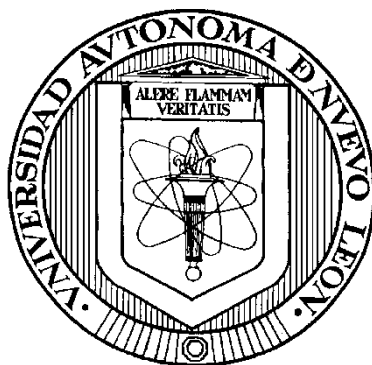


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**ANÁLISIS DEL PERFIL METABOLÓMICO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE
BIOMARCADORES URINARIOS EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE
LAS DIVERSAS FASES DE LA ENFERMEDAD RENAL**

Por

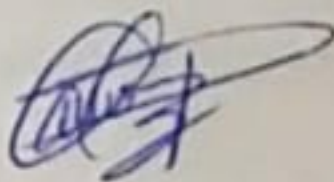
MARLENE MARISOL PERALES QUINTANA

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
Doctor en Ciencias con Orientación en Química Biomédica**

JULIO DE 2019

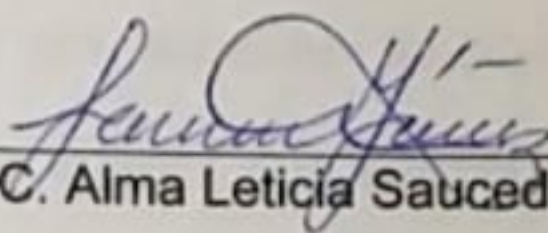
ANÁLISIS DEL PERFIL METABOLÓMICO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES URINARIOS EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE LAS DIVERSAS FASES DE LA ENFERMEDAD RENAL

Aprobación de la Tesis:



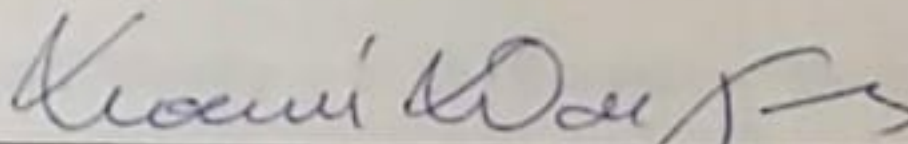
Dr. C. Paula Cordero Pérez

Director de Tesis



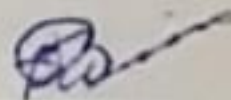
Dr. C. Alma Leticia Saucedo Yáñez

Co-Director de Tesis



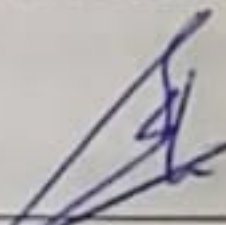
Dr. C. Noemi H. Waksman Minsky

Comisión de Tesis



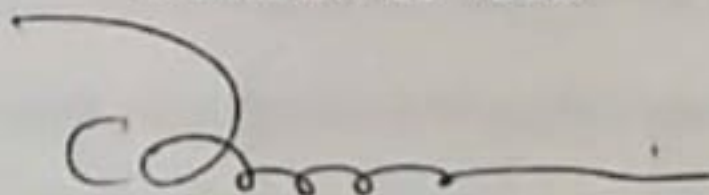
Dr. C. Juan Ricardo Lucio Gutiérrez

Comisión de Tesis



Dr. med. Edelmiro Pérez Rodríguez

Comisión de Tesis



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez

Subdirector de Estudios de Postgrado

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a la **Dra. Paula Cordero Pérez** por darme la confianza, el apoyo y la orientación para mi desarrollo académico y profesional. Gracias por compartir sus conocimientos e instruir con excelencia; por demostrarme con su ejemplo que el trabajo en equipo hace posible aterrizar nuestras ideas y proyectos.

A la **Dra. Alma Saucedo Yáñez** y al **Dr. Ricardo Lucio Gutiérrez** quiero agradecerles por la claridad y exactitud con la que me enseñaron los temas de su campo de expertiz y por haberme acompañado en el dominio de mis conocimientos; por todo el interés que mostraron en cada momento para la realización de este proyecto. Gracias por su comprensión y su ejemplo.

A la **Dra. Noemí Waksman Minsky** y al **Dr. Edelmiro Pérez Rodríguez** les estaré siempre agradecida por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y darme la oportunidad de crecimiento profesional al ingresar a este posgrado. Admiro su calidad humana e intelectual.

A mi familia académica de la **Unidad de Hígado** y el **Departamento de Fisiología**, por haber hecho más ameno cada momento, por brindarme su apoyo y sobre todo por ofrecerme su valiosa amistad.

Gracias a todos por la ayuda y aporte no solo para el desarrollo de mi tesis, sino también para mi vida.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres **Olegario** y **Mary**, quienes han sido y seguirán siendo siempre mi guía y ejemplo. Siendo quienes me formaron moral, espiritual y académicamente en la persona que soy ahora. Gracias por siempre sentirse orgullosos de mí.

A mis hermanos **Hazel** y **Oleg**, que siempre me brindan el ánimo y alegría para seguir adelante. Espero ser el mejor ejemplo para ustedes.

