

Nefrototoxicidad de gentamicina y netilmicina en rata. Cuantificación y cualificación de glomérulos

M. Núñez, J. Núñez, C. Soler, M. S. Cruz y A. Núñez*

Departamento de Biología Animal, Biología Celular, Genética y Parasitología
Facultad de Biología
Universidad de Valencia
46100 Valencia (España)

(Recibido el 20 de mayo de 1987)

M. NUÑEZ, J. NUÑEZ, C. SOLER, M. S. CRUZ and A. NUÑEZ. *Nephrotoxicity of Gentamicin and Netilmycin in Rat. Quantification and Qualification of Glomeruli*. Rev. esp. Fisiol., 44 (1), 41-44, 1988.

The application via i.v. jugular, in rats, of two fluorochromes (rhodamine 6GO and phosphine 3R) with a 10 min interval, allows the direct observation of nephronal corpuscles using an epifluorescent microscopical technique, as well as their eventual quantification and qualification into normal or semifunctional corpuscles. In rats previously treated by i.p. injection of gentamicin or netilmycin a decrease of the active nephronal population as well as an increase of the percentage of semifunctionality has been noticed.

Key words: Gentamicin, Netilmycin, Nephronal corpuscles, Fluorochromes.

Los antibióticos aminoglicosídicos se siguen prescribiendo para el tratamiento general de infecciones graves, a pesar de la existencia actual de otros agentes antimicrobianos nuevos y menos peligrosos desde el punto de vista nefrotóxico. Diversas investigaciones (3, 12) tratan de correlacionar la aplicación de antibióticos aminoglicosídicos con variaciones de la composición de la orina y, en algunos casos (12), con alteraciones de la estructura microscópica renal. Hay pruebas (1) del efecto nefrotóxico de la gentamicina, por haberse detectado la presencia de da-

ños histológicos a nivel de túbulos proximales en riñón de conejo, o los relativos a la acción de los más conocidos aminoglicosídicos sobre la estructura glomerular (6).

La distinta capacidad nefrotóxica y no idéntica potencia antibiótica de varios agentes aminoglicosídicos ha sido objeto de ensayos que permiten clasificarlos en el siguiente orden nefrotóxico decreciente: gentamicina < tobramicina < amikacina < netilmicina (7-11).

Los estudios fisiológicos, que se benefician de las aportaciones tanto clínicas como histológicas y bioquímicas, añaden al conjunto las posibilidades de sus propias técnicas. Entre estas últimas destacan

* A quien debe dirigirse la correspondencia.

los trabajos de CLAUSEN y HOPE (2) y CHEVALIER (5) que recurren a microesferas radiactivas para estudios de cambios hemodinámicos e, indirectamente, para conteo glomerular mediante una técnica no exenta de complicaciones. La inyección de tinta china *in vivo* para la numeración de glomérulos y la existencia de glomérulos adicionales no funcionales vistos por CHEVALIER (4) demuestra que puede haber nefronas «hipoperfundidas», en ciertas circunstancias.

En el presente trabajo se ha utilizado, con estos mismos fines, una sencilla técnica mediante aplicación de fluorocromos *in vivo*, que permite la cuantificación de corpúsculos nefronales y la cualificación de su estado funcional en ratas tratadas con gentamicina o con netilmicina.

Material y Métodos

Se han utilizado ratas Wistar, machos, de 300-400 g mantenidas en condiciones de alimentación y fotoperiodicidad ordinarias.

Dentro de la extensa gama de antibióticos nefrotóxicos, se ha elegido la gentamicina y la netilmicina (esta última con menor poder nefrotóxico), para contrastar la sensibilidad del método. Las dosis utilizadas, aplicadas siempre por vía i.p. han sido: gentamicina (80 mg/ml en suero fisiológico), 40 mg/kg/día, durante 32 días, a un grupo de animales (G-40). Gentamicina (80 mg/ml en suero fisiológico), 100 mg/kg/día, durante 10 días, a un segundo grupo (G-100). Netilmicina (50 mg/ml en suero fisiológico), 100 mg/kg/día, durante 10 días, a un tercer grupo (N-100). Suero fisiológico, en volúmenes equivalentes, a los respectivos grupos de animales de control.

