; Gaspari *et al.,1998; Frennby et al.,* 1996; Gaspari *et al.,* 1997ª; Gaspari *et al.,* 1997b; Brown y O,Relly, 1991, Lindablad y Berg, 1994; Effersoe *et al.,* 1990; Frennby *et al.,*1995; Olsson *et al.,* 1983) y ofrece buena precisión en pacientes sanos y en los que presentan enfermedad renal o varios grados de de disfunción renal (Gaspari *et al.*, 1997b). Estudios recientes realizados en perros, indican que también es seguro en esta especie aplicado vía IV (Finco *et al.,* 2001; Brown y O`Relly, 1991; Gleadhill y Michell, 1996). Una amplia variedad de dosis se han administrado en animales sanos y con función renal limitada (Moe y Heiene, 1994;

Finco *et al.,* 2001; Laroute *et al*., 1999; Frennby *et* al., 1996; Miyamoto, 2001) y a dosis de 45 mg/kg en gatos nefrectomizados (41 a 600 mg/kg en gatos sanos) (Frennby *et al.*, 1996). En 50 perras con piometra se administró vía IV iohexol a dosis de 600 mg/kg, siendo bien tolerado (Heiene y Moe, 1999). El iohexol mostró que causa diuresis osmótica en perros a dosis altas (Tornquist *et al.*, 1985) y vasoconstricción renal en humanos después de la administración IV, pero estos efectos son breves y transitorios (Humes *et al.*, 1986). Effersoe *et al.,* (1990) y Olsson *et al*. (1983) realizaron mediciones simultaneas de la TFG comparando el iohexol con 99mTc-DTPA y 51Cr-EDTA respectivamente y no encontró cambios en la función renal asociado al empleo del iohexol durante o después de su aplicación. Estudios de aclaramiento simultáneos administrando el iohexol con otros marcadores han demostrado que dichos protocolos son seguros, sin interferencia entre los marcadores y sin reacciones adversas (Laroute *et al.*, 1999). Varias dosis, combinaciones y rutas de administración han sido usadas con la inyección IV en bolo de iohexol, incluyendo la creatinina exógena vía SC (Finco *et al*., 2001; Brown *et al.*,1996), la vía IV en bolo seguida de infusión constante de creatinina exógena así como la inyección IV en bolo de 99mTc-DTPA (Moe y Heiene, 1994) y de ^{51}Cr-EDTA (Frennby *et al.*, 1996). El éxito en obtener la estimación exacta y reproducible de la TFG en humanos también se ha tenido en animales. Varios investigadores han estimado la TFG usando el iohexol como marcador por cromatografía líquida de alta resolución para estimar la TFG en perros (Moe y Heiene, 1994; Finco *et al.,* 2001; Brown *et al*., 1996) evaluaron el aclaramiento plasmático del iohexol en comparación al aclaramiento renal de creatinina exógena en perros que se consideró su función renal normal y en animales con la masa renal reducida quirúrgicamente. Gleadhill y Michell (1996), así como Moe y Heiene (1994) compararon el aclaramiento plasmático del iohexol por cromatografía líquida de alta resolución y de 99mTc-DTPA para determinar la TFG en perros sanos y perros con daño renal confirmado, siendo los resultado en estos estudios similares, con buena correlación de los valores de TFG obtenidos usando al iohexol como marcador comparados con los marcadores seleccionados

en cada estudio respectivamente. Sin embargo, la comparación directa de los datos generados en estos estudios es difícil debido a la variación en la metodología y en la elección de los modelos matemáticos usados para determinar los valores de aclaramiento plasmático. También usando iohexol como marcador por tomografía computarizada se ha estimado la TFG en perros (O`Dell-Anderson *et al., 2006)*.

Análisis del iohexol

El iohexol es muy estable (Frennby, 1997). Las muestras pueden ser refrigeradas hasta por dos semanas (Heiene y Moe, 1998) o congeladas por tiempo indefinido sin que se afecte su análisis (Braselton *et al.*, 1997). Varios métodos se han desarrollado para determinar la concentración del iohexol en la orina, suero y plasma. Estos incluyen a la (1) Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPCL) (Shihabi *et al.*, 1993); (2) espectroscopia de absorción atómica acoplada a plasma (ICPAES, por sus siglas en inglés) (Braselton *et al.*, 1997); (3) determinación química con cerio y arsenito (método químico simple) (Back *et al.*, 1988b), (4) Fluorescencia con Rayos X (Reanalizador) (Frennby, 1997); (5) contador de centelleo (gama) y por (6) Electroforesis Capilar (EC). Existen reportes del uso del iohexol como marcador en aclaramiento plasmático en el perro por cromatografía líquida de alta resolución (Gheadhill y Michell, 1996; Moe y Heiene, 1995), y por aclaramiento renal por cromatografía líquida de alta resolución (Brown *et al.*, 1996). No se ha reportado el uso del iohexol para medir la TFG por aclaramiento renal en perros con la técnica de EC.

I.6.3 Iopamidol

El iopamidol (Figura 5) es un medio de contraste iodado nefrotrópico, no iónico, de uso intravascular para estudios de angiografías y urografía. Su peso molecular es de 777.08 g/mol. Está indicado en mielografía, cisternografía y ventriculografía, en todas las exploraciones angiográficas, incluyendo la angiografía por sustracción digital (DSA) y la angiocardiografía, en todas las exploraciones urográficas y para

la intensificación del contraste en la tomografía computarizada. Sus propiedades también permiten la visualización de las cavidades corporales (p. ej., Artrografía, fistulografía, vesiculografía, colangiopancreatografía retrógrada endoscópica, histerosalpingografía) y tiene una pronunciada afinidad hidrofílica pero es prácticamente insoluble en etanol y cloroformo (Grainger, 1982).

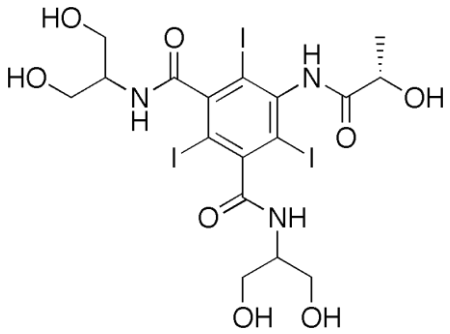

Figura 5. Estructura química del iopamidol.

Farmacocinética del iopamidol

El comportamiento farmacocinético del iopamidol es muy semejante al de los demás medios de contraste iónicos y no iónicos de eliminación renal. En estudios de cinética experimentales con conejos y perros, iopamidol (400 mg L/mL) se administró por vía I.V. en dosis equivalentes a respectivamente 50 y 200 L/mL. El medio de contraste se distribuye en los compartimentos vascular e intersticial del organismo con un tiempo de vida media de unos 10 minutos. Con excepción del tiroides, no se produce ninguna concentración en los distintos órganos. La acumulación en el tejido tiroideo se observa con todos los medios de contraste yodados y se atribuye a la pequeña cantidad de yoduros administrada junto con el medio de contraste. El iopamidol no penetra a través de la barrera hematoencefálica intacta. La distribución cinética del iodixanol, iohexol, iopamidol, iopromide, iotalamato y el ioxaglate son similares. Con la excepción de los medios de contraste biliares, estos agentes presentan limitada unión a las proteínas

plasmáticas y no presentan biotransformación. Desde el punto de vista farmacocinético la principal área de interés de estos compuestos es la eliminación, mostrando el iopamidol un porcentaje más alto de eliminación renal (Pitrè *et al.*, 1980; Bourin *et al.*, 1997). La unión a las proteínas del plasma se determinó utilizando el análisis de equilibrio. En el suero de conejos y perros se encontraron sólo vestigios de iopamidol unido a las proteínas. La concentración en orina estudiada en conejos alcanzó los grados más elevados con iopamidol, metrizamida y ioxaglato de sodio-meglumina, seguidos de iohexol y, diatrizoato. La diferencia de los resultados se atribuye en primer lugar a la diuresis osmótica disminuida en los medios de contraste hipoosmolares (Khoury *et al.*, 1983).

Metabolismo y eliminación

La eliminación renal tiene lugar casi exclusivamente por los glomérulos. A los 30 minutos (conejo) y 45 minutos (perro) después de su aplicación, el 50% del iopamidol había sido eliminado. A las 7 horas se habían eliminado respectivamente 89 a 94% y 79 a 99%. Por el hígado se eliminó solamente de 0.2 a 0.6%. Los ensayos sobre biotransformación no mostraron indicio alguno sobre la presencia de metabolitos en la orina o bilis (Grainger, 1982).

Administración intravascular

Los efectos secundarios relacionados con el uso de medios de contraste IV con contenido de yodo son normalmente de grado ligero a medio y pasajeros. Se presentan menos frecuentemente con los medios de contraste no iónicos que con los iónicos. Pero se han observado también reacciones graves, de peligro mortal y también casos de muerte. Las reacciones que más frecuentemente se presentan con la administración IV son: náuseas, vómito, rubor, sensación general de calor y dolor. Las molestias subjetivas, como sensación de calor o náuseas, pueden atenuarse rápidamente reduciendo la velocidad de administración o interrumpiéndola brevemente (Hagen, 1984).

Toxicidad

La toxicidad aguda (DL_{50}) por administración IV, con una concentración de de 400 mg/mL, se determinó en perros a 17 g L/kg de peso corporal. Las manifestaciones de intoxicación con dosis subletales y letales fueron principalmente disnea y convulsiones. Se han realizado ensayos toxicológicos con dosis elevadas en diferentes especies animales, se observaron resultados generales más favorables con el iopamidol que con los medio de contraste iónicos y resultados parciales más avorables que los obtenidos con iohexol y metrizamina. Después de haber administrado medios de contraste yodados de eliminación renal, la capacidad del tejido tiroideo para la captación de los isótopos radiactivos empleados en el diagnóstico del tiroides queda reducida hasta 2 semanas y, en casos aislados, incluso más. Las reacciones de hipersensibilidad pueden ser agravadas en pacientes tratados con β-bloqueadores (Sage *et al.*, 1983; Khoury *et al.*, 1983). En un análisis reciente de la base de datos de la Agencia Federal de Drogas de los E.E.U.U. reveló que ciertos agentes radiográficos de contraste, como el iohexol y el iodixanol, reportan un número relativamente alto de eventos renales adversos en comparación a otros agentes que son ampliamente usados, como el iopamidol (Verow *et al.*, 1995). No existe evidencia de que la administración del iopamidol cause alteraciones de las pruebas de laboratorio (Khoury *et al.*, 1983).

Uso del iopamidol en la medición de la TFG

Se ha descrito un método de análisis por EC del iopamidol en suero de personas, en el que se desproteiniza con acetonitrilo (Shihabi *et al.,* 1995), pero no se ha reportado su uso en perros para estimar la TFG.

II JUSTIFICACIÓN

Los analitos convencionales usados en la valoración del funcionamiento renal son poco sensibles y solo se ven alterados cuando más del 50% o hasta el 67% de los nefrones se han perdido funcionalmente y ya se encuentra establecido un daño renal avanzado, lo que se asocia con una alta morbilidad y mortalidad.

La prueba para la evaluación de la masa renal funcional considerada de mayor valor es la estimación de la TFG. Esta se mide por pruebas de aclaramiento de sustancias endógena o exógenas, siendo la prueba de aclaramiento de la inulina la prueba de referencia en la investigación y clínica; sin embargo, este ensayo rara vez se realiza por las dificultades técnicas que implica, lo que ha motivado la búsqueda y validación de nuevas técnicas.

La ECZ por ser una técnica sensible ofrece muchas ventajas en comparación a los métodos convencionales de medición de la TFG con inulina, radioisótopos y la cromatografía líquida de alta resolución: 1) no necesita grandes volúmenes de muestra, 2) no necesita solventes orgánicos, 3) la medición de la TFG por aclaramiento renal con iohexol por EC requiere pocas tomas de muestra de sangre y orina en un tiempo relativamente corto (1.5 hr) y 4) la dosis del marcador radiográfico que se aplica en el paciente es mínima, aun en pacientes con daño renal severo sin el riesgo de inducir nefrotoxicidad.

La medición de la TFG por ECZ, permitirá la medición de la TFG en perros por aclaramiento renal, teniendo como alternativa el uso del iotalamato, iohexol o el iopamidol pero empleando un mismo método.

III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las pruebas clínicas convencionales usadas en medicina veterinaria para la valoración de la función renal (medición de urea y creatinina en sangre y densidad urinaria), utilizan analitos poco sensibles para el diagnóstico temprano de la insuficiencia renal. Por lo que se requiere usar técnicas sensibles, como la ECZ, que permitan la determinación de cambios en la función renal que pudieran conducir a un diagnóstico temprano. Tales cambios se determinan a través de los agentes radiográficos usados como marcadores en la medición de la TFG.

IV OBJETIVOS

IV. 1 Objetivo general

Desarrollar un método simple de electroforesis capilar por zona usando tres marcadores para determinar la tasa de filtrado glomerular por aclaramiento renal en perros.

IV.2 Objetivos Particulares

1. Estandarizar la metodología de Electroforesis Capilar para medir al iotalamato, iopamidol e iohexol en sangre y orina de perro.
2. Calcular la TFG por aclaramiento renal con diferentes marcadores por electroforesis capilar de zona en perros sanos.
3. Comparar los valores obtenidos de la TFG con los diferentes marcadores.

V HIPÓTESIS

Se puede usar un mismo método de ECZ con tres diferentes marcadores radiográficos para determinar por aclaramiento renal la TFG en perros.

VI MATERIAL Y MÉTODOS

VI.1 Tipo de estudio

El presente estudio es de tipo experimental, transversal y estructurado. Se cumplieron con las Normas Oficiales Mexicanas NOM-062-ZOO-1999 de las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, y la NOM-087-ECOL-1995 que establece los requisitos para la separación, envasado, almacenamiento, recolección, transporte, tratamiento y disposición final de los residuos peligrosos biológico-infecciosos que se generan en establecimientos que presten atención médica. El protocolo fue aprobado por la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo dentro del programa de investigación del año 2009.