Pero, sobre todo este trabajo está dedicado a mi marido y mi hijo, **mis Diegos**. Gracias por su paciencia, comprensión y solidaridad, por el tiempo que me han concedido, momentos sacrificados de nuestra vida como familia. Sin su apoyo este trabajo no habría sido terminado y por eso, este trabajo también es suyo.

RESUMEN

Marlene Marisol Perales Quintana

Fecha de Graduación: 2019

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del Estudio: ANÁLISIS DEL PERFIL METABOLÓMICO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES URINARIOS EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE LAS DIVERSAS FASES DE LA ENFERMEDAD RENAL.

Número de páginas: 134

Candidato para el grado de Doctor en Ciencias

Área de Estudio: Ciencias de la Salud

Propósito y Método del Estudio: La enfermedad renal crónica es un problema de salud pública a nivel mundial, cuya incidencia va en aumento debido a su asociación con la diabetes mellitus y la hipertensión. El tratamiento actual para las etapas avanzadas implica sesiones de diálisis o el trasplante renal; dichos tratamientos tienen un gran impacto tanto en la calidad de vida como en los costos para la atención sanitaria de quienes la padecen. Los métodos de diagnóstico actuales no permiten la detección en las etapas tempranas; por lo que el desarrollo de nuevas estrategias que permitan realizar un diagnóstico en las etapas iniciales de daño renal es de gran interés. El presente proyecto representa una primera aproximación del análisis metabólico de la inducción y progresión del daño renal crónico.

Para el modelo experimental se emplearon ratas Wistar (n=24) que se dividieron en dos grupos: control (n=6) y grupo de daño renal (n=18); éste último grupo se subdividió en tres fases de daño renal (leve, moderado y severo) en base a los niveles séricos del nitrógeno ureico en sangre (BUN). Para generar el daño renal

se administró de manera diaria por vía intraperitoneal ácido fólico (250 mg/kg). El BUN se monitoreó de manera semanal y cuando alguno de los animales se encontró en la fase de daño renal deseada se colocó de manera individual en una jaula metabólica para la recolección de orina y al día siguiente era sacrificado para recolectar el suero y tejido renal. En las muestras de suero se evaluó la creatinina, citocinas proinflamatorias y biomarcadores de lesión renal; mientras que con las muestras de orina se evaluó el perfil metabólico por RMN y el daño renal se corroboró por la tinción histológica de hematoxilina y eosina.

Contribuciones y Conclusiones: Se estableció por primera vez un modelo de daño renal crónico inducido con ácido fólico. Las tres fases de daño renal (leve, moderado y severo) fueron caracterizadas a través de marcadores bioquímicos, citocinas proinflamatorias, marcadores de lesión renal e histología. Se estableció un perfil metabólico urinario por RMN propio de cada una de las fases de daño. El modelo quimiométrico permitió definir las variables con mayor contribución para cada grupo, las cuales se relacionaron con las señales del espectro de RMN y la identificación del metabolito correspondiente. El grupo de daño leve se caracterizó por variaciones en los metabolitos: acetato, citrato, creatinina, creatina, glicina, lactato, succinato y N-óxido de trimetilamina. En el grupo de daño moderado los metabolitos fueron: citrato, creatinina, fenilacetilglicina y N-óxido de trimetilamina. En el grupo de daño severo: creatinina, acetato, alantoína, creatina y taurina.

FIRMA DEL ASESOR: _____

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 La Enfermedad Renal Crónica.....	1
1.1.1. Definición.....	1
1.1.2. Clasificación y estadios de la ERC	2
1.1.3. Epidemiología	4
1.1.4. Etiología.....	5
1.1.5. Fisiopatología.....	5
1.1.5.1. Hipertensión	7
1.1.5.2. Anemia	9
1.1.5.3. Enfermedades óseas.....	9
1.1.5.4. Acumulación de toxinas	10
1.1.6. Factores de riesgo.....	10
1.1.7. Sintomatología y complicaciones.....	11
1.1.8. Diagnóstico.....	12
1.1.8.1. Hallazgos del laboratorio.....	12
1.1.9. Tratamiento	13
1.1.10. Implicaciones económicas	15
1.2 El modelo experimental.....	16
1.2.1. Modelos experimentales para el estudio de ERC	16
1.3 Metabolómica	20
1.3.1. Origen y desarrollo de la metabolómica.....	20
1.3.2. Definición actual: metabolómica y metabolitos.....	22
1.3.3. Enfoques de la metabolómica	23
1.3.4. Metabolómica en la búsqueda de biomarcadores	24
1.4 Plataformas analíticas aplicadas en la metabolómica	25
1.4.1. Fundamentos de la RMN	27
1.4.1.1 Pulsos empleados en metabolómica	30
1.5 Análisis multivariable	33
1.5.1 Pretratamiento de datos	34
1.5.2 Análisis de componentes principales	36
1.5.2.1 Definición del PCA.....	37
1.5.2.2 Componentes principales	40
1.5.2.3 Scores y loadings	41
1.6 Justificación	42
1.7 Objetivo general	43
1.8 Objetivos específicos.....	43