Para el recuento y cualificación glomerular se ha utilizado la siguiente técnica, con aplicación de fluorocromos *in vivo*: Aplicación a cada animal, por vía i.v. yugular y bajo anestesia etérea, de 1

ml/kg de solución acuosa del fluorocromo rodamina 6GO (R6GO) a la concentración de 2,5 mg/ml.

Después de 10 minutos, aplicación, de la misma manera, de solución acuosa del fluorocromo fosfina 3R (F3R) a la concentración de 9 mg/ml y a la dosis de 25 ml/kg, o sea, en exceso. Sacrificio inmediato del animal.

Extracción de los riñones, corte longitudinal de los mismos y observación en fresco de las superficies de corte al microscopio de epifluorescencia.

Resultados y Discusión

Cualificación (tabla I). — Los corpúsculos nefronales que no aparecen fluorescentes con luz excitadora verde, pero que muestran fluorescencia verde con luz azul, indican que por ellos pasó libremente el primer fluorocromo (R6GO) y fueron posteriormente invadidos por el segundo (F3R). Esto permite calificar dichos corpúsculos como *normalmente funcionales*.

Los corpúsculos que muestran fluorescencia amarillo-anaranjada con luz verde demuestran que el primer fluorocromo (R6GO) llegó a ellos pero tuvo dificultad para abandonarlos. Si la observación con luz azul muestra fluorescencia verde en estos mismos corpúsculos, indica que también la F3R los alcanzó. Este doble efecto puede interpretarse como funcionalidad disminuida, o *semifuncionalidad de primer orden*.

Si un determinado glomérulo retiene R6GO (fluorescencia anaranjada con luz verde) pero no presenta fluorescencia verde con luz azul, señala que la F3R no ha podido alcanzarle, lo que se traduce en una semifuncionalidad más intensa o *semifuncionalidad de segundo orden*.

El caso extremo (*afuncionalidad*) se traduciría en falta simultánea de fluorescencia con ambas longitudes de onda, lo cual es difícil de interpretar pues la ausen-

Tabla I. *Criterios de funcionalidad nefronal según fluorescencia emitida.*

Luz de excitación	VERDE	AZUL
Luz fluorescente emitida	R6GO = ANARANJADA Fosfina 3R = (ninguna)	R6GO = Amarillo-pálido Fosfina 3R = VERDE
Fluorescencia emitida por los glomérulos	↓	↓
FUNCIONALES (normales)	(ninguna)	Verde esmeralda
SEMIFUNCIONALES de 1.º orden	Amarillo-anaranjada	Verde amarillento
SEMIFUNCIONALES de 2.º orden	Anaranjado brillante	(ninguna)
AFUNCIONALES	(ninguna)	(ninguna)

cia de fluorescencia podría también deberse, tal vez, a la ausencia, por desgarramiento, del pelotón vascular.

Cuantificación. — El análisis de la varianza, calculado sobre los datos de la tabla II, arroja diferencias significativas entre grupos. Aplicando el test de Tukey-Kramer se comprueba que la población nefronal activa en los animales tratados con gentamicina 100 mg/kg/día/10 días es significativamente menor ($p < 0,01$) que la de los controles y la de los animales tratados con gentamicina 40 mg/kg/día/32 días, no siendo esta última significativamente distinta de la de los controles. No obstante, el valor promedio en el caso de la G-40 es mayor que el de los controles lo que induce a pensar que en

dichas condiciones se reclutan unidades nefronales, no activas en situación normal, en coincidencia con la opinión de CHEVALIER (4).

La aplicación de netilmicina 100 mg/kg/día/10 días reduce el número de glomérulos, de forma semejante a lo observado con G-100, siendo menor la significación de la diferencia ($p < 0,05$). La población promedio contada no está tan disminuida como con G-100.

Porcentaje de funcionalidad. — Los datos recogidos en la tabla III muestran que el porcentaje de semifuncionalidad nefronal aumenta en los animales tratados con gentamicina al incrementar la dosis y que la netilmicina produce resultados intermedios.

Tabla II. *Número total de glomérulos contados por zona renal, sin discriminación de funcionalidad.* Entre paréntesis número de datos. ΣY = Suma de los datos de cada grupo. ΣY^2 = Suma de los cuadrados de los datos de cada grupo.