VI.2 Grupo de animales

Se obtuvieron seis perros (*Canis familiaris)* de un particular en la ciudad de Morelia, Michoacán, de raza criolla de una misma camada a la edad de dos meses, los cuales se identificaron con un collar numerándose en forma aleatoria y progresivamente del 1 al 6; para cada uno de ellos se abrió un expediente clínico donde se registraron las variables de interés.

Se alojaron individualmente en jaulas de 3 m^2 de la Clínica Veterinaria de la Universidad Michoacana. Se procedió al aseo de los perros con jabón de uso veterinario, se administró desparasitante (fenbendazol, pamoato de pirantel, prazicuantel e ivermectina) PO y se aplicó un ectoparasiticida tópico (imidacloprid, permetrina), a los 10 y 25 días posteriores se les aplico vía IM una vacuna polivalente para la inmunización activa contra los principales patógenos (Distemper canino, Adenovirus Tipo 2, Parainfluenza, Parvovirus canino, *Leptospira canicola, Leptospira icterohaemorrhagiae* y Coronavirus canino).

Se les ofreció alimento comercial en forma de croquetas conforme a las recomendaciones del fabricante, con un contenido de proteína cruda del 22%, grasa 8%, fibra 4%, cenizas 7.5% y humedad de 8%, y agua a libre acceso. Las

instalaciones se mantuvieron en buen estado durante todo el proceso de investigación, los perros se condicionaron al manejo del personal el cual consistió en subirlos a la mesa de exploración, colocarlos en decúbito lateral y colocar una almohadilla (brazalete) que se ajusta a la parte distal de los miembros para la medición de la presión arterial periférica por el método oscilométrico.

Para valorar su estado de salud de la camada se les realizó examen clínico periódicamente. Se tomaron muestras de sangre y orina para realizarse estudios clínicos de control de hemograma, perfil bioquímico renal (urea, creatinina, proteínas totales, albumina, globulinas, relación albumina: globulinas, calcio, fósforo, sodio, potasio, cloro, bicarbonato, anión GAP y diferencia de iones fuertes) y urianálisis. Se realizó biopsia renal para estudio de histopatología y medición de la presión arterial periférica por oscilometría.

VI.3 Criterios de inclusión

- Animales de una misma camada.
- Animales se encuentren clínicamente sanos y con resultados de análisis clínicos para valorar la función renal dentro de valores normales.
- De una edad menor de 12 meses.
- Hembras y machos.
- Con peso corporal entre 10 y 20 kg.
- Manifestar un carácter dócil que permita su manejo.

VI.4 Criterios de exclusión

- Animales con enfermedades sistémicas.
- Animales agresivos o muy nerviosos.
- Pacientes con expediente clínico incompleto.

VI.5 Obtención de muestras para laboratorio

Para realizar los estudios de laboratorio clínico, los animales se mantuvieron en ayuno de 12 hrs previo al muestreo. Se puncionaron las venas cefálica y yugular utilizando jeringas de 5ml con aguja calibre 20G, colocándose la muestra en tubos

Vacutainer ® con EDTA para el hemograma y sin anticoagulante para la química clínica. Para obtener muestras de orina se sondeó a los pacientes utilizando sondas estériles de alimentación infantil para prematuros calibre 5FR o se realizó cistocentésis con jeringas de 10ml con aguja calibre 20G, con el fin de evitar la contaminación de la muestra. El manejo y procesamiento de las muestras de sangre y orina para los análisis clínicos se realizó de acuerdo a las técnicas estándares establecidas (Núñez, 1998).

VI.6 Medición de la presión arterial

Para la medición de la presión arterial el perro fue colocado en una mesa de exploración en un consultorio libre de distractores. Se empleó el método de oscilometría con un aparato marca Cardell®, Modelo 9401 (Sharn Veterinary Inc., EEUU). La técnica empleada para realizar las mediciones fue de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

VI.7 Toma de biopsia renal

Las biopsias renales fueron incisionales, para lo cual se dejaron a los perros en ayuno previo de 8 hrs, se canalizó a los pacientes la vena cefálica utilizando catéter calibre 22G, con solución salina al 0.9% a dosis de mantenimiento (10 mL/kg). En el protocolo preanestésico consistió en la administración de sulfato de atropina (0.04mg/kg vía SC), diez minutos posteriores se aplicó maleato de acepromacina (0.2mg/kg vía IV) y butorfanol (0.2 mg/kg vía IV), como anestésico se utilizó pentobarbital sódico (15mg/kg IV, a efecto anestésico). El acercamiento quirúrgico para la biopsia se realizó mediante laparotomía media antero postero umbilical, del xifoides hasta 5 cm caudal de la cicatriz umbilical; se valoraron ambos riñones macroscópicamente, no se observaron alteraciones y se procedió a realizar la toma de muestra en el polo caudal del riñón izquierdo, el cual se expuso elevando el meso colón de manera que el intestino grueso fue retraído hacia la derecha del animal, el resto de las vísceras abdominales fue contenido con toallas de laparotomía humedecidas. Se procedió a aplicar puntos separados simples rodeando el sitio a biopsiar en el parénquima de la corteza renal con suturas de

poligalactin 910 calibre 2-0 que se ajustaron y se anudaron para interrumpir el flujo sanguíneo en el área de incisión (0.5 cm de diámetro) para proceder a realizar el corte del tejido que se colocó en formalina. Se aplicó uno o dos puntos separados de colchonero la cápsula renal. En el sitio de la biopsia se mantuvo presión digital hasta que se constató que no existía hemorragia. Se procedió a realizar laparorrafia en la línea alba utilizando puntos en equis, tejido subcutáneo con un patrón de sutura continuo, ambos tejidos se unieron con materiales de sutura absorbible (poliglactina 910, calibre 3-0); en piel se siguió un patrón de sutura de puntos separados utilizando material de sutura no absorbible nylon calibre 2-0. Diez días posteriores se retiraron puntos de sutura de la piel.

VI.8 Protocolo para el aclaramiento renal

Se modifico el protocolo de aclaramiento renal con iotalamato descrito por Wilson *et al.* (1999), aplicándose para los tres marcadores de interés: iotalamato, iohexol, y el iopamidol vía IV con una separación entre cada ensayo en el grupo de animales de un mínimo de seis días.

Los perros se mantuvieron con un ayuno de 12 hrs previo al inicio del ensayo, una vez terminado el periodo de muestreo se les ofreció su dieta habitual. Se ofreció agua a libre acceso antes y durante el tiempo de la toma de muestras. Los perros se pesaron previamente al inicio y al término del estudio. La aplicación de los marcadores radiográficos se inició entre las 9:00 y las 11:00 AM. A cada perro se le colocó un catéter en la vena Cefálica que fue usado para colectar las muestras de sangre, después de cada toma de sangre el catéter fue limpiado con 10 mL IV de solución de NaCl al 0.9%. La dosis de administración de los marcadores radiográficos fue de un volumen de 0.5 mL por animal por vía IV en bolo, en un periodo de aplicación de 30 a 60 segundos, con una jeringa de insulina.

Se pesaron individualmente los animales, se determino el hematocrito, sólidos plasmáticos y densidad urinaria (estimados por índice de refracción) al inicio y al finalizar cada protocolo. No se presentaron cambios significativos entre los valores iniciales y al terminar los estudios.

Antes del inicio de cada ensayo se colocó un catéter vesical y se tomaron muestras de sangre (P_0) y orina (U_0). Al completarse la aplicación del marcador representó el tiempo cero. El catéter colocado en la vena cefálica fue usado para la obtención de muestras de sangre (2 mL) en tubos de Vacutainer® heparinizados. Se obtuvieron muestras de sangre a los 50 min (P_1) y 95 min (P_2) después de la aplicación del marcador. Se vació la vejiga por la sonda a los 45 min posteriores a la aplicación del medio (U_E), esta orina fue desechada, y posteriormente se cuantificó la producción de orina (mL/kg) de los siguientes 45 min y se obtuvo una muestra de orina (U_1). El tiempo en minutos transcurrido entre la aplicación del macador y las tomas de muestra de orina y sangre fueron registrados. Para confirmar que la vejiga se encontraba vacía se monitoreo por medio de ultrasonido abdominal en modo B (Aloka 500®, transductor convexo de 5 mHz). Durante el estudio los animales se mantuvieron en una jaula individual y se les colocó un collar isabelino para evitar que se retiraran los catéteres.

Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 1000 g por 7 minutos. La orina fue centrifugada a 1000 g durante 5 min separando el sobrenadante. La orina y el plasma separados se mantuvieron en congelación (-70º C) hasta su procesamiento.

VI.9 Medición de la TFG por ECZ

VI.9.1 Instrumentación

Los análisis electroforéticos se realizaron en un aparato de electroforesis capilar de marca Beckman P/ACE MDQ, equipado con detector de arreglo de diodos, usando capilares de sílice fundida (Polymicro Tech., Phoenix, USA) de 75 µm de diámetro interno (d.i) y 360 µm de diámetro externo (d.e.). Se hicieron las modificaciones pertinentes en las variables electroforéticas de voltaje, temperatura, concentración del buffer, pH y longitud del capilar con cada marcador. Los voltajes se modificaron de 5 a 27.5 KV, y la temperatura del capilar se mantuvo entre 18ºC y 20ºC.

Semanalmente se preparó solución buffer de borato a concentraciones de 50 mM y mensualmente hidróxido de sodio 1N a partir del cual se preparó semanalmente una dilución a 0.1 N. Se prepararon diluciones en concentraciones de 6, 15, 30, 60 y120 µg/mL de iotalamato, y de 6.12, 15.31, 30.62, 61.24 y 122.48 µg/mL de iohexol y del iopamidol en borato de sodio (5 mM y de pH 11.3). El borato de sodio a 5 mM se preparó a partir de la solución stock de borato de sodio de 50 mM, ajustando el pH con hidróxido de sodio (0.1 N). Como buffer de separación se usó borato de sodio 50 mM, a pH de 11.3 regulado con hidróxido sodio (1 N y 0.1N). Para evaluar los parámetros de validación del método (precisión, exactitud, linealidad y reproducibilidad) las soluciones descritas se inyectaron en el instrumento en cinco niveles de concentración (6, 15, 30, 61 y 102µg/mL) de iotalamato, y de (6.12, 15.31, 30.62, 61.24 y 122.48 µg/mL) para el iohexol y el iopamidol, con cinco repeticiones cada una, y este procedimiento se repitió por tres días diferentes.

Para calcular la TFG (mL/kg/min) se empleó la formula:

$$\frac{\text{CM orina } \left({}^{\mu g}/_{mL}\right) \times \text{Vorina (mL)}}{\frac{(P1+P2)}{2} \times \text{t recolección (min)} \times \text{peso (Kg)}} \qquad (5)$$

CM: Concentración del marcador; P1: Concentración en la segunda muestra de plasma; P2: Concentración en la tercera muestra de plasma; t: tiempo de muestreo.

Para reportar la TFG en m^2 se aplicó la formula:

$$\frac{\text{CM orina } \left({}^{\mu g}/_{mL}\right) \times \text{Vorina (mL)}}{\frac{P1+P2}{2} \times \frac{\text{t recolección (min)} \times (10.1 \times \text{peso (g)})^{2/3}}{1000}} \qquad (6)$$

CM: Concentración del marcador; P1: Concentración en la segunda muestra de plasma; P2: Concentración en la tercera muestra de plasma; t: tiempo de muestreo.

VII RESULTADOS

1. Estado de Salud de los Animales de Estudios.

El Anexo 1 muestra los análisis de laboratorio practicados a los animales donde se muestra que todos presentan valores en el intervalo normal, en el Anexo 2 se muestran los valores registrados de la medición de la presión arterial periférica por oscilometría notándose que están dentro de los valores considerados normales. En los estudio histopatológicos de las biopsias renales no se reportaron alteraciones patológicas (Anexo 3). No se presentaron cambios significativos entre los valores iníciales y al finalizar los protocolos con los marcadores en el peso corporal, hematocrito, proteínas plasmáticas y densidad urinaria en el grupo de animales.

2. Elección de las condiciones de análisis.

En el desarrollo de este método, se inicio con la identificación por separado de los marcadores diluidos en orina, para observar que los picos correspondientes estuvieran dentro de una ventana en la que no existiera interferencia con picos de las muestras. Se evaluaron parámetros tales como concentración del buffer, pH, KVoltaje, longitud del capilar y temperatura.

Para conocer la λ_{max} se analizaron las muestras en un equipo de EC con arreglo de diodos y se observó que para los tres marcadores la λ_{max} es a 240 nm; sin embargo, cuando se realizaron corridas a 254 nm no se perdió intensidad significativa en la señal. Inicialmente se uso como buffer de corrimiento borato 5 mM, en las que se identificaron los picos de los marcadores en un tiempo corto (<5min), pero después de varias corridas se observó en los EFG ensanchamiento de las bandas y perdida de la resolución, situaciones que se corrigieron al aumentar la molaridad del buffer. Se observaron picos más estrechos y mayor tiempo de migración (<12min) con el borato a 50mM.

El kV se varió de 5 a 30 kV, notándose que a 25 kV se obtuvo una señal adecuada y se redujo el tiempo de migración. A este voltaje, no se generó un exceso de calor. La Figura 6 muestra electroferogramas del análisis resultante de los tres marcadores en orina de perro bajo las condiciones arriba descritas.

Las condiciones con las que se obtuvo un análisis de iotalamato, iohexol y iopamidol en un tiempo menor a 12 min con picos simétricos y agudos y sin interferencia de los componentes de la orina o el plasma son: capilar de 60 cm de longitud total (50 cm al detector). El buffer de corrimiento es de boratos 50 mM, pH 11.3; se usó un voltaje de 25 kV a 18 ºC, con λ_{max}=254.

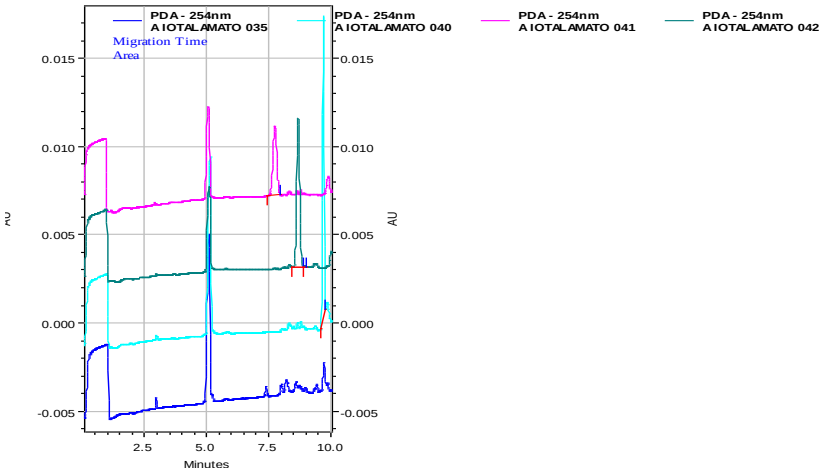

Figura 6. Electroferogramas de los marcadores en orina: inferior (azul marino) orina sola; medio inferior (azul claro) orina con “spiking” de iotalamato; medio superior (verde) orina con “spiking” de iopamidol y superior (rosa) con “spiking” de iohexol. Diluciones de orina 1:10 con buffer de borato de sodio 5 mM, pH 11.3, usando como buffer de separación borato 50 mM, pH 11.3, con capilar de 60 cm de longitud, 75 µm de d.i. y 360 µm de d.e.; 25 KV a 18ºC,λ= 254.

Con el fin de asegurar la confiabilidad, el método analítico se sometió a un proceso de validación. Para esto, se realizaron diluciones de los marcadores en orina y plasma de perro.

3. Parámetros de Validación

Se obtuvieron de acuerdo a criterios y requisitos para el análisis químico de muestras biológicas de una prueba de bioequivalencia o biodisponibilidad (Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2004 de la Secretaría de Salud).

3.1 Linearidad

La linearidad se probó con 5 niveles de concentración

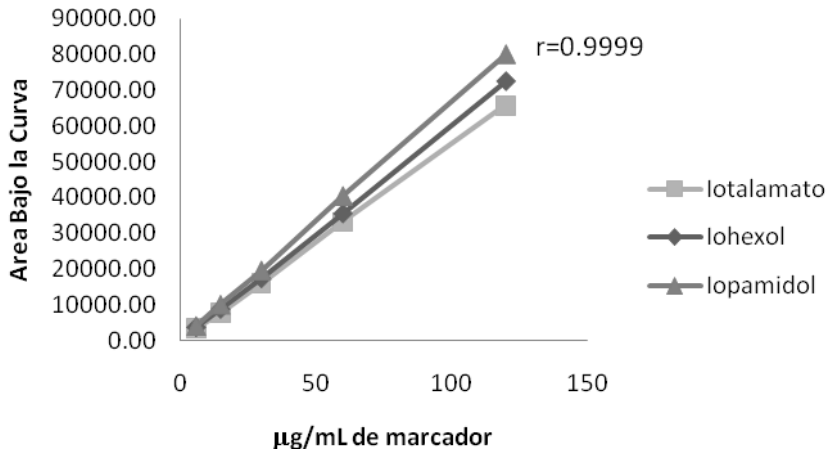

Figura 7. Linealidad del sistema para los tres marcadores. El valor de r= 0.9999 es para los tres marcadores

1.1Variabilidad Interdía:

Esta se probó con cinco niveles de concentración por tres días consecutivos, obteniendo al menos cinco repeticiones por punto. Las Figuras 8,9 y 10 muestran las curvas obtenidas para cada marcador.

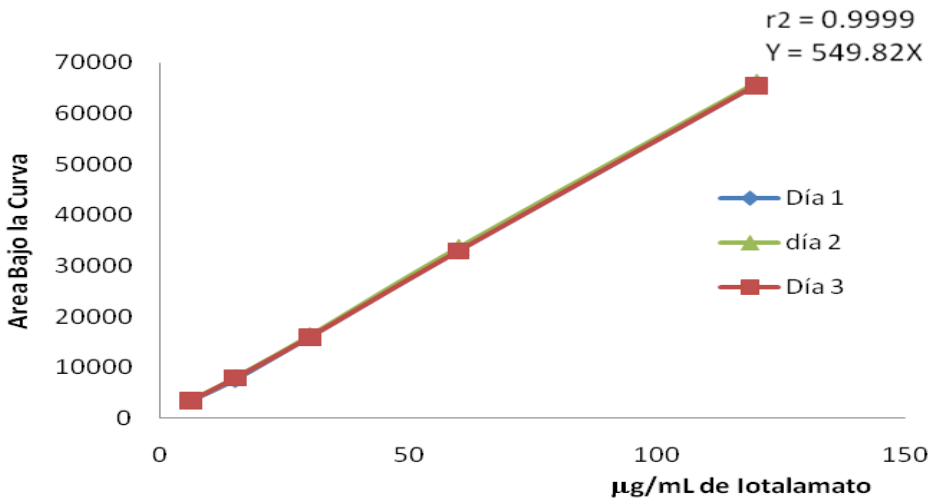

Figura 8. Variabilidad interdía para el Iotalamato

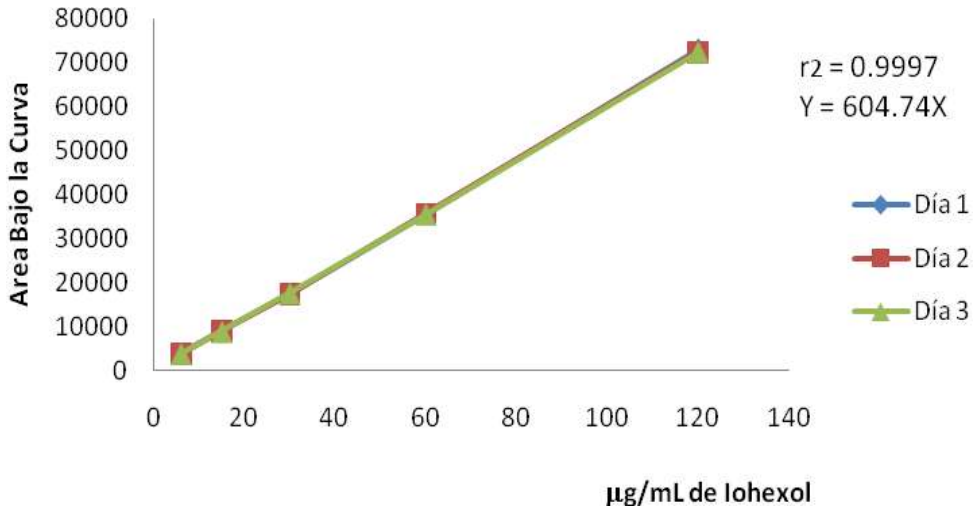

Figura 9. Variabilidad interdía para el iohexol

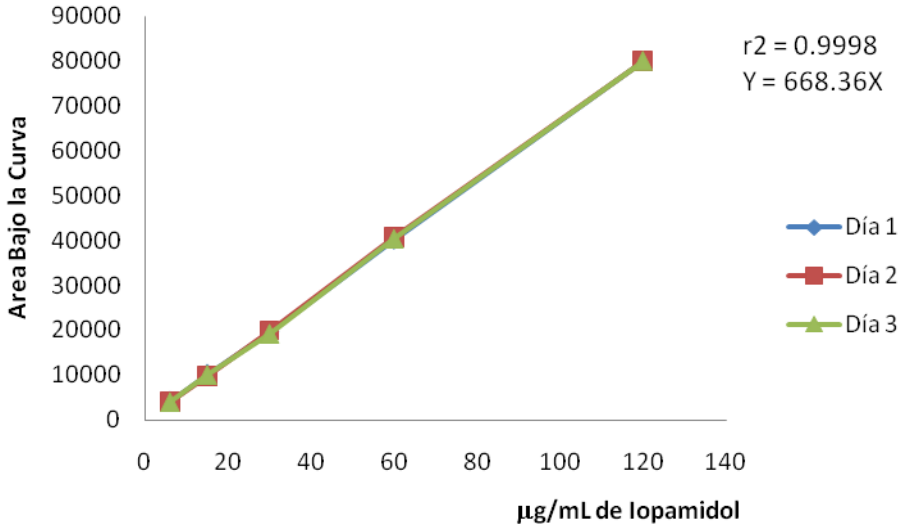

Figura 10. Variabilidad interdía para el Iopamidol

Las siguientes tablas muestran los resultados del análisis estadístico practicado a las curvas de calibración para cada marcador, se incluyen los resultados de las pruebas de hipótesis practicadas al intercepto y la pendiente. Para esto se consideró un 95% de nivel de significancia y tres grados de libertad (t_t = 3.18):

Tabla 2. Análisis de regresión lineal del Iotalamato

Parámetro	Día 1	Día 2	Día 3
r	0.9999	0.9999	1.0000
r^2	0.9998	0.9998	0.9999
b	-124.1130	33.6571	-120.8013
m	549.5990	551.9161	547.9368
S_y	655.68	675.77	452.95
S_b	440.55	454.05	304.33
t_c	-0.2817	0.074126	-0.3969
S_a	7.12	7.33	4.92
t_c	77.19	75.3	111.37

Tabla 3. Análisis de regresión lineal del Iohexol

Parámetro	Día 1	Día 2	Día 3
r	0.9999	0.9999	0.9999
r^2	0.9997	0.9998	0.9998
b	-427.6858	-285.1975	-268.6460
m	607.6988	604.0277	602.5049
S_y	1041.45	807.56	731.77
S_b	699.74	542.59	491.67
t_c	-0.61	-0.5256	0.5464
S_a	7.595	8.76	5.34
t_c	79.33	69.37	113.12

Tabla 4. Análisis de regresión lineal del Iopamidol

Parámetro	Día 1	Día 2	Día 3
r	1.0000	0.9999	0.9999
r^2	0.9999	0.9999	0.9998
b	10.3151	-44.2170	-100.8335
m	667.2858	669.9614	667.8310
S_y	518.33	973.17	867.72
S_b	348.27	653.87	583.02
t_c	0.0296	-0.0676	-0.1729
S_a	5.63	10.56	9.42
t_c	118.52	63.44	70.89

En todos los casos $r > 0.9999$ y $r^2 > 0.999$; además, las pruebas de hipótesis para intercepto demuestran que los valores de b pueden considerarse como 0, estadísticamente y que los valores de las pendientes indican que hay una relación directa entre la respuesta del detector y la concentración de los marcadores.

1.2 Selectividad del método

Las Figuras 11, 12 y 13 muestran electroferogramas de los marcadores en orina y plasma. No hubo traslape de los picos de la matriz de la muestra con los de los marcadores.

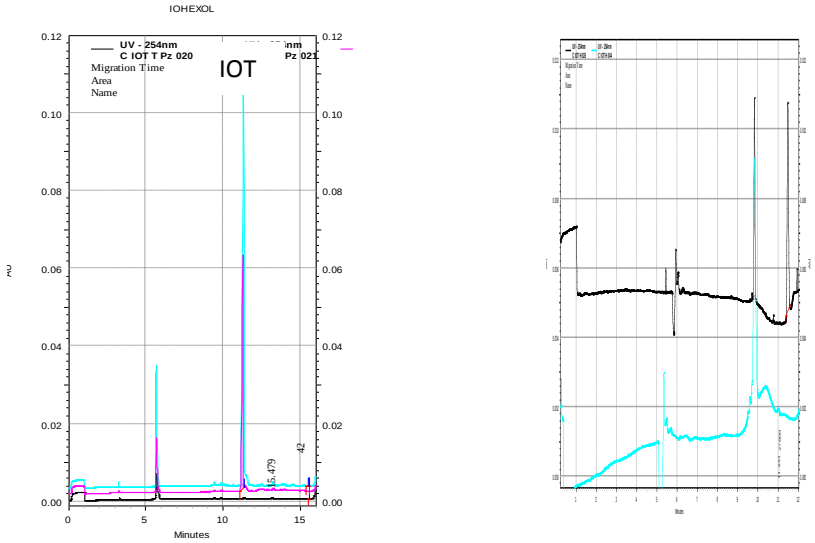

Figura 11. Electroferogramas de orina y plasma resultantes del protocolo con iotalamato. Electroferogramas de orina (izquierda) (Perro 3), inferior orina blanco dilución en borato 1:30, EFG medio, orina dilución 1:10 y EFG superior de orina con iotalamato diluida 1:20. EFG de la derecha de plasma (Perro 4), inferior P0 (blanco), superior plasma con iotalamato. Buffer de dilución borato de sodio 5 mM, pH 11.3; buffer de separación borato 50 mM, pH 11.3, con capilar de 60 cm de longitud, 75 μm de D.I. y 360 μm de D.E.; **25** KV a 18 °C, λ= 254 en modo UV.

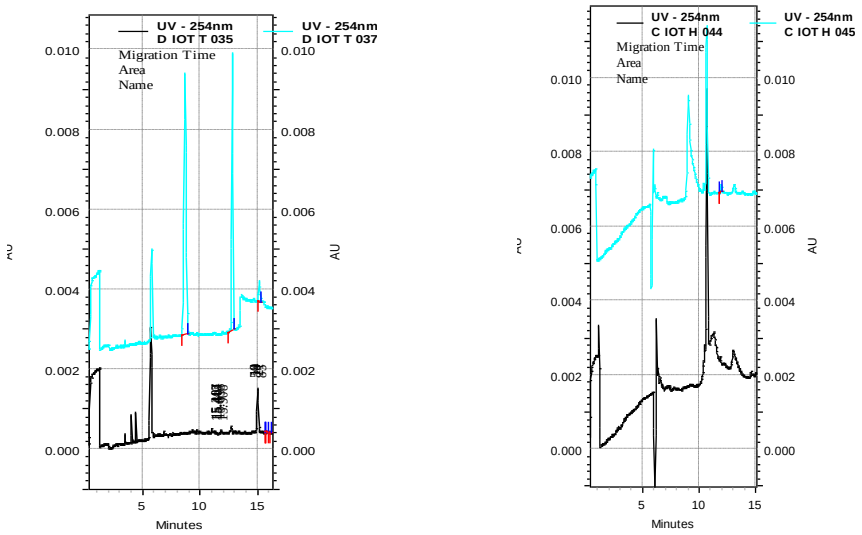

Figura 12. Electroferogramas de orina y plasma resultantes del protocolo con iohexol., EFG de la izquierda de orina (Perro 2), inferior U0 (blanco) 1:30 y superior U1 1:10 con iohexol; EFG de la derecha de plasma (Perro 1), EFG inferior P0 y superior P1 con iohexol. Buffer de diluciónción borato de sodio 5 mM, pH 11.3. Buffer de separación borato 50 mM, pH 11.3, con capilar (nuevo) de 60 cm de longitud, 75 µm de D.I. y 360 µm de D.E.; 25 KV a 18ºC, λ= 254.

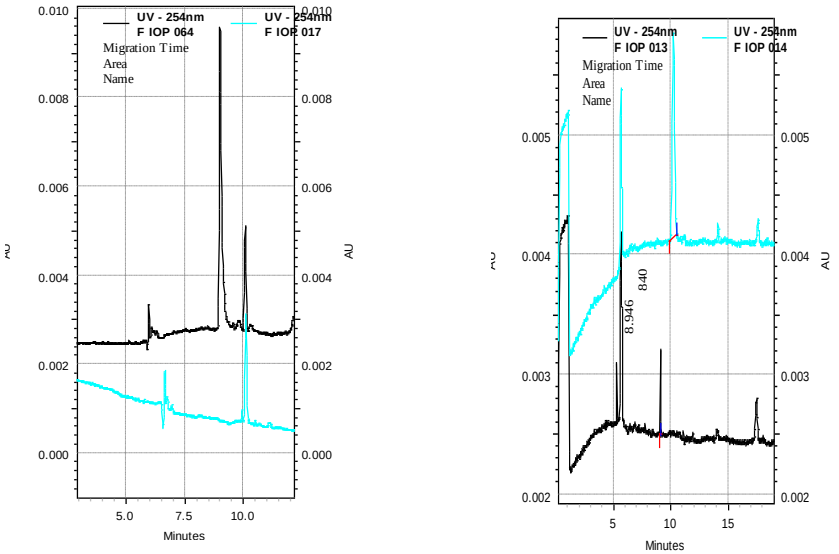

Figura 13. Electroferogramas de orina y plasma resultante del protocolo con iopamidol. EFG de la izquierda (Perro 5), inferior U0 (blanco) 1:30 y superior U1 1:10 con iopamidol; EFG de la derecha de plasma (Perro 2), EFG inferior P0 y superior P1 con iopamidol . Buffer de dilución borato de sodio 5 mM, pH 11.3. Buffer de separación borato 50 mM, pH 11.3, con capilar (nuevo) de 60 cm de longitud, 75 µm de D.I. y 360 µm de D.E.; 25 KV a 18ºC, λ= 254.

1.3Precisión y Exactitud

La precisión (DER%) y exactitud de la curva de calibración del método se evaluaron tanto en un solo día, intradía (repetibilidad) como en diferentes días interdía (reproducibilidad), los valores obtenidos se muestran en las tablas de resultados 5 a la 10.

Tabla 5. Variabilidad Intradía para Iotalamato

Concentración Nominal (μg/mL)	Concentración observada (μg/mL)	% DER	% Desviación Concentración real	% Exactitud
6	6.4	3.8	6.7	106.7
15	14.11	3.5	-5.9	94.1
30	29.7	3.3	-1.0	99
60	60.25	1.2	0.42	100.4
120	119.63	2.5	-0.31	99.7

Tabla 6. Variabilidad intradía para Iohexol

Concentración Nominal (μg/mL)	Concentración observada (μg/mL)	% DER	% Desviación Concentración real	% Exactitud
6.12	6.2	2.3	3.3	103
15.31	14.54	2.5	-3.1	96.93
30.62	28.74	3.3	-4.2	95.8
61.24	58.65	1.8	-2.25	97.75
122.48	120.45	2.4	0.375	100.4

Tabla 7. Variabilidad intradía para Iopamidol

Concentración Nominal (μg/mL)	Concentración observada (μg/mL)	% DER	% Desviación Concentración real	% Exactitud
6.12	6.2	2.9	3.3	103.3
15.31	15.25	2.0	1.7	101.7
30.62	29.35	1.8	-3-3	97.8
61.24	60.1	1.5	0.17	100.2
122.48	119.9	1.0	0.08	99.9

Tabla 8 Variabilidad interdía para Iotalamato

Concentración Nominal (μg/mL)	**Concentración observada (μg/mL)**	**% DER**	**% Desviación Concentración real**	**% Exactitud**
6	6.3	1.59	5.74	105.7
15	14.4	2.06	-3.81	96.2
30	29.4	0.99	-2.03	98.0
60	60.5	1.10	0.79	100.8
120	119.7	0.37	-0.23	99.8

Tabla 9. Variabilidad interdía para Iohexol

Concentración Nominal (μg/mL)	Concentración observada (μg/mL)	% DER	% Desviación Concentración real	% Exactitud
6.12	6.2	0.5891	3.15	103.1
15.31	14.7	1.4667	-2.30	97.7
30.62	28.8	0.7227	-4.07	95.9
61.24	58.7	0.2720	-2.08	97.9
122.48	119.9	0.3997	-0.06	99.9

Tabla 10. Variabilidad interdía para Iopamidol

Concentración Nominal (μg/mL)	**Concentración observada (μg/mL)**	**% DER**	**% Desviación Concentración real**	**% Exactitud**
6.12	6.08	1.59	1.36	101.4
15.31	14.98	2.37	-0.12	99.9
30.62	29.32	1.71	-2.25	97.7
61.24	60.48	0.76	0.79	100.8
122.48	119.80	0.11	-0.17	99.8

1.4 Límite de cuantificación

El límite de cuantificación estimada para el iotalamato es de 5.99 µg/mL; para el iohexol de 7.85 µg/mL y para el iopamidol es de 6.51 µg/mL, con 95% de significancia y tres grados de libertad.

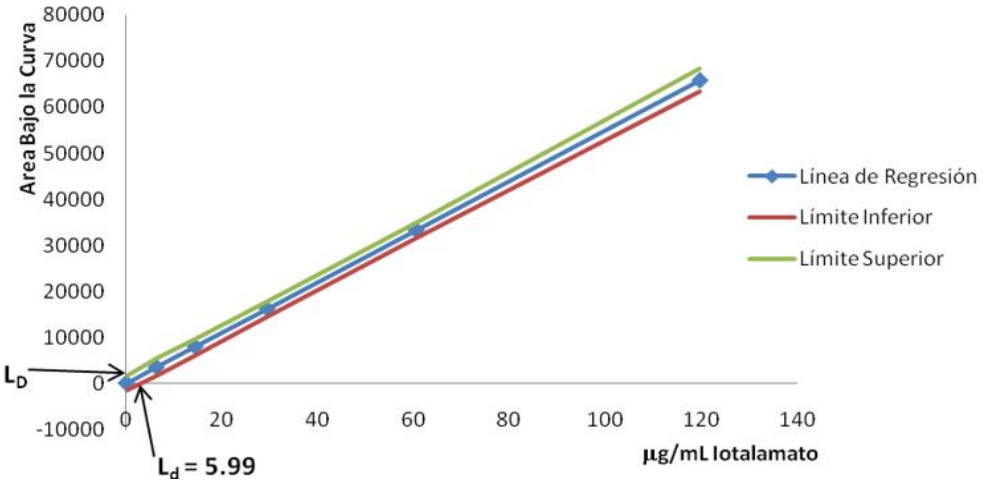

Figura 14 .Limites de Determinación y de Detección para el iotalamato.

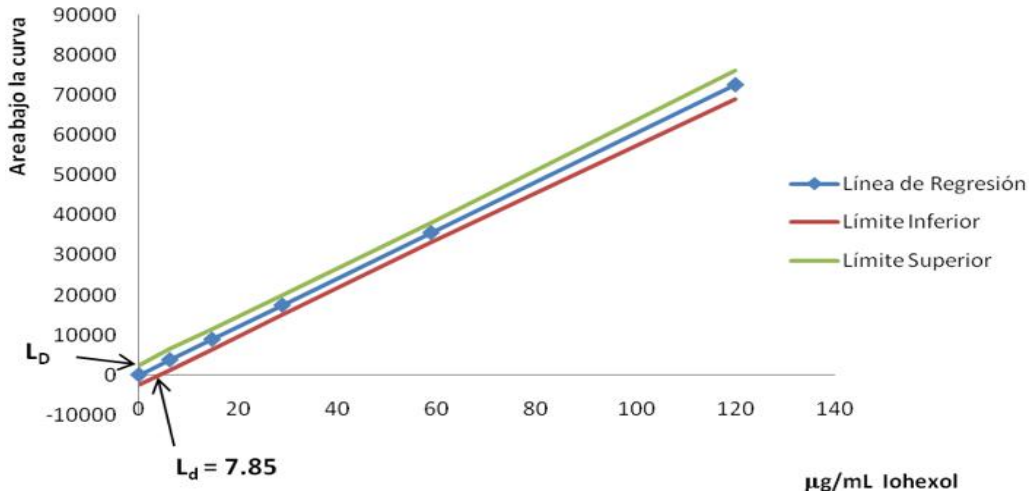

Figura 15. Limites de Determinación y de Detección del iohexol.

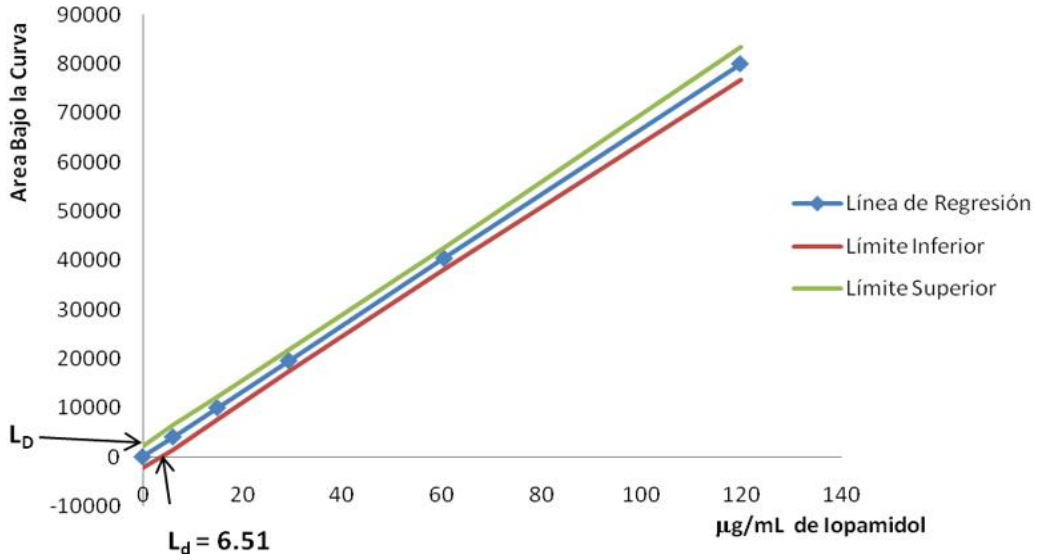

Figura 16. Limites de Determinación y de Detección para el iopamidol.

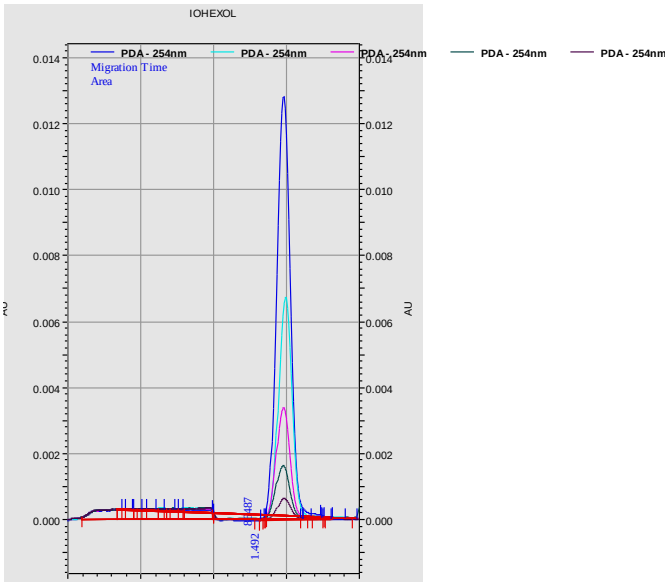

Figura 17. EFG con cuantificación mínima. Se observan cinco electroferogramas de iohexol a concentraciones de 6.12, 15.31, 30.62, 61.24 y 122.48 µg/mL.

3.4 Tasa de Filtrado Glomerular mediante aclaramiento renal

El cálculo se realizó usando los tres marcadores de acuerdo a las ecuaciones (5), obteniéndose los valores de la tabla 11 en base a la superficie corporal se presentan en la Tabla 12.

Tabla 11. Estimación de la TFG en base al peso corporal (mL/kg/min)

PERRO	IOTALAMATO	IOHEXOL	IOPAMIDOL
1	2.36	3.47	3.18
2	2.09	3.44	3
3	2.8	2.93	3.6
4	2.27	3.58	3.05
5	3.08	3.68	3.18
6	2.4	3.07	3.7
Promedios	2.5 ±0.37	3.4±0.3	3.3±0.

Tabla 12. Estimación de la TFG en base a la superficie corporal ($mL/m^2/min$).

PERRO	IOTALAMATO	IOHEXOL	IOPAMIDOL
1	59.0	88.76	80.76
2	51.36	87.36	73.72
3	66.9	69.25	78.26
4	54.79	89.5	73.62
5	66.13	84.92	75.16
6	55.38	70.84	85.38

Para saber si hay diferencia entre el uso de uno u otro marcador (mL/kg/min, se realizó un ANOVA y sus resultados se muestran a continuación:

H_o: La TFG es igual sin importar el marcador utilizado
H_1: La TFG depende del marcador utilizado

TABLA13. ANOVA				
Fuente de Variación	**Suma de Cuadrados**	**Grados de libertad**	**Cuadrado Medio**	**F**
Entre tratamientos	75.4891	2	37.7445	366.45
dentro tratatamientos	1.5452	15	0.103	
Total	77.0343	17	4.53	

F_t = 3.68 por lo que:

Se rechaza H_o y se acepta H_1; hay diferencias significativas entre los marcadores.

Sin embargo, para establecer entre qué marcadores existía la diferencia, se compararon los marcadores de manera individual. En todos los casos, se establecieron las siguientes hipótesis:

H_o: Las medias de ambos marcadores son iguales
H_1: Las medias de ambos marcadores son diferentes

Tabla 14. Comparación del Iotalamato vs Iohexol

Variación conjunta	0.111528333
Variación estimada	0.044611333
Error estándar	0.211214
t_c	4.079
t_t	2.228

En este caso, hay diferencias significativas entre las medias de los dos marcadores.

Tabla 15. Comparación del Iotalamato vs Iopamidol

Variación conjunta	0.110695
Variación estimada	0.044278
Error estándar	0.210423
t_c	3.731
t_t	2.228

Entre ambos tratamientos existen diferencias significativas

Tabla 16. Comparación del Iohexol vs Iopamidol

Variación conjunta	0.086823333
Variación estimada	0.034729333
Error estándar	0.18636
t_c	-0.411
t_t	2.228

Entre el Iohexol y el Iopamidol no existen diferencias significativas.

VIII DISCUSIÓN

No se observaron reacciones secundarias posteriores a la aplicación IV del iotalamato, ni con el iopamidol, o el iohexol para la determinación de la TFG en perros en este trabajo ni en otros estudios (Moe y Heiene, 1995; Braselton *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 1996; Finco *et al.*, 2001; Gleadhill y Michell, 1996; Goy-Tollot *et al.*, 2006; Heiene y Moe, 1999; Laroute *et al.*, 1999; Laroute *et al*., 2005).

En este trabajo se desarrolló y valido un método sencillo para ECZ en que se pude usar al iotalamato, iohexol y al iopamidol como marcadores para calcular la TFG en perros por aclaramiento renal. Este método cumple con los parámetros de validación tal y como se especifica en la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2004.

La perdida de resolución al emplear como buffer de separación al borato a una concentración de 5 mM, fue corregido al aumentar la concentración a 50 mM y esto se asocia a que al haber una mayor concentración del buffer, hay mayor conductividad en los extremos de la muestra (de baja conductividad). Entonces, las moléculas del buffer evitan que las moléculas del marcador se dispersen dentro del capilar pues las compacta (Bergert *et al*., 1997).

La linealidad del sistema para cada marcador empleado se validó de acuerdo a la normativa vigente en nuestro país, en la que se recomienda el empleo de 3 a 5 puntos experimentales, mientras que para la aplicación en la determinación del analito recomienda de 5 a 7 puntos experimentales. Para construir la curva de calibración sobre la que se calculó la linealidad, siguiendo el método de mínimos cuadrados, se promediaron los valores obtenidos para cinco curvas de cada concentración. Para los tres marcadores, la DER, fue menor a 15%, tal como lo específica la Norma Oficial Mexicana.

En la USP XXII se marca que para considerar que un sistema sea lineal se debe obtener un coeficiente de correlación (r) mayor de 0.999, para los tres marcadores

se obtuvieron valores mayores de 0.999. La NOM-177-SSA1-2004, específica un valor para r= 0.99, por lo tanto se considera que los sistemas son lineales para cada marcador empleado en este trabajo.

En los tres marcadores al realizar el análisis de regresión lineal se obtuvieron $r > 0.9999$ y $r^2 > 0.999$; Al aplicar una prueba de t para pendiente de cada marcador con la finalidad de establecer que la respuesta de la pendiente se debe al experimento que se está realizando. Entonces:

$$H_0: m = 0$$

$$H_1: m \neq 0$$

Como $t_c < t_{t,,}$ por lo tanto se descarta H_0 y se acepta $H_{1,}$ lo cual quiere decir que el valor de la pendiente se debe al cambio de respuesta como consecuencia del cambio del incremento de concentración de los diferentes marcadores usados en cada caso.

Por otro lado, se realizaron las pruebas de hipótesis para intercepto para demostrar que el valor obtenido para este pueden considerarse como cero estadísticamente. Es importante demostrar que el intercepto pude considerarse como cero ya que se esperaría que en ausencia de alguno de los marcadores se obtuviera cero como respuesta. Entonces, se establecieron las siguientes hipótesis:

$$H_0: b = 0$$

$$H_1: b \neq 0$$

De acuerdo con las tablas 2,3 y 4, se tiene que la $t_c < t_t$, por lo que los valores obtenidos sí pueden considerarse como cero.

La precisión es un parámetro de validación establecido en la Farmacopea Británica y en la USP e incluyen a la repetibilidad y a la reproducibilidad. El

parámetro estadístico que lo caracteriza es la desviación estándar relativa (DER) o el coeficiente de variación CV, aunque este término ya está en desuso. La normatividad mexicana acepta una DER < 15% y permite evaluar la incertidumbre en la estimación de la media, es decir, el error aleatorio que corresponde a la dispersión de los datos alrededor de la media. Los valores obtenidos, con los tres marcadores, son menores a 15% por lo que se considera que hay repetitibilidad.

La reproducibilidad también se evalúa con la DER, pero en este caso se acepta que el valor sea igual al obtenido para la repetibilidad o bien un poco mayor ya que en este caso hay un mayor manipuleo de las muestras, lo que significa una mayor fuente de error. Los valores obtenidos son mayores que la repetibilidad pero menores al 15%, por lo que se considera que si existe reproducibilidad en el método.

La exactitud que se define como la capacidad del método analítico para obtener resultados lo más próximos posibles al valor verdadero y refleja el error sistemático o la tendencia a él. En la exactitud se comparan los valores (concentraciones) adicionadas contra las determinadas, de esta manera se puede determinar si los valores observados se parecen a los reales. Las normas que establecen tanto la USP como la NOM-177SSA1-2004, indican que los valores determinados deben ser estadísticamente iguales al 100% (cantidad/concentración adicionada). Aplicando la prueba de t para muestras pareadas donde:

$$H_0: \text{valor observado} = \text{valor nominal}$$

$$H_{1:} \text{valor observado} \neq \text{valor nominal}$$

Por lo tanto se acepta la hipótesis nula, por lo que los valores obtenidos no son estadísticamente diferentes de los valores nominales, por lo tanto el método es exacto.

Algunos autores diferencian a la selectividad de la especificidad. Considerando la selectividad como la capacidad de detectar simultánea o separadamente sustancias químicas diferentes presentes en una misma muestra y a la especificidad como la capacidad de detectar el analito sin interferencias de otro compuesto (Castillo y González, 1996). Como se muestra en las Figura 11, 12 y 13, no existió traslape de los picos de la matriz en las muestras de plasma y orina con las señales de los marcadores empleados. Con esto se considera que el método es selectivo ya que es posible diferenciar las señales de cada marcador de las señales ocasionadas por los componentes de las matrices.

En cuanto a los límites de detección, se observan diferencias entre los valores obtenidos en los electroferogramas y aquellos obtenidos gráficamente. XXXX establece que el límite de detección corresponde a tres veces la señal producida por la línea base o ruido de fondo en un electroferograma y se presta a interpretaciones. El método gráfico utiliza la recta de regresión y los límites inferior y superior para cada uno de los puntos de la recta (Hubaux y Vos, 1970). Este método es más complicado pero tiene la ventaja de considerar el fenómeno en su totalidad. Aunque hay que considerar que los valores obtenidos tomando en cuenta las señales son ligeramente menores que los obtenidos gráficamente.

Los valores obtenidos de la TFG es este trabajo con los tres marcadores empleados son similares a los reportados en otros estudios con diferentes técnicas (ver Tabla 1). Los valores del aclaramiento renal con iohexol de este trabajo fueron ligeramente menores con los reportados en estudios de aclaramiento plasmático con iohexol (Finco *et al.*, 2001; Laroute *et al.,* 2005; Goy-Thollot et al., 2006) lo que se puede asociar a las diferencias de la técnicas empleadas, excreción extrarenal del marcador o la distribución retardada del marcador (Heiene y Moe, 1998) y las variaciones individuales de hasta un 10% en la TFG (Krutzen *et al.*, 1984). Sin embargo, son similares a los reportados por aclaramiento plasmático por Brown *et al*. (1996) y por centelleo renal (Moe y Heiene, 1995). También en perros se presentan variaciones en los valores de la

TFG entre las diferentes razas, asociado a la gran variedad en el tamaño y peso, la TFG expresada en kg de peso corporal, tiende a ser inversamente proporcional al tamaño corporal (Fleischer *et al.,* 2008; Bexfield *et al.*, 2008) y también se ha observado un efecto por la edad. La TFG se ha llegado a reportar en cachorros con valores superiores hasta en 87% en comparación de animales adultos (Laroute *et al.*, 2005).

Las diferencias observadas entre los valores obtenidos de la TFG con el iotalamato en relación a los valores obtenidos con el iohexol y el iopamidol se podrían presentar por diferentes causas. Se sabe que el iotalamato tiene una propiedad ionizante en el organismo, que las muestras pueden ser almacenadas de manera incorrecta o que la colección de orina fue incompleta (Kerl y Cook, 2005; Heiene y Moe, 1998); además, se ha estudiado la posible reabsorción tubular del iotalamato (Odlind *et al.*, 1985). Todo esto puede dar como resultado una subestimación de la TFG. En esta investigación, se cuidó el apropiado almacenamiento de las muestras así como la obtención completa de orina. Por lo tanto, lo más probable es que haya habido reabsorción tubular. Schwartz *et al*., (2006) obtuvieron cálculos de aclaramiento urinario, usando como marcador el iohexol, menos precisos que los de aclaramiento plasmático. Esto lo asociaron a la variabilidad en la colección de orina, con una desviación estándar de aproximadamente 24% entre los periodos de colección dentro de un individuo. La limitación más importante de los métodos de aclaramiento renal es obtener el vaciamiento total de la vejiga y la colección completa de orina (Gaspari *et al.*, 1997b).

Las pruebas de aclaramiento renal tienen las ventajas de ser más exactas en la estimación de la TFG, además de ser prácticas cuando se puede colectar completamente la orina, e implican el muestreo y cuantificación del marcador en sangre y orina. Tienen las ventajas de que requieren un tiempo relativamente corto para el muestreo, no es necesario aplicar modelos farmacocinéticos y la formula que se usa y los resultados son fáciles de interpretar, en comparación a los

estudios de aclaramiento plasmático donde el muestreo se realiza únicamente en sangre. El protocolo empleado en el presente estudio solo se necesitan dos tomas de sangre y el tiempo que transcurre entre la aplicación de marcador y la ultima toma de muestra es de 90 min, por lo que el periodo de muestreo es menor en comparación a los tiempos de requeridos en los estudios de aclaramiento plasmático o aclaramiento endógeno de creatinina (Heiene y Moe, 1998; Kerl y Cook, 2005).

Una desventaja que presentan los métodos de aclaramiento renal es que requiere la colección completa de la orina en periodos determinados. Para esto se hace necesaria la colocación de una sonda vesical lo cual es una limitante en perros pre púberes, de razas pequeñas y con disfunciones ureterales; además, se tiene el riesgo de provocar infección, trauma o la colección incompleta de orina o la necesidad de realizar la colección de orina en jaulas metabólicas (Kerl y Cook, 2005). En los estudios de aclaramiento plasmático se requiere de la medición del tiempo exacto del muestreo de sangre posterior a la aplicación de marcador, con periodos prolongados de muestreo que varian de acuerdo a la severidad de la disfunción renal, se han sugerido periodos de 24 y hasta 48 h. en pacientes con falla renal avanzada y se deben aplicar modelos matemáticos farmacocinéticos que pueden inducir errores en la cuantificación de la TFG (Heiene y Moe, 1998; Kerl y Cook, 2005).

Los estudios publicados sobre la medición de la TFG en perros se han realizado en animales de experimentación o pacientes sanos (Goy-Thollot *et al.*, 2006; Bexfield *et al.*, 2008), así como en animales con daño renal inducido quirúrgicamente o con enfermedad natural (Heiene y Moe, 1998). Los perros muy pequeños presentan superficies corporales proporcionales más grandes en comparación a perros de talla grande, resultando en que la TFG puede ser sobreestimada cuando se expresa en mL/kg/min. Por lo tanto, la TFG es alternativamente expresada en mL/kg/m^2 (Kerl y Cook, 2005). La referencia más directa debería ser en relación al peso de los riñones, pero esto no es posible en

la práctica clínica. Sin embargo, la media presenta una buena relación con el área de superficie corporal en animales y en el hombre, indicando que la base de comparación con el área de superficie corporal es la más útil (Schwartz y Furth, 2007). Se ha cuestionado las formas en que puede realizarse el cálculo del área de superficie corporal en el perro, posiblemente por las diferencias en la forma corporal de las diferentes razas. Peters (2003) propuso la expresión de TFG en base al volumen de fluido extracelular, pero estas condiciones necesitan ser estudiadas experimentalmente antes de que el procedimiento pueda tener una aceptación generalizada. No existe una solución fácil para estandarizar los valores de aclaramiento en perros y existen pocos trabajos publicados de la estimación de la TFG expresda en m^2 o en base al volumen de fluido extracelular (Heiene y Moe, 1998; Goy-Thollot *et al.,* 2006).

La concentración en el plasma y en la orina de los marcadores radiográficos empleados en los pacientes se espera que varíen dentro de un intervalo, basado en varios factores como la dosis administrada, tiempo, la TFG y la tasa de eliminación (Shihabi y Constantinescu,1992). La ECZ es una técnica que permite cuantificar aun pequeñas concentraciones de analitos (Jenkins, 2000), por lo tanto, la dosis administrada de estos medios de contraste en los pacientes para determinar la TFG es mínima, con lo cual se disminuye la posibilidad de presentación de reacciones secundarias aun en pacientes con enfermedades renales (Frennby y Sterner, 2002). El riesgo de presentarse nefrotoxicidad está relacionado al volumen del medio de contraste y al disminuirse el volumen del medio administrado, puede disminuirse el subsecuente riesgo de nefrotoxicidad (Rosovsky y Rusinek, 2006).

En nuestro país no se tienen reportes de estudios de aclaramiento para la medición de la TFG en perros. Esto posiblemente es debido a que implica conocer e interpretar los aspectos/conocimientos relacionados con modelos farmacocinéticos, la existencia de infraestructura instrumental para su análisis, el tiempo necesario que se emplea en la aplicación de los diferentes protocolos y el

costo que representa su estudio. Aparte del aclaramiento renal con la inulina no existe actualmente un método universalmente aceptado como referente que se aplique en pequeñas especies.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que el método desarrollado de ECZ usando como marcadores a los medios de contraste radiográficos iotalamato, iohexol y al iopamidol por aclaramiento renal permite obtener un buen indicador de la TFG en perros sanos. También permite el uso alterno de los marcadores radiográficos iohexol y del iopamidol. Actualmente el iotalamato es accesible en costo y existencia en el mercado, su principal desventaja es que es un medio de contraste de tipo iónico, que se ha asociado a un mayor número de casos de nefrotoxicidad; sin embargo, el volumen administrado en los pacientes con este método es bajo (0.5 mL en animales de menos de 20 kg de peso corporal). El iotalamato presentó un mayor tiempo de migración en comparación al iohexol y el iopamidol y su señal se observó cerca a otros picos desconocido en diferentes muestras de orina de perro. Los medios de contraste radiográficos no iónicos como iohexol y el iopamidol tienen menos reportes de reacciones adversas. Aún así, el iopamidol tiene una menor incidencia de reacciones adversas en comparación con el iohexol. Por esto, se puede recomendar su uso en pacientes con reacciones secundarias a los medios de contrasta iodados o en pacientes con daño renal avanzado (Verow *et al.*, 1995 Verow *et al.*, 1995).

El método desarrollado en este trabajo es sencillo y cumple con los parámetros de validación establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2004 por lo que puede ser utilizado en estudios de aclaramiento renal para la determinación de la TFG. Los medios de contraste radiográficos usados en este trabajo actualmente son accesibles en nuestro medio.

IX. CONCLUSIONES

En este trabajo se desarrolló y valido un método sencillo para ECZ en que indistintamente se pude usar al iotalamato, iohexol y al iopamidol como marcadores calcular la TFG en perros. Este método cumple con los parámetros de validación tal y como se especifica en la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-177-SSA1-2004.

El método desarrollado en este trabajo es sencillo, especifico, lineal, preciso y exacto por lo que puede ser utilizado en estudios de aclaramiento renal para la determinación de la TFG.

La medición de la TFG por aclaramiento renal es práctico cuando se puede colectar completamente la orina, ya que requiere un tiempo relativamente corto para el muestreo, se debe poner especial énfasis en la colección completa de la orina, lo que puede ser una limitante en especial en perras prepúberes o animles pequeños. Los medios de contraste radiográficos usados en este método actualmente son accesibles en nuestro medio.

X. PERSPECTIVAS

Los resultados del presente estudio muestran que el método desarrollado para la ECZ con los marcadores radiográficos iodados iotalamato, iohexol y el iopamidol permiten determinar la TFG en perros sano. Se espera que otros medios radiográficos de contraste iodados que tienen las mismas propiedades farmacocinéticas empleando este método ofrezcan resultados similares.

El presente estudio se realizo en animales jóvenes sanos, y se propone obtener los valores de la TFG con este método en animales de diferentes edades: cachorros, animales jóvenes prepúberes, adultos y perros geriátricos sanos y con enfermedad renal en diferentes grados.

Debido al efecto que se ha observado entre el tamaño del animal con la superficie corporal y la relación con la TFG, se pueden realizar estudios para obtener valores de referencia de acuerdo a la talla de los perros: menores de 12; de 12.1 a 25; 25.1 a 50 y mayores de 50 kgs.

Por la posibilidad de que se presente interferencia de picos en los EFG por medicamentos administrados en los pacientes con los picos de los marcadores usados es necesario realizar pruebas en sangre y orina de animales que hayan recibido diferentes fármacos.

Empleando este método de ECZ para medir la TFG se puede calcular la TFG por aclaramiento plasmático.

VIII BIBLIOGRAFÍA

Alanis C.L.J. 1988. Fundamentos sobre urología clínica en perros y gatos. Ed. UNAM. México, D.F. p. 1-8.

Allen T.A. y Gross K.L. 1996. La enfermedad renal y las mascotas: la historia del fósforo. Revista AMMVEPE 7: 144-146

Altria K.D. 1999. Overview of capillary electrophoresis and capillary electro chromatography. J. Chromatogr 856: 443-63.

Arakawa K., Suzuki H., Naitoh M., Matsumoto A., Hayashi K., Matsuda H., Achihara A., Kubota E., Saruta T. 1996. Role of adenosine in the renal responses to contrast medium. Kidney Int. 49 : 1199-1206.

Aurell M. 1994. Accurate and feasible measurements of GFR-is the iohexol clearance the answer?. Nephrol Dial Transplant. 9:1222-1224.

Back S.E., Krutzen E., Nilsson-Ehle P. 1988a. Contrast media as markers for glomerular filtration: a pharmacokinetic comparison of four agents. Scand J Clin Lab Invest 48:247–253.

Back S.E., Masson P., Nilsson-Ehle P. 1988b. A simple chemical method for the quantification of the contrast agent iohexol, applicable to glomerular filtration rate measurements. Scand J Clin Lab Invest 48:825-829.

Bajaj, G., Alexander, S.R., Browne, R., Sakarcan, A., Seikaly, M.G. 1996. ^{125}Iodine-iothalamate clearance in children. A simple method to measure glomerular filtration. Pediatri Nephol 10:25-28.

Banks W. J. 1993. Urinary System, Chapter 23 En: Applied veterinary histology. 3ra edición. Edit. Mosby. London. pp. 374-389.

Barbour, G.L., Crumb, C.K., Boyd, C.M., Reeves, R.D., Rastogi, S.P., Patterson, R.M. 1975. Comparison of inulin, iothalamate, and ^{99m}TC-DTPA for the measurement of glomerular filtration rate. J of Nuclear Medicine.17:317-320.

Barrera C.R. 2007. Valoración de los distintos métodos laboratoriales empleados en el diagnóstico de la insuficiencia renal crónica en perros. RECVET. Vol. II. No 01-04, enero-abril 2007. <http://www.veterinaria.org/revistas/recvet> (Fecha de consulta 10 de octubre de 2009).

Beckman INC. 1991. Introduction to capillary electrophoresis. Handbook by Beckman Company. Pp. 1-11.

Bergert J.H., Liedtke R.R., Odda R.P., Landers J.P., Wilson D.M. 1997. Development of a nonisotopic capillary electrophoresis-based method for measuring glomerular filtration rate. Electrophoresis 18:1827-1835.

Bexfield, N.H., Heiene, R., Gerritsen, R.J., Risoen, U., Eliassen, K.A., Herrtage, M.E., Michell .R. 2008. Glomerular filtration rate estimated by 3-sample plasma clearance of iohexol en 118 healthy dogs. J Vet Int Med. 22:66-73

Black, D.A.K., Cameron, J.S. 1979. Renal function En: Chemical diagnosis of disease. Brown S.S., Mitcheli E.I. and Young D.S. Editorial Elsevier. USA. p 453.

Boschi, S., Marchesini, B. 1981. High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of iotalamate and o-iodohippurate. J. of Cromatography 224:139-143.

Bourgeois H.F.M. 2007. Enfoque dietético de la insuficiencia renal en perros geriátricos. Veterinary Medicine en español. 2 (2). p 12-14.

Bourin M., Jolliet P., Ballereau F. 1997. An overview of the clinical pharmacokinetics of X-Ray contrast media. Clin. Pharmacokinet. 32: 180- 193.

Bovée K.C., Joyce T. 1979. Clinical evaluation of glomerular function, 24 hour creatinine clearance in dogs. J Am Vet Med Assoc 174:488-491.

Braselton E.W., Stuart K.J., Kruger J.M. 1997. Measurement of serum iohexol by determination of iodine with inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy. Clinical Chemistry 43:1429-1435.

Bronson R.T. 1982. Variation in age at death of dogs of different sexes and breeds.
Brown S.A. 2003.Clinical Assessment of Renal Function: New Methods, Old Ideas. Proceedings 28th Congress of the Word Small Animal Veterinary Assotiation. 24 a 27 de October. Thailand. Consulta en línea.

Brown S.A., Finco D.R., Boudinot F.D., et al. 1996. Evaluation of a single injection method, using iohexol, for estimating glomerular filtration rate in cats and dogs. Am J Vet Res 57:105-110.

Brown, S., Brown, C., Surdy, K. 2006. Clinical evaluation of the kidney In: Proceeding of the 32th Word Small Animal Veterinary Association Congress. Prague, Czech Republic. 11-14 october. Consulta en línea.

Brown S.C.W, O'Reilly P.H. 1991. Iohexol clearance for the determination of glomerular filtration rate in clinical practice: Evidence for a new gold standard. J Urol. 146: 675-679

Burkitt H. G., Young B., Heath J. W. 1993. L'appareil urinaire, Chapter 16 En : Histologie fonctionnelle ed. Weather. Paris France. pp. 282-303.

Castillo B., González R. 1996. Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. Rev Cubana Farm 30:1

Chew D.J., DiBartola S.P. 2007. Prolonging Life and Kidney Function. Proceedings 32thCongress of the Word Small Animal Veterinary Assotiation. 19 al 23 de agust. Sidney, Australia. Consulta en línea. < http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2007&PID=pr18229&O=Generic> [Fecha de consulta 18 de junio de 2008].

Ciccone B. 2001. A buffer system for capillary electrophoresis. American Laboratory; 30-33p.

Cotard J. P. 2009. Insuficiencia renal crónica en el perro y gato. Vanguardia veterinaria. 4:24-32.

Cunninghan G. J. 2005. Fisiología veterinaria. Tercera edición. Ed. Elsevier-Saunders. Madrid, España. pp 430-437.

Deray G., Jacobs C. 1995. Radiocontrast nephrotoxicity. Invest. Radiol. 30 :221-225.

Deray G., Jacobs C. 1996. Renal tolerance of nonionic dimers. Invest. Radiol. 31:372-377.

Desai M.J., Armstrong D.W. 2003. Separation, identification, and characterization of microorganisms by capillary electrophoresis. Microbiology and molecular biology reviews; 67 (1): 38–51.

DiBartola S.P. 2000. Clinical aprproach and laboratory evaluation of renal disease, En: Textbook of Veterinary Internal Medicine. Volumen 2. Editores Ettinger S.J. y Feldman E.C. 5th ed. Saunder ed. Phialdelphia, P.A. pp. 1600-1614.

Duffee N.E., Bevill R.F., Koritz G.D., Schaeffer D.J. 1990. An experimental model for pharmacokinetic analysis in renal failure. J Pharmacokinet Biopharm. 18:71-86.

Effersoe H., Rosenkilde P., Groth S., Jensen Li., Golman K. 1990. Measurement of renal function with iohexol. A comparison of iohexol,99mTc-DTPA, and 51Cr-EDTA clearance. Invest Radiol 25:778-782.

Fenman M.J., Allen T.A., Wike W.L. *et al.* 1985. Single-injection method for evaluation of renal function with 14C-inulin and 3H-tetraehylamnionium bromide in dogs and catas. Am J Vet Res 46:482-485.

Finco D.R., Braselton E.W., Cooper, T.A. 2001. Relationship between plasma iohexol clearance and urinary exogenous creatinine clearance in dogs. Journal ofVeterinary Internal Medicine 15:368-373.

Finco D.R., Brown S.A., Brown C.A., Crowell W.A., Cooper T.A., Barsanti J.A. 1999. Progression of chronic renal disease in the dog. J Vet Intern Med. 13(6):516-28.

Fleischer S., Sharkey M., Mealey K., Ostrander E.A., Martinez M. 2008. Pharmacogenetic and metabolic differences between dog breeds: their impact on canine medicine and the use of the dog and the use of the dog as a preclinical animal model. AAPS J 10: 110-119.

Flrijn K.W., Barendregt N.M., Lentjes E.G.W.M., Dam W.V., Prodjosudjadi W., Saase J.L.C.M.V., Es L.A.V., Chang P.C. 1994. Glomerular filtration rate measurement by “single-shot” injection of inulin. Kidney Internatinal 46: 252-259.

Frandson R. D., Spurgeon T. L. 1995. Anatomía y fisiología de los animales domésticos. Quinta edición. Ed. Mc-Graw Hill interamericana. México, D.F. Pp. 370-372.

Frennby B, Sterner G, Almen T., *et al.* 1996. Clearance of iohexol, chromium-51-ethylenediaminetetraacetic acid, and creatinine for determining the glomerular filtration

rate in pigs with normal renal function: Comparison of different clearance techniques. Academy of Radiology 3:651-659.

Frennby B, Sterner, G., Almen, T.,*et al*. 1995. The use of iohexol clearance to determine GFR in patients with severe chronic renal failure-A comparison between. Clinical Nephrology 43:35-46.

Frennby B. 1997. Use of iohexol clearance to determine the glomerular filtration rate. A comparison between different clearance techniques in man and animal. Scandinavian Journal of Urology and Nephrology;S-182:1-61.

Frennby B., Sterner G. 2002. Contrast media as markers of GFR. Eur Radiol 12:475-484.

Gale M.E., Robbins A.H., Hamburger R.J., Widrich W.C. 1984. Renal toxicity of contrast agents : iopamidol, iothalamate and diatrizoate. Am. J. Research. 142 : 333-335.

Gaspari F., Perico N., Remuzzi G. 1997b. Measurement of glomerular filtration rate. Kidney International 52:S-151-S-154.

Gaspari F.P., Norberto., Matalone M.,Signorini, Orietta., Azzollini, Nadia., Mister, Marilena., Remuzzi, Guiseppe. 1997a. Precision of plasma clearance of iohexol for estimation of GFR in patients with renal disease. Journal of the American Society of Nephrology 9:310-313.

Gaspari, F.A., Perico, N.A., Remuzzi G.A.B. 1998. Application of newer clearance techniques for the determination of glomerular filtration rate. Current Opinion in Nephrology & Hypertension. 7:675-680.

Gaspari, F.A., Mainardi, L., Ruggenenti, P., Remuzzi, G. 1991. High-performance chromatographic determination of iothalamic acid in human plasma and urine. J. of Chomatography, 570: 435-440.

Ghouila T. 1994. La filtration glomérulaire et sa mesure. Revue française des laboratoires, octobre 268 : 24-28.

Giudice E., Giannetto C., Fazio F., Piccione G. 2008. Daily rhythm of creatinine in dog: clinical and diagnostic significance. Biological Rhytm Research (i*first* article)1-7.

Gleadhill A., Michell, A.R. 1996. Evaluation of iohexol as a marker for the clinical measurement of glomerular filtration rate in dogs. Res Vet Sci 60:117-121.

Goldfarb S., McCullough P.A., McDermott J., Gay S.B. 2009. Contrast-induced acute kidney injury: specialty-specific protocols for intervencional radiology diagnostic computed tomography radiology and interventional cardiology. Mayo Clin Proc. 84(2): 170-179.

Goy-Thollot I., Chafotte C., Besse S., Garnier F., Barthez P.L. 2006. Iohexol plasma clearance in healthy dogs and cats. Veterinary Radiology and Ultrasound

Grainger R.G. 1982. Patiente reactions during hexabrid, opamidol and Conray angiography En: Contrast Media in radiology.Appraisal and prospects. New York, USA. pp. 265-268.

Guyton A.C., Hall J.E. 2000. Urine formation in the kidneys: I. Glomerular filtration, renal flow, and control. En: Textbook of Medical Physiology. Vol. I (ed. 11).Ed. Saunders. Philadelphia, PA. pp. 279-294.

Hagen B. 1984. Systeische und locale reaktionen bei der beinphebographie unter besonderer berucksichtigung postphiebographischer komplikationen. Radiologe 24:46-50.

Hall, P.M., Rolin, H. 1995. Iothalamate clearance and its use in large-scale clinical trials. Current Opinion in Nephology and Hypertension. 4:510-513.

Harris C. D. 2001. Análisis químico cuantitativo. Segunda edición. Editores Reverte. Barcelona-Bogotá- Buenos Aires- Caracas-México. 22:609-626.

Heiene R, Moe L. 1999. The Relationship between some plasma clearance methods for estimation of glomerular filtration rate in dogs with pyometra. J Vet Intern Med 13:587-596.

Heiene R. y Moe L. 1998. Pharmacokenetic aspects of measurement of glomerular filtration rate in the dog: a review. J Vet Intern Med 12:401-414.

Hellerstein S., Berenbom M., Alon U., Warady B.A. 1993. The renal clearance and infusion clearance of inulin are similar, but no identical. Kidney International 44:1058-1061.

Heymsfield, S.B., Arteaga, C., Maccanus, C., Smith, J., Moffitt, S. 1983. Measurement of muscle mass in humans: Validty of the 24 hour urinary creatinina method. Am J Clin Nuctr.; 37;478-94

Hjorth L., Wiebe T., Karpman D. 2002. Correct evaluation of renal glomerular fitration requires clearance assays. Pediatr Nephrol 17:847-851.

Hoste E.A., Damen J., Vanholder R.C., Lameire N.H., Delanghe J.R., Hauwe K.V., Colardyn F.A. 2005. Nephrol Dial Trasplant 20:747-753

Hubaux A., Vos G. 1970. Detection and decision limits for linear calibration curves. Anal Chem 42:849.

Humes H.D., Weinberg, Joel M. 1986. Toxic nephropathies En: The Kidney, B. M. Brenner, Rector Jr., Floyd C, ed. Philadelphia PA. ed. W.B. Saunders, pp. 1491-1532.

Idee J.M., Bonnemain B. 1996. Reliability of experimental models of iodinated contrast media-induced acute renal failure. Invest. Radiol. 31 : 230-241.

Ihle S.L., Kostolich M. 1991. Acute renal failure associated with contrast medium administration in a dog. J. Am. Vet. Med. Assoc. 199 : 899-901.

Imai, E., Horio, M., Iseki, K., Yamagata, K., Watanabe, T., Hara, S., Ura, N., Kiyohara, Y., Hirakata, H., Moriyama, T., Ando, Y., Nitta, K., Inaguma, D., Narita, I., Iso, H., Wakai, K., Yasuda, Y., Tsukamoto, Y., Ito, S., Makino, H., Hishida, A., Matsuo, S. 2007. Prevalence of chronic kidney disease (CKD) in the Japanese general population predicted by the MDRD equation modified by a Japanese coefficient. Clin. Exp. Nephrol. 11: 156-163.

International Renal Interest Society. 1996. Guidelines on the diagnosis and assessment of progression of renal disease in small animals (IRIS Staging of CKD). Consulta en línea.

http://www.iris-kidney.com/guidelines/en/staging_ckd.shtml [Fecha de consulta 15 de agosto de 2008].

Izzat N.N., Rosborough J.P. 1989. Renal function in concisous dogs: potential effect of gender on measurement. Res Exp Med 189:371-379

Jayewardene A.L., Seneviratne A.K., Gambertoglio J.G. 1994. Paired ion reversed-phase HPLC assay for the simultaneous determination of iothalamic acid and para aminohippuric acid in plasma. *J. Liquid Chromatography*. 17 : 2395- 2412.

Jenkins M.A. 2000. Clinical aplications of capillary electrophoresis. Molecular biotechnology. 15:201-209

Katzberg R.W. 1997. Urography into the 21st century : new contrast media, renal handling, imaging characteristics, and nephrotoxicity. Radiology 204 : 297- 312.

Kerl M.E., Cook C.R. 2005. Glomerular filtration rate and renal scintigraphy. Clin Tech Small Anim Pract 20:31-38.

Khoury G.A., Hopper J.C., Varghese Z., Farrington K., Dick R., Irving K.D., Sweny P., Fernando O.N., Moorhead J.F. 1983. Nephrotoxicity of ionic and no-ionic contrast material in digital vascular imaging and elective renal arteriography. Brit J Radiol 56:631-635.

Krawiec D.R., Itkin R.J. 1997. Cuando y como medir el índice de filtración glomerular y el flujo de plasma renal efectivo En: Terapéutica Veterinaria en Pequeños Animales XII. Editores Kirk y Bonagura. Editorial McGraw-Hill Interamericana. México. Pp. 1003-1005.

Krutzen E., Back S.E., Nilsson-Ehle I., Nilsson-Ehle P. 1984. Plasma clearance of a new contrast agent, iohexol: a method for the assessment of glomerular filtration rate. J Lab Clin Med. 104:955–961

Krutzen E., Back S.E., Nilsson-Ehle P. 1990. Determination of glomerular filtration rate using iohexol clearance and capillary sampling. Scand J Clin Lab Invest 50:279–283

Labato M.A., Ross L.A. 1991. Plasma disappearance of creatinine as a renal function test in the dog. Res Vet Sci 50:253-258.

Laroute V., Chetboul V., Roche L., Maurey C., Costes G., Pouchelon J-L., La Farge F., Boussouf, Lefebvre H.P. 2005. Quantitative evaluation of renal fintion in healthy Beagle puppies and mature dogs. Research Vet Sci 79:161-169.

Laroute V., Lefebvre H.P., Costes G., et al. 1999. Measurement of glomerular filtration rate and effective renal plasma flow in the conscious beagle dog by single intravenous bolus of iohexol and paminohippuric acid. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods 41:17-25.

Levey A.S. 1989. Use of glomerular filtration rate measurement to assess the progersion of renal disease. Semin Nephrol 9: 370-379.

Lindblad H.G., Berg U.B. 1994. Comparative evaluation of iohexol and inulin clearance for glomerular filtration rate determinations. Acta Paediatr 83:418-422.

Linhardt R. J., Toida T. 2002. Ultra-high resolution separation comes of age. Science; 298: 1441-1442.

Lulich,P., Osborne,C.A. 1990. Interpretation of urine proteine-creatinine ratios in dogs with glomerular and nonglomerular disorders. The Compendium- Small Animal. Vol. 12; 1: 59-71.

MacGregor M.S., Boag D.E., Innes A. 2006. Chronic kidney disease: evoling strategies for detection and magnament of impaired renal function. Q J Med 99:365-375.

Maldonado B.N. 2003. Frecuencia de casos médico quirúrgicos en una clínica veterinaria de la ciudad de Morelia. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Mich. 30 de enero del 2003.

Mc Gavin M.D., Zachary J.F. 2007. Urinary system En: Pathologic basis of veterinary disease. 4a ed. Edit. Mosby-Elsevier. Missouri, USA. p. 613.

Meucci, V.; Gasperini, A.; Soldani, G.; Guidi, G., Giorgi, M. 2004. A new HPLC method to determine glomerular filtration rate and effective renal plasma flow in conscious dogs by single intravenous administration of iohexol and p-aminohippuric acid. J Chromatogr Sci. 42:107.

Miyamoto K. 2001. Use of plasma clearance of iohexol for estimating glomerular filtration rate in cats. Am J Vet Res 62:572-575.

Moe L., Heiene R. 1995. Estimation of glomerular filtration rate in dogs with 99M-Tc-DTPA and iohexol. Research in Veterinary Science 58:138-143.

Moreno C. E., Vidal D., Barajas L. I.N., Solorio R. J.L. 2007. Factores de riesgo asociados a la insuficiencia renal en perros. Memorias del V Congreso Internacional de Epidemiología Veterinaria. Asociación Mexicana de Epidemiólogos Veterinarios A.C. Villahermosa, Tabasco. 271-299.

Morkos S.K. Contrast media-induced nephrotoxicity : questions and answers. 1998. The British Br J Radiol. 71(844):357-365.

Morkos S.K., El Nahas A.M. 1998. Advances in the understanding of the nephrotoxicity of radiocontrast media. Nephron 78 : 249-252.

Mourou M. 2002. Utilisation de la clairance plasmatique de l'iothalamate pour la détermination du débit de filtration glomérulaire chez le chien : comparaison avec les autres méthodes. Ph D Thesis. Université de Toulose. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. Tolouse, France.

Nankivell, B.J. 2001. Creatinine clarance and the assessment of renal function. Australian Prescriber. Vol.24; 1: 15- 17.

Nilsson-Ehle P., Grubb A. 1994. New markers for the determination of GFR: iohexol clearance and cystatin C serum concentration. Kidney Int 46(Suppl):17–19.

Nygren A., Ulfendahl H.R. 1989. Effects of high and low osmolar contrast media on renal flow and glomerular filtration rate in euvolaemic and dehydrated rats. Acta Radiol. 30: 383-389.

Odda R.P., Landers J.P. 1996. introduction to capillary electrophoresis En:Handbook of capillary electrophoresis. Oda R.P. and Landers JP, Editors. 2nd. Ed. CRC Press, Boca Raton. 7-8 p.

O'Dell-Anderson K.J., Twardock R., Grimm J.B., Grimm K.A., Constable P.D. 2006. Determination of glomerular filtration rate in dogs using contrast-enhanced computed tomography contrast-enhanced computed tomography (CT) in eight healthy dogs. Vet Radiol Ultrasound 47(2):127-35.

Odlind B, Hällgren R., Sohtell M., Lindström B. 1985. Is ^{125}I iotalamte an ideal marker for glomerular filtration?. Kidney Int 27:9-16.

Ohashi F., Kuroda K., Shimada T., Shimada Y., Ota M. 1996. The iothalamate clearance in cats with experimentally induced renal failure. J. Vet. Med. Sci. 58 : 803-804.

Olsson B.A.A., Sveen K., Andrew E. 1983. Human Pharmacokinetics of iohexol: A new ionic contrast medium. Invest Radiol 18:177-182.

Osborne C.A., Fletcher T.F. 1995. Applied anatomy of the urinary system with clinicophathologic correlation. En: Canine and feline nephrology and urology. vol. III. Lea and Eebiger Baltimore. E. U. A. p 3-28.

Peters A.M. 2003. The kinetic basis of glomerular filtration rate measurement and new concepts of indexation to body size. European J of Nuclear Medicine and Molecular Imaging. 31, 1:138-149

Pihl B. 1974. The single injection technique for determination of renal clearance. V A comparison with the continuous technique in the dog and in man. Scand J. Urol Nephrol 8:147-154.

Pihl B., Nosslin B. 1974. The single injection technique for determination of renal clearance.I Clearance of iotalamate and iodohippurate in dogs. Scand J. Urol Nephrol 8:138-146.

Pitrè D., Tirone P., Viviani G. 1980. Radiopaque contrast media. XLVI - Preliminary studies of the metabolism of iopamidol in the dog, the rabbit and man. Farmaco [Sci]. 35:826-35.

Polzin D.J., Osborne C.A., Jacob F., Ross S. 2000. Chronic renal failure En: Texbook of Veterinary Internal Medicine. S.J. Ettinger y E.C. Feldman eds. 5a ed. Editorial W.B. Saunders, PA, USA. pp. 1634-1662.

Polzin J. D., Osborne A. C., Ross S. 2007. Nefropatías crónicas. En: Tratado de Medicina Interna Veterinaria. Editores Ettinger J. S. y Feldman C.E. Vol. II. Madrid, España. pp. 1756-1785.

Polzin, F. 2007. Urología en perro y gatos. Memorias de las XX Jornadas Médicas del Departamento de Medicina, Cirugía y Zootecnia para Pequeñas Especies de la Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. pp. 30-45.

Prueksaritanont T., Lui C.Y., Lee M.G., Chiou W.L. 1986. Renal and nonrenal clearances of iothalamate. Biopharmaceutics & drug disposition 7:347-355.

Pugliese A., Gruppillo A., Di Pietro S. 2005. Clinical nutrition in gerontology: chronic disorders of vthe dog and cat. Veterinary Research Communications 29 (suppl. 2):57-63.

Reyers, F. 2003. Renal function assessment: the strengths and weaknesses of various parameters. Proceedings 28th Congress of the Word Small Animal Veterinary Assotiation. Bankok, Thailandia. Consulta en línea. http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2003&PID=6560 [fecha de consulta: 30 de septiembre de 2008].

Rivas, L., Rodriguez A., Eleno N., López J.M. 1997. Nefrotoxicidad: análisis de mecanismos básicos. Nefrología 15:44- 48.

Robinson-Fuentes, V.A. 2006. Notas del curso: Introducción a la Electroforesis capilar. División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez" de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Mich. pp. 4-5

Rose B.D. 1985. Estudio clínico de la función renal En: Fisiopatología de las enfermedades renales. 1a ed. en español. Editorial McGraw-Hill de México. España. pp. 1-6.

Rosovsky M., Rusinek H. 2006. Dose-related Nephrotoxicity. Radiology 240:614

Rudnick M.R., Goldfarb S., Wexle L., Ludbrook P.A., Murphy M. J Am J Vet Res. 43:2057-2059.

Sage M.R., Wilcox J., Evill C.A., Benness G.T. 1983. Comparison of blood-barrier disruption by intracarotid iopamidol and methyglucamina iothamate. Am J Neuroradiol 4:893-895.

Sanderson S. 2005. Current Concepts for the Management of Chronic Renal Failure in the Dog and Cat--Early Diagnosis and Supportive Care. Proceedings 30th Congress of the Word Small Animal Veterinary Assotiation. México. Consulta en línea. http://www.vin.com/Members/Proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2005&PID=pr10999&O=Generic> [Fecha de consulta 20 de agosto del 2008].

Sarkar, D.P., Rajeshwari, G., Shivaprakash. 2005. Cistatin C-Novel marker of glomerular filtration rate: a review. Indian Journal of Clinical Biochemistry 20: 139-144

Schwartz G.J., Furth S., Cole S., Warandy B., Muñoz A. 2006. Glomerular filtration rate via plasma iohexol disapperance: Pilot study for chronic kidney disease in children. Kidney Int 69: 2010-2077.

Schwartz, G. J., Furth, S.L. 2007. Glomerular filtration rate measurement and estimation in chronic kidney disease. Pediatr Nephrol 22:1839–1848.

Senior D.F. 2005. Causas de progresión de la insuficiencia renal crónica. Memorias del 30o Congreso de la Word Small Animall Veterinary Assotiation. México, D.F.

Shemesh O., Goldbetz H., Kriss J.P., Myers B.D. 1985. Limitations of creatinine as a filtration marker in glomérulopathic patients. kidney Int 28:830-838.

Shihabi Z. K., Rocco M. V., Hinsdale M. E. 1995. Analysis of the Contrast Agent opamidol in Serum by Capillary Electrophoresis. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 1520-572X, 18:3825 – 3831

Shihabi Z.K., Constantinescu M.S. 1992. Iohexol in serum determined by capillary electrophoresis. Clin Chem 38:2117-2120.

Shihabi Z.K., Thompson, E.N., Constantinescu, M.S. 1993. Iohexol determination by direct injection of serum on the HPLC column. Journal of Liquid Chromatography 16:1289-1296.

Smith, H.W. 1951. The kidney: structure and funtion in health and disease. Oxford University Press. New York, USA, pp. 39-62.

Steinhausen M., Endlich K., Weigman D.L. 1990. Glomerular blood flow. Editorial rewiew. Kidney Intenational 38:769-784.

Steven S.A., Lowe J. 1998. L'appareil urinaire in : Histologie. Ed Pradet, Chapitre 16. France. pp 271-299.

Stockham S.L., Scott N.A. 2008. Urinary system En: Fundamentals of veterinary clinical pathology. 2da ed. Edit. Blackwell publishing. Iowa, USA. p. 417.

Stocking C.J., Slater J.M., Simson C.F. Applications of Capillary Electrophoresis in Nephrology. Exp Nephrol 6:415-420.
The Merk Index. 1996. Budavari S. editor. 12a edición. Publicado por Merck Research Laboratories. EEUU. pp. 5077

Thomsen H.S., Bush Jr W.H. 1998. Treatment of the adverse effects of contrast media. Acta Radiol 39 : 212-128.

Tornquist C, Almen,T., Golman,K., Holtas, S. 1985. Renal function following nephroangiography with metrizamide and iohexol. Effects on renal blood flow, glomerular permeability and filtration rate and diuresis in dogs. Acta Radiol Diagn 26:483-489.

Torres Z.A. 1988. Apuntes sobre la historia de la nefrología en los últimos 50 años**.** Academia Nacional de Medicina de la República del Perú. (Consulta en línea 15 diciembre de 2009).
http://www.acadnacmedicina.org.pe/publicaciones/anal_2000/I_APUNTESSOBRELAHISTORIADELANEFROLOGIA.pdf

Uozumi J., Nakamura M., Soejima K. 2001. Nephotoxic effects of ionic and noionic contrast media on rat and human renal cortical slices. Clin Exp Nephrol 5:97-102.
Van Lente F.; Sult P. 1989. Assessment of renal funtion by serum creatinine and creatinine clearance: glomerular filtration rate estimated by four procedures. Clin Chem 35: 2326-2330.

Verow P., Nossen J.O., Sheppick A*, et al.* 1995. A comparison of iodixanol with iopamidol in aorto-femoral angiography. Brit J Radiology 68:973–978.

Walser M., Drew H.H., Guldan J.L. 1993. Prediction of glomerular filtration rate from serum creatinine concentration in advanced chronic renal failure. Kidney International 44:1145-1148.

Walser M., Drew H.H., LaFrance N.D. 1988. Creatinine measurements often yield false estimates of progression in chronic renal failure. Kidney Internationl 34:412-418.

Watson A.D, Lefebvre H.P., Concordet D, Laroute V, Ferré JP, Braun JP, Conchou F, Toutain PL. 2002 Plasma exogenous creatinine clearance test in dogs: comparison with other methods and proposed limited sampling strategy. J Vet Intern Med. Jan-Feb;16:22-33.

Watson A.D.J., Lefebvre H.P., Concordet D. *et al.* 2002. Plasma exogenous creatinine clearance test in dogs: comparison with other methods and proposed limited sampling strategy. J Vet Int Med 16:22-33.

Wilson, D.M., Bergert, J.H., Larson, T.S., Liedtke, R.R. 1997. GRF determined by nonradiolabeled iothalamte using capillary electrophoresis. American Journal of Kidney Diseases. 30: 646-652.

Wilson, D.M., Bergert, J.H., Larson, T.S., Liedtke, R.R. 1999. Use of capillary electrophoresis to determine glomerular filtration rate using iothalamate. United States Patent. Patent number 5,989,198. Date of patent: Nov. 23, 1999. Consulta en línea. <http://www.patentstorm.us> [Fecha de consulta 15 de agosto de 2008].

IX ANEXOS

Anexo 1. Resultados de análisis clínicos realizados a los perros.

HEMOGRAMA								
ANALITO	**UNIDADES**	**VALOR DE REFERENCIA**	**PERRO 1**	**PERRO 2**	**PERRO 3**	**PERRO 4**	**PERRO 5**	**PERRO 5**
HEMATOCRITO	L/L	0.37 - 0.55	0.55	0.41	0.42	0.42	0.48	0.49
HEMOGLOBINA	g/L	120 - 182	182	138	143	143	163	165
ERITROCITOS	10e 12/L	5.5 - 8.5	8.5	6.2	6.4	6.4	7.3	7.4
VGM	f/L	60 - 72	65	66	66	65	66	66
CGMH	g/L	320 - 360	342	336	341	340	339	337
RETICULOCITOS	10e 9/L	< 60	-	-	-	-	-	-
PLAQUETAS	10e 9/L	160 - 700	430	Cùmulos suf	404	432	Cùmulos suf	328
PROTEINAS P.	g/L	60 - 75	73	70	81	68	70	73
FIBRINÓGENO	g/L		-	-	-	-	-	-
LEUCOCITOS	10e 9/L	6.0 - 17.0	12.5	10.7	9.4	10.7	9.9	11.5
DIFERENCIAL								
Neutrófilos seg.	10e 9/L	3.0 - 11.5	5.6	4.9	3.4	3.4	3.6	6
Neutrófilos banda	10e 9/L	0 - 0.3	0.5	0.2	0.4	0.1	0	0.5
Metamielocitos	10e 9/L	0	0	0	0	0	0	0
Mielocitos	10e 9/L	0	0	0	0	0	0	0
Linfocitos	10e 9/L	1.0 - 4.8	4.5	4.3	4.6	5.4	4.9	4.8
Monocitos	10e 9/L	0.1 - 1.4	0.5	0.2	0.4	0.3	0.4	0
Eosinófilos	10e 9/L	0.1 - 0.9	1.4	1.1	0.6	1.5	1	0.2
Basófilos	10e 9/L	Raros	0	0	0	0	0	0

QUÍMICA SANGUÍNEA								
ANALITO	UNIDADES	VALOR DE REFERENCIA	PERRO 1	PERRO2	PERRO 3	PERRO 4	PERRO 5	PERRO 6
UREA	mmol/L	2.6 - 7.91	4.9	4	3.9	5	4	3.3
CREATININA	mmol/L	< 126	89	85	97	66	86	89
PROTEINAS TOT.	g/L	56.6 - 74.3	70	66	77	65	68	69
ALBUMINA	g/L	28.1 - 37.2	31	31	32	31	32	31
CALCIO	mmol/L	2.27 - 2.91	2.52	2.35	2.45	2.31	2.69	2.55
FÓSFORO I.	mmol/L	0.78 - 1.72	2.01	2.1	2.01	3.02	1.97	2.19
SODIO	mmol/L	141 - 153	148	142	146	147	144	147
POTASIO	mmol/L	3.82 - 5.34	5.41	5.05	5.22	5.03	5.7	5.61
CLORO	mmol/L	108 - 117	117	110	114	110	112	112
BICARBONATO	mmol/L	17 - 25	19	16	17	15	16	17
ANION GAP	Calculado	12 - 24	17	21	20	27	22	24
DIF IONES F.	Calculado	30 - 40	31	32	32	37	32	35

URIANÁLISIS						
EXAMEN FÍSICO	Perro 1	Perro 2	Perro 3	Perro 4	Perro 5	Perro 6
Aspecto	Claro	Claro	Claro	Claro	Claro	Turbio
Color	Amarillo	Amarillo	Amarillo	Amarillo	Amarillo	Amarillo
pH	6.5	7	7	7	8	6
Densidad	1.023	1.018	1.028	1.02	1.028	1.035
EXAMEN QUÍMICO						
Nitritos	Negativos	Negativos	Negativos	Negativos	Negativos	Negativos
Glucosa	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
Cpos. Cetónicos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Proteínas	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Bilirrubina	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Urobilinógeno	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
Sangre	+	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Hemoglobina	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Mioglobina	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Mioglobina						
EXAMEN MACROSCÓPICO						
Eritrocitos	0/400x	0/400x	0/400x	0/400x	0/400x	0/400x
Leucocitos						
CÉLULAS	+	+	0/400x	0/400x	0/400x	0/400x
Renales	0/400x	0/400x	0/400x	0/400x	0/400x	0/400x
Transitorias	0/400x	0/400x	0/400x	0/400x	0/400x	0/400x
Escamosas	++	+	0/400x	0/400x	0/400x	0/400x
CILINDROS	0/400x	0/400x	0/400x	0/400x	0/400x	0/400x
CRISTALES	Negativo	Negativo	Ocasionales	Negativo	Negativo	Ocasionales
Espermatozoides	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Bacterias	+	+	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Anexo 2. Valores de la presión arterial periférica por oscilometría en los perros (mmHg).

Perro	Presión Arterial Sistólica	Presión Arterial Diastólica	Presión Arterial Media	Frecuencia Cardiaca
1	102	34	49	61
2	94	47	65	76
3	101	55	72	84
4	131	66	95	105
5	102	41	75	149
6	123	70	91	97

Anexo 3. Reportes de estudios histopatológicos de las biopsias renales

Perro	Reporte
1	Se revisaron secciones de tejido renal en el cual se observaron estructuras glomerulares, túbulos proximales y distales sin cambios patológicos aparentes, ni actividad parasitaria, bacteriana, viral o neoplásica.
2	Se revisaron secciones de tejido renal en el cual se observaron estructuras glomerulares, túbulos proximales y distales sin cambios patológicos aparentes, ni actividad parasitaria, bacteriana, viral o neoplásica.
3	Se revisaron secciones de tejido renal en el cual se observaron estructuras glomerulares, túbulos proximales y distales sin cambios patológicos aparentes, ni actividad parasitaria, bacteriana, viral o neoplásica.
4	Se revisaron secciones de tejido renal en el cual se observaron estructuras glomerulares, túbulos proximales y distales sin cambios patológicos aparentes, ni actividad parasitaria, bacteriana, viral o neoplásica.
5	Se revisaron secciones de tejido renal en el cual se observaron estructuras glomerulares, túbulos proximales y distales sin cambios patológicos aparentes, ni actividad parasitaria, bacteriana, viral o neoplásica.
6	Se revisaron secciones de tejido renal en el cual se observaron estructuras glomerulares, túbulos proximales y distales sin cambios patológicos aparentes, ni actividad parasitaria, bacteriana, viral o neoplásica.