Capítulo	Página
2. MATERIAL Y MÉTODOS	44
2.1 Materiales	44
2.1.1. Material general	44
2.1.2. Reactivos y solventes	45
2.1.3. Equipo y software.....	46
2.1.4. Material biológico	46
2.2 Métodos.....	47
2.2.1. Área de trabajo.....	47
2.2.2. Desarrollo del modelo experimental.....	47
2.2.3. Análisis bioquímico	49
2.2.4. Mediadores inflamatorios	49
2.2.5. Marcadores de lesión renal.....	51
2.2.6. Análisis histológico.....	52
2.2.7. Análisis estadístico.....	53
2.2.8. Preparación de las muestras para la adquisición del espectro por ¹ H-RMN.....	53
2.2.9. Pretratamiento de datos.....	55
2.2.10. Análisis de componentes principales	56
2.2.11. Evaluación de la aplicabilidad del PCA	57
2.2.12. Evaluación de rutas metabólicas aplicas	57
3. RESULTADOS.....	58
3.1 Desarrollo de un modelo experimental de daño renal crónico que simule las etapas de daño renal en el humano	58
3.2 Establecimiento de la diferencia entre los biomarcadores de lesión renal, inmunológicos e histológicos de los grupos con o sin daño renal entre las diversas fases de estudio.....	60
3.2.1. Parámetros proteicos	60
3.2.2. Parámetros inmunológicos.....	62
3.2.3. Parámetros histológicos	64
3.3 Implementación de una metodología para el procesamiento de datos a partir de los espectros de ¹ H-RMN e identificar las señales de los metabolitos mayoritarios	66
3.4 Definición de los pretratamientos de datos y los parámetros estadísticos adecuados para la construcción de los diferentes modelos quimiométricos para la obtención de los perfiles metabólicos de las distintas fases de la ERC	74
3.4.1. Selección de regiones relevantes	74
3.4.2. Combinación de datos (binning).....	76
3.4.3. Alineado	76
3.4.4. Eliminación de las señales de ácido fólico	78

Capítulo	Página
3.4.5. Normalización	78
3.4.6. Análisis de componentes principales	80
3.5 Evaluación de la aplicabilidad del análisis de componentes principales construidos para el diagnóstico y categorización de la etapa de evolución de la ERC en el modelo experimental	85
4. DISCUSIÓN	87
5. CONCLUSIONES	97
6. PERSPECTIVAS	98
REFERENCIAS	99

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Clasificación de la insuficiencia renal crónica según las guías de la K/DOQI.....	2
Tabla 2. Clasificación de la insuficiencia renal crónica según las guías de la KDIGO 2012.....	3
Tabla 3. Causas de insuficiencia renal crónica.....	6
Tabla 4. Función del riñón y problemas por su deficiente funcionamiento en pacientes con insuficiencia renal crónica	8
Tabla 5. Estadios de ERC y la frecuencia de complicaciones	11
Tabla 6. Características de las distintas metodologías para la recolección de muestras para calcular la TFG.....	14
Tabla 7. Principales ventajas y desventajas de los marcadores empleados para medir la TFG.....	26
Tabla 8. Factores que afectan los niveles de creatinina sérica y BUN	59

Tabla	Página
Tabla 9. Comparación de características analíticas entre RMN y MS	65
Tabla 10. Parámetros bioquímicos en suero de los distintos estadios de la enfermedad renal en el modelo experimental	71
Tabla 11. Metabolitos identificados en los espectros de ¹ H-RMN de las muestras de orina de cada grupo	79
Tabla 12. Metabolitos que contribuyen en la separación entre los grupos experimentales.....	83

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Estimado de publicaciones para estudios de metabolómica de la ERC realizado con modelos experimentales.....	17
Figura 2. Descripción gráfica del fenómeno de RMN.....	29
Figura 3. Experimentos de 1D- ¹ H de muestras de orina de rata.....	31
Figura 4. Representación de la secuencia de pulsos del experimento 1D NOESYPRESAT.....	32
Figura 5. Representación gráfica de una matriz de datos (X).....	37
Figura 6. Representación de la obtención de componentes principales.....	38
Figura 7. Matriz transformada a una serie de componentes principales.....	39
Figura 8. Esquema de trabajo implementado para el modelo experimental de daño renal con ácido fólico.....	48
Figura 9. Obtención de muestra de orina en jaulas metabólicas.....	49
Figura 10. Apreciación macroscópica de los riñones en las distintas fases del modelo experimental.....	59
Figura 11. Niveles de KIM-1 sérico.....	60

Figura	Página
Figura 12. Niveles de cistatina C sérico	61
Figura 13. Niveles de NGAL sérico	62
Figura 14. Citocinas proinflamatorias en suero	63
Figura 15. Tejido renal con tinción HyE	64
Figura 16. Sobreposición de los espectros de ¹ H-RMN de las muestras de orina de cada grupo	67
Figura 17. Identificación de las señales de los metabolitos mayoritarios en los espectros de ¹ H-RMN a campo alto.....	68
Figura 18. Identificación de las señales de los metabolitos mayoritarios en los espectros de ¹ H-RMN a campo bajo.....	69
Figura 19. Regiones seleccionadas del espectro de ¹ H-RMN de las muestras de orina de cada grupo experimental.....	73
Figura 20. Comparación de los espectros de RMN del conjunto de muestras antes y después de la selección de regiones relevantes	75
Figura 21. Comparación de los espectros de RMN del conjunto de muestras posterior a la combinación de datos	76
Figura 22. Comparación del espectro antes y después del alineado	77

Figura	Página
Figura 23. Comparación del espectro posterior a la normalización	79
Figura 24. Gráficas de scores del PCA.....	81
Figura 25. Gráfico de loadings del PCA.....	82
Figura 26. Vías metabólicas alteradas en el modelos experimental	84
Figura 27. Gráfico de scores para prueba del modelos construido.....	86

LISTA DE ECUACIONES

Ecuación	Página
Ecuación 1. Condición de resonancia o frecuencia de Larmor	28
Ecuación 2. Representación matemática del PCA.....	37
Ecuación 3. Representación desarrollada del PCA	39

LISTA DE ABREVIATURAS

1D	1 dimensión
ANOVA	Análisis de varianzas
B ₀	Campo magnético
BMRB	Biological Magnetic Resonance Bank
BUN	Nitrógeno ureico en sangre
D ₂ O	Agua deuterada
Da	Dalton
DMA	Dimetilamina
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMSC	Corrección de dispersión multiplicativa extendida
ERA	Enfermedad renal aguda
ERC	Enfermedad renal crónica
ESCW	Excitation Sculpting accompanied by CW
ESWGL	Excitation Sculpting accompanied by a diabatic frequency
FA	Análisis factorial
FID	Decaimiento libre de la inducción
FNT- α	Factor de necrosis tumoral alfa
HCA	Conglomerado jerárquico
HMDB	Base de datos del metaboloma humano
Hz	Hertz
i.p.	intraperitoneal
IL-1 β	Subunidad beta de la interleucina 1

IL-6	Interleucina 6
KDIGO	Kidney Disease Improving Global Outcomes
KDOQI	Kidney Disease Outcomes Quality Initiative
KIM-1	Molécula 1 de lesión renal
m ²	Metro cuadrado
MI	Mediadores inflamatorios
min	Minuto
mL	Mililitros
MLR	Marcadores de lesión renal
MS	Espectrometría de masas
MSC	Corrección de dispersión multiplicativa
Ng	Nanogramos
NGAL	Lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos
NMN	N1-metilnicotinamida
NOESY PRESAT	Nuclear Overhauser effect spectroscopy con presaturación
O UU	Obstrucción uretral unilateral
PAG	Fenilacetilglicina
PBS	Buffer salino de fosfatos
PC	Componente principal
PC1	Primera componente principal
PC2	Segunda componente principal
PCA	Análisis de componentes principales
PCs	Componentes principales
PLS-DA	Análisis discriminante con mínimos cuadrados

PQN	Normalización de cociente probabilístico
P^T	Vector de loadings
PTH	Hormona paratiroidea
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMSECV	Raíz del error cuadrático medio de la validación cruzada
SIMCA	Modelado blando independiente de analogías de clases
SNV	Variable aleatoria normal tipificada
T	Vector de scores
TFG	Tasa de filtración glomerular
TMA	Trimetilamina
TMAO	N-óxido de trimetilamina
TSP	Trimetilsililpropionato de sodio
WEFT	Water Eliminated Fourier Transform
X	Matriz de datos

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 La Enfermedad Renal Crónica

1.1.1 Definición

La expresión enfermedad renal crónica (ERC) engloba una gran variedad de problemas que evolucionan con pérdida de la función renal. Fue hasta el año 2002, cuando la National Kidney Foundation's Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (KDOQI) brindó la primera definición operativa de ERC, con la finalidad de proporcionar un lenguaje común para la comunicación entre los médicos, pacientes e investigadores, la cual permita estimaciones más fiables de la prevalencia y la formulación de programas de salud pública (National, Kidney, & Foundation, 2002).

Actualmente la ERC se define como la disminución de la función renal, expresada por una Tasa de Filtración Glomerular (TFG) $< 60 \text{ mL/ min/1.73m}^2$ o la presencia de daño renal durante más de 3 meses, manifestada en forma directa por alteraciones histológicas en la biopsia renal o en forma indirecta por marcadores de daño renal como albuminuria o proteinuria, alteraciones en el sedimento urinario o en pruebas de imagen (Lamb, Levey, & Stevens, 2013).

La ERC posee dos características principales: 1) su cronicidad, ya que la lesión pocas veces se recupera siendo de larga duración y 2) su carácter progresivo, debido a que la pérdida de la función renal genera más lesión renal, incluso si la enfermedad que la causó se ha vuelto inactiva (Ausiello & Goldman, 2009).

1.1.2 Clasificación y estadios de la ERC

En 2002 la KDOQI publicó las guías en las que se estableció la definición actual de la ERC, la clasificación en grados y los métodos básicos de evaluación, ver Tabla 1 (National Kidney Foundation, 2002).

TABLA 1
CLASIFICACIÓN DE LA ERC SEGÚN LAS GUÍAS DE LA K/DOQI

Estadio	Descripción	FG (mL/min/1.73 m²)
1	Daño renal con FG normal o aumentado	≥ 90
2	Daño renal con disminución leve de FG	60-89
3	Disminución moderada del FG	30-59
4	Disminución severa del FG	30-59
5	Insuficiencia renal crónica terminal	<15 o en diálisis

FG: filtrado glomerular

Posteriormente en 2005, la organización Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) publicó la primer guía KDIGO que ratificó la perspectiva de las guías K/DOQI y añadió a la clasificación propuesta los valores

de albuminuria, para pronosticar el riesgo de progresión y/o complicación, ver Tabla 2 (Lamb et al., 2013).

TABLA 2
CLASIFICACIÓN DE LA ERC SEGÚN LAS GUÍAS DE LA KDIGO 2012

Filtrado glomerular Categorías, descripción y rangos (mL/min/1.73 m ²)			Albuminuria		
			Categorías, descripción y rangos		
			A1	A2	A3
			Normal a ligeramente elevada <30 mg/g ^a	Moderadamen te elevada 30 -300 mg/g ^a	Gravemente elevada >300 mg/g ^a
G1	Normal o elevado	>90			
G2	Ligeramente disminuido	60-89			
G3a	Ligera a moderadamente disminuido	45-59			
G3b	Moderado a gravemente disminuido	30-44			
G4	Gravemente disminuido	15-29			
G5	Fallo renal	< 15			

Verde, no hay enfermedad renal si no existen otros marcadores; amarillo, riesgo moderado; naranja, riesgo alto; rojo, riesgo muy alto. ^a La albuminuria se expresa como cociente albumina/creatina.

1.1.3 Epidemiología

El conocimiento sobre la epidemiología de la ERC es limitado debido a la dificultad para diagnosticarla en las etapas tempranas; por lo que las bases de datos epidemiológicas cuantifican únicamente a los pacientes en estadios avanzados sin considerar a los enfermos asintomáticos. Además entre el 60-70% de los casos con enfermedad renal crónica terminal son consecuencia de diabetes mellitus o hipertensión arterial (Radhakrishnan et al., 2014) y aunque estos pacientes presentan ERC las estadísticas epidemiológicas solo reportan la enfermedad sistémica de base sin considerar las comorbilidades.

La OMS estima que uno de cada diez adultos tiene algún grado de enfermedad renal crónica y el crecimiento de la prevalencia de pacientes en diálisis es del 8% anual (Radhakrishnan et al., 2014). De acuerdo a estadísticas de la Sociedad Latinoamericana de Nefrología e Hipertensión (SLANH), México ocupa el tercer lugar a nivel mundial con la mayor incidencia anual de enfermedad renal crónica terminal, > 350 por millón de habitantes y ocupa el segundo lugar con la mayor tasa de mortalidad (4.16%) en la población entre 50 a 74 años con ERC (Global et al., 2014; Jha et al., 2013).

En nuestro país el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), reporta la insuficiencia renal como la 11^a causa de muerte y la 10^a en Nuevo León (INEGI, 2013). De acuerdo con cifras reportadas por la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), existen 9.5 millones de personas con enfermedad renal, de las cuales 129,000 presentan un síndrome crónico y se calcula que cada año, se reporten al menos 40,000 casos nuevos (Méndez-Durán, Méndez-Bueno, Tapia-Yáñez, Montes, & Aguilar-Sánchez, 2010).

1.1.4 Etiología

La guía de la KIDGO enfatiza la relevancia de identificar las causas de la insuficiencia renal crónica con la finalidad de un abordaje adecuado al paciente y la predicción de la progresión (National Kidney Foundation, 2002). Se han descrito diversas enfermedades que pueden afectar a los riñones, y de manera histórica se han clasificado en lesiones de origen primario (es decir aquellos procesos que surgen y se limitan al riñón) o de origen secundario (enfermedades sistémicas en las que se afecta al riñón). En la Tabla 3 se resumen las principales causas que desencadenan la ERC. De manera independiente al origen del daño, una vez iniciado se observa una progresión de la enfermedad renal que es constante e irreversible (Ausiello & Goldman, 2009).

1.1.5 Fisiopatología

Entre los diversos estudios que tratan de explicar la fisiopatología del deterioro de la función renal en la ERC, se encuentra la teoría del daño del túbulo intersticial, la presencia de infiltrados celulares en el parénquima renal y la teoría del daño glomerular (“glomérulo hiperfiltrante”), siendo ésta última la más aceptada (Ausiello & Goldman, 2009).

TABLA 3
CAUSAS DE INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA

Componente alterado	Origen Primario	Origen secundario
Glomérulo		Nefropatía diabética
		Amiloidosis
		Glomerulonefritis posinfección
		Nefropatía por células falciformes
		Glomerulonefritis membranoproliferativas relacionadas con VIH
Túbulo e intersticio	Infecciones del tracto urinario Litos Obstrucción	Infecciones sistémicas
		Enfermedades autoinmunes
		Sarcoidosis
Vasos sanguíneos		Drogas
		Toxinas ambientales, Neoplasias (mieloma)
		Enfermedad renal ateroembólica.
		Hipertensión
		Isquemia
		Embolismo por colesterol
		Vasculitis sistémica
Microangiopatía trombótica, Esclerosis sistémica		
Enfermedades quísticas y congénitas	Displasia renal Enfermedad quística medular Podocitopatias	Riñón poliquístico
		Síndrome de Alport
		Enfermedad de Fabry

La teoría del “glomérulo hiperfiltrante” establece que la pérdida de nefronas causada por la enfermedad de origen deteriora la capacidad de filtración glomerular renal; pero debido al principio fisiológico de la homeostasis las nefronas remanentes realizan un ajuste en su función para mantener la TFG en sus valores normales. Sin embargo, esta respuesta conduce a una contraprestación que produce consecuencias adversas: el daño de las nefronas remanentes por la sobrecarga de filtración, lo que lleva la pérdida progresiva de la función renal y la progresión de la ERC (Brenner, Lawler, & Mackenzie, 1996).

Además de la función de filtración de la sangre y eliminación de productos de desecho, los riñones están implicados en muchas otras funciones corporales importantes como: regulación de la presión arterial, el equilibrio hidroelectrolítico y ácido-base, participan en la regulación del metabolismo mineral y óseo a través de la biosíntesis del calcitriol, en la hematopoyesis (eritropoyetina) y en la función adrenal (renina) (Eaton, 2004); por esto la ERC generará síntomas clínicos relacionados con su función en otros órganos y sistemas, los cuales se resumen en la Tabla 4.

1.1.5.1 Hipertensión

La hipertensión es a menudo uno de los primeros signos de la ERC y contribuye al desarrollo de la enfermedad cardiovascular, la causa fundamental de morbilidad en los pacientes con ERC (Fischer et al., 2016).

La hipertensión en los pacientes con ERC suele ser resultado de la reducción en la excreción de sodio, lo que produce una expansión del volumen extracelular y como resultado un aumento en la presión arterial. Aunque una mayor presión arterial resulta benéfica ya que permite aumentar la filtración el

desequilibrio de sodio generará la hipertensión persistente. Otro mecanismo de hipertensión en pacientes con ERC es la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona, en donde la acción vasoconstrictora debido a los elevados valores de angiotensina II y la retención de sal inducida por la aldosterona contribuyen a la hipertensión (Silverthorn & Silverthorn, 2008).

TABLA 4
FUNCIÓN DEL RIÑÓN Y CONSECUENCIAS POR LA ERC

Funciones del riñón	Consecuencias de la disfunción
Mantener las concentraciones y el contenido corporal de electrólitos y el volumen de líquidos	Hiponatremia, hiperpotasemia, bajo contenido total de potasio, hipocalcemia, hiperfosfatemia, tolerancia reducida a las sobrecargas de electrólitos o minerales
Regulación de la presión arterial	Hipertensión, enfermedad cardiovascular
Mediadores endocrinos	Anemia, hipertensión, enfermedad ósea, baja actividad de vitamina D, incremento de la vida media de péptidos hormonales
Excreción de los productos de desecho	Anorexia, náuseas, depósito en tejidos blandos de fosfato y oxalato, disfunción neurológica, pérdida de proteínas musculares.

1.1.5.2 Anemia

La anemia normocítica normocrómica es muy común que se desarrolle en pacientes con ERC avanzada, por la deficiente producción de eritropoyetina en el riñón. La eritropoyetina es producida por las células intersticiales en el riñón, y la pérdida de función renal reduce su producción causando descenso de la eritropoyesis. Otros factores que contribuyen a la anemia son el acortamiento de la semivida de los eritrocitos y la deficiencia vitamínica (McClellan et al., 2004).

1.1.5.3 Enfermedades óseas

La ERC se asocia con una variedad de trastornos de los huesos y del metabolismo del calcio y fósforo (Group, 2009).

La ERC limita la capacidad para excretar fosfatos, los cuales se acumulan en los líquidos corporales y forman complejos fosfatocálcicos, por lo que la concentración de calcio ionizado circulante se ve disminuida. La reducción de las concentraciones de calcio estimula la producción y liberación de la hormona paratiroidea (PTH). De esta forma se estimula la reabsorción renal de calcio, mediante el intercambio con el fósforo, que es excretado. Este nuevo estado de equilibrio del calcio y fósforo se mantiene solo en la medida que la concentración de PTH circulante sea alta, cuya consecuencia será la estimulación de la actividad osteoclástica en el hueso, esto acelera la liberación de minerales que conducen a la enfermedad ósea (Ausiello & Goldman, 2009).

1.1.5.4 Acumulación de toxinas urémicas

Las proteínas de los alimentos se metabolizan a aminoácidos que se pueden usar para construir los almacenes corporales de proteínas; cuando el consumo excede la cantidad que puede ser almacenada o empleada los aminoácidos son transformados a urea y otros productos de desecho. Estos productos urémicos de desecho son potencialmente tóxicos y deben excretarse (Silverthorn & Silverthorn, 2008).

En pacientes con ERC la acumulación de toxinas urémicas debido a la falla renal genera una toxicidad generalizada que afecta principalmente al sistema nervioso, el sistema gastrointestinal y la piel (Dhondt, Vanholder, Van Biesen, & Lameire, 2000).

1.1.6 Factores de riesgo

Información de diversos estudios muestran que existe una alta asociación entre los factores demográficos y clínicos con la ERC. Individuos de edad avanzada, con hipertensión y/o diabetes muestran una alta predisposición a desarrollar la ERC, por lo cual se recomienda que cada año se realice un análisis intencionado para la identificación de la lesión renal (Ausiello & Goldman, 2009; Huda, Alam, & Harun-Ur-Rashid, 2012).

1.1.7 Sintomatología y complicaciones

La ERC no tiene signos y síntomas específicos (Tabla 5), por lo que usualmente su diagnóstico se debe a un hallazgo durante alguna evaluación médica sistemática o al surgir una manifestación de disfunción renal como hipertensión, edema, náusea o hematuria. Incluso en la ERC en estadios 4 o 5, los síntomas individuales no son específicos (Ausiello & Goldman, 2009).

TABLA 5
ESTADIOS DE ERC Y LA FRECUENCIA DE COMPLICACIONES

1	- Anemia, 4% - Hipertensión, 40% - Mortalidad a 5 años, 19%
2	- Anemia, 4% - Hipertensión, 40% - Mortalidad a 5 años, 19%
3	- Anemia, 7% - Hipertensión, 55% - Mortalidad a 5 años, 24%
4	- Hiperfosfatemia, 20% - Anemia, 29% - Hipertensión, 77% - Mortalidad a 5 años, 46%
5	- Hiperfosfatemia, 50% - Anemia, 69% - Hipertensión, >75% - Mortalidad a 3 años, 14%

1.1.8 Diagnóstico

El diagnóstico de ERC puede establecerse mediante una minuciosa revisión de los antecedentes y la exploración física, complementado con los hallazgos de las pruebas de laboratorio. La especificidad del diagnóstico mejora utilizando pruebas de imagen y con procedimientos invasivos, como la angiografía y la biopsia renal (Ausiello & Goldman, 2009).

1.1.8.1 Hallazgos de laboratorio

La determinación más frecuentemente empleada para evaluar la función renal es la TFG; la cual mide el volumen de plasma ultrafiltrado a través de los capilares glomerulares y por lo regular sus valores suelen disminuir después del daño estructural y del deterioro generalizado en sus funciones excretoras, metabólicas y endócrinas. Los valores de referencia están en torno a 125 - 150 mL/min en hombres y ligeramente inferior en mujeres; disminuyen un promedio de 0.8 mL/min por año después de los 40 años de edad como parte del proceso de envejecimiento (Henry, 2007).

La TFG se puede estimar de manera directa mediante la determinación de la aclaramiento de marcadores en orina; alternativamente se puede calcular mediante una ecuación en base a la concentración plasmática de determinados productos de desecho (McPherson, Pincus, & Henry, 2007).

Las sustancias químicas empleadas como marcadores pueden ser de origen exógeno: inulina o productos marcados radioactivamente (Iotalamato, EDTA radioactivo); o endógenos: creatinina, nitrógeno ureico en sangre (BUN) o cistatina C (Bidin, Shah, Stanslas, & Seong, 2019). La principal característica de

los marcadores es que deben corresponder a sustancias que se filtren con libertad a través del glomérulo, pero que no se reabsorban ni secreten en los túbulos renales. En la tabla 6 se describen las principales ventajas y desventajas de estos marcadores. Los marcadores más empleados en el laboratorio de rutina son la creatinina y el BUN (McPherson et al., 2007).

No existe un analito perfecto para la determinación de la función renal. Por ejemplo, la creatinina presenta ciertas desventajas debido a la variabilidad en su excreción (influencia de la masa muscular, consumo de carne y la degradación extrarrenal de la creatinina); su baja sensibilidad (una concentración sérica superior al rango de normalidad indica como mínimo una pérdida del 50% de la función renal), y además algunos fármacos de uso frecuente también pueden modificar su concentración plasmática (McPherson et al., 2007). Por su parte la cuantificación de la urea para la determinación del BUN no es estable y está influenciada por las proteínas de la dieta, el trauma muscular, sangrado y consumo de esteroides (Bidin et al., 2019).

1.1.9 Tratamiento

El objetivo principal del tratamiento de los pacientes con ERC en estadios 1 y 2 es prevenir la enfermedad cardiovascular y la futura pérdida de la función renal. En estos pacientes, los síntomas urémicos son infrecuentes, ya que aún poseen suficiente función renal para controlar los valores de las toxinas urémicas. El tratamiento en los pacientes con ERC en estadios 3 y 4 es más complicado, debido a que es más probable que presenten complicaciones como hipertensión, hiperparatiroidismo secundario, acidosis e incluso sintomatología urémica.

Cuando la ERC alcanza el estadio 4 se indica remitir al paciente al nefrólogo para que se le informe sobre el tratamiento con diálisis y/o trasplante (Ausiello & Goldman, 2009).

TABLA 6
VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS MARCADORES PARA LA TFG

	Fortalezas	Limitaciones
Inulina	Gold estándar No tiene efectos secundarios.	Costoso Difícil de disolver y mantener en disolución
Creatinina	Marcador endógeno, no es necesario administrar. Test disponible en todos los laboratorios clínicos	Variación en la secreción inter e intra individuo
Iotalamato	Barato Larga vida media	Probable secreción tubular. Requiere instalaciones para el manejo de sustancias radioactivas. No se puede usar en pacientes con alergia al yodo.
Iohexol	No radioactivo Altamente sensible	Posible reabsorción tubular o unión a proteínas. No se puede emplear en pacientes con alergia al yodo.

TABLA 6 Continúa

EDTA radioactivo	Ampliamente disponible en Europa.	Probable reabsorción tubular. Requiere instalaciones para el manejo de sustancias radioactivas.
DTPA radioactivo	Ampliamente disponible en EUA. Altamente sensible	Requiere estandarización Requiere instalaciones para el manejo de sustancias radioactivas.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
DTPA:pentaacetato de dietilentriamina

1.1.10 Implicaciones económicas

El costo del tratamiento de la ERC es extremadamente alto y se incrementa cuando el paciente requiere un tratamiento sustitutivo, por lo que es considerada como una enfermedad catastrófica (Aréstegui & Rivera).

En México en el año 2013 el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) reporto que el gasto generado por el programa de diálisis supero al generado por los programas de atención a cáncer de mama, cáncer cervicouterino y al del virus de inmunodeficiencia humano en conjunto (Méndez-Durán et al., 2014). Estimaciones indirectas señalan que en el mediano plazo se esperan importantes incrementos en la prevalencia de la ERC en el país que representarán importantes retos para el financiamiento de los servicios de salud (Franco-Marina et al., 2011).

1.2. El Modelo Experimental

El modelo animal o modelo experimental es definido como todo “organismo vivo con un proceso patológico heredado, adquirido naturalmente o inducido que presenta una o más similitudes con respecto al mismo fenómeno en el hombre” (Held, 1983).

De manera específica entre los animales vertebrados empleados en los modelos experimentales se encuentran los clásicamente denominados animales de laboratorio (ratones, ratas, cobayos, hámsteres y conejos) y los animales de granja o compañía (perros, gatos, cerdos) (Christou-Savina, Beales, & Osborn, 2015; Grossman, 2010).

1.2.1 Modelos experimentales para el estudio de ERC

Históricamente, el empleo de animales de experimentación para emular la ERC ha permitido examinar, en un marco de tiempo acelerado, las condiciones fisiopatológicas de la enfermedad humana, cuando normalmente debe transcurrir un tiempo considerable entre el daño al órgano y las manifestaciones clínicas (Becker & Hewitson, 2013). Tradicionalmente, los modelos más empleados en el estudio de la ERC han sido la rata y el ratón (Figura 1), debido a su tamaño pequeño y a los costos relativamente bajos para su mantenimiento (Hewitson, Ono, & Becker, 2009). De acuerdo con revisiones recientes, la mayor parte de los estudios se realizan en ratas debido a que su mayor tamaño facilita su manipulación para procedimientos quirúrgicos y la obtención de una mayor cantidad de tejido, sangre u orina en comparación con el ratón, lo que permite

realizar un mayor número de determinaciones (Becker & Hewitson, 2013; Pereira Wde et al., 2015).

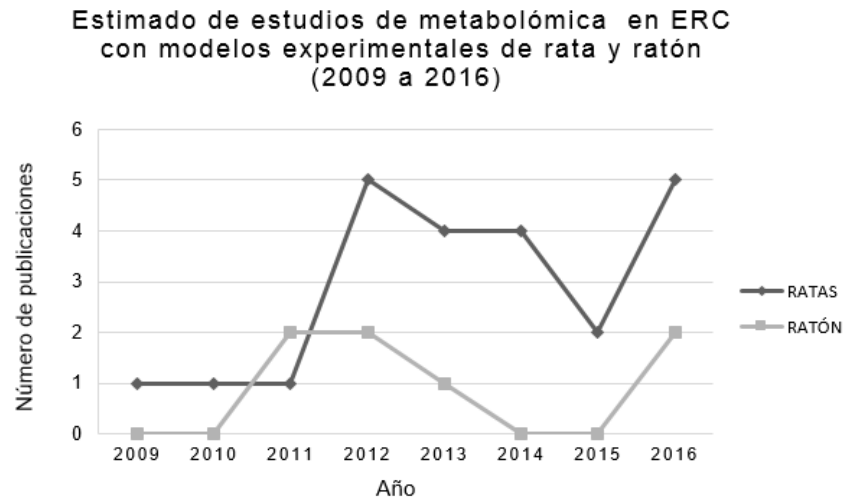


Figura 1. Estimado de publicaciones para estudios de metabolómica de la ERC realizado con modelos experimentales. (Perales-Quintana et al., 2017)

Se han desarrollado diversos modelos animales con ciertas características homólogas a la condición humana de la ERC. Los procedimientos de inducción de la ERC en el modelo de rata pueden clasificarse en aquellos en los que la patología se produce de forma espontánea debido al envejecimiento (Reckelhoff, Zhang, & Granger, 1997), y la hipertensión (Ofstad & Iversen, 2005), a las características genéticas, como las Ratas Buffalo/mna (Fassi et al., 1998; Nakamura et al., 1986), a intervención quirúrgica (nefrectomía 5/6 (Fleck et al., 2006), obstrucción uretral unilateral (OUU) (Robert L Chevalier, Michael S Forbes, & Barbara A Thornhill, 2009), isquemia renal (Le Clef, Verhulst, D'Haese, & Vervaet, 2016)) y los que se apoyan en la administración de alguna sustancia

con capacidad nefrotóxica (doxorubicina, aminonucleósidos de puromicina, adenina, ciclosporina y antibióticos aminoglucósidos) (Yang, Zuo, & Fogo, 2010).

En lo que respecta a los estudios metabólicos de la ERC, los modelos más empleados en las especies Sprague-Dawley y Wistar de ratas han sido el desarrollo de la enfermedad mediante adenina, OUU o nefrectomía 5/6.

La OUU es una técnica quirúrgica en la cual se ocluye o bloquea uno de los uréteres mediante el empleo de dos suturas, una cerca del riñón y otra más distal. De esta manera, se genera una obstrucción urinaria, que conduce al aumento de la presión hidrostática del riñón afectado iniciando así la destrucción de las nefronas, que terminará produciendo un daño renal irreversible. Aunque este modelo es empleado para el estudio de