Grupo	ΣY	ΣY^2	Varianza	Media \pm s.d.
Control (14)	3275	789041	1763,456	233,93 \pm 41,99
N-100 (8)	1487	281651	750,6964	185,88 \pm 27,40
G-40 (10)	2510	653080	2563,333	251,00 \pm 50,63
G-100 (18)	3210	586032	798,9412	178,33 \pm 28,27

Tabla III. Porcentaje de funcionalidad nefronal en animales control y tratados con netilmicina o gentamicina (100 mg/kg/día).

Grupo	Glomerulos normales	Glomerulos semifuncionales
Controles	99,97	0,03
Netilmicina (10 días)	37,5	62,5
Gentamicina (32 días)	95,0	5,0
Gentamicina (10 días)	15,67	84,33

Según los criterios anteriormente expuestos de funcionalidad, con o sin simultáneo conteo de corpúsculos nefronales, puede considerarse el procedimiento presentado en este trabajo como un método rápido, sencillo y reproducible para un primer enjuiciamiento del funcionamiento renal ante la agresión de sustancias nefrotóxicas, pudiendo ser extendido el procedimiento a otros antibióticos o agentes de otra índole. El hecho de hacer innecesaria la ejecución de cortes histológicos es otra ventaja adicional. A pesar del *fading* inherente a muchos fluorocromos en función del tiempo, la R6GO y la F3R preconizadas en nuestra técnica permiten un cómodo recuento y clasificación de corpúsculos (tabla III) para gentamicina y netilmicina. A este respecto, las imágenes coloreadas proporcionadas por los fluorocromos son más expresivas que la variable acumulación de granos de tinta china utilizados en la técnica de CHEVALIER (4) y mucho menos complicada que la utilización de microesferas radiactivas (5). La utilización de varios planos de corte renal permite obtener fácilmente una visión global de la totalidad del órgano. La composición fotográfica de ambas coloraciones, por superimpresión de imágenes con ambas longitudes de onda sobre la misma película fotográfica, permite considerar simultáneamente la distribución de cada fluorocromo.

Resumen

La aplicación por vía i.v. yugular, en ratas, de dos fluorocromos (rodamina 6GO y fosfina 3R) con un intervalo de 10 minutos permite la observación directa mediante microscopio de epifluorescencia de los glomerulos nefronales y su eventual cuantificación y clasificación en normales y semifuncionales. En ratas tratadas previamente por aplicación i.p. de gentamicina o netilmicina, se observa disminución de la población nefronal activa e incremento del porcentaje de semifuncionalidad.

Palabras clave: Gentamicina, Netilmicina, Riñón, Glomerulos, Fluorocromo.

Bibliografía

- Bertelli, A., Gionannini, L. y Paparelli, A.: *Drugs Under Exp. Clin. Res.*, 7, 53-56, 1981.
- Clausen, G. y Hope, A.: *Acta Physiol. Scand.*, 100, 22-32, 1977.
- Cronin, R. E., Bulger, R. E., Southern, P. y Henrich, W. L.: *J. Lab. Clin. Med.*, 95, 463-474, 1980.
- Chevalier, R. L.: *Pediatr. Res.*, 16, 436-440, 1982.
- Chevalier, R. L.: *Pediatr. Res.*, 17, 620-624, 1983.
- Katz, S. M., Sufian, S. y Matsumoto, T.: *Am. J. Pathol.*, 72, 621-624, 1979.
- Kumin, G. D.: *J. Am. Med. Assoc.*, 244, 1808-1856, 1980.
- McCormic, G. C., Weinberg, E., Briziarelli, G., Szot, R. J. y Schwartz, E.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 63, 194-200, 1982.
- Plaut, M. E., Schentag, J. J. y Jusko, W. J.: *J. Med. (Westbury)*, 10, 257-266, 1979.
- Schentag, J. J., Plaut, M. E. y Cerra, F. B.: *Antimicrob. Agents Chemoter.*, 19, 859-866, 1981.
- Smith, C. R., Lipsky, J. J., Laskin, O. L., Hellmann, D. B., Mellits, E. D., Longstreth, J. y Lietman, P.: *N. Engl. J. Med.*, 302, 1106-1109, 1980.
- Soberon, L., Bowman, R. L., Pastoriza-Muñoz, E. y Kaloyanides, G. J.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 210, 334-343, 1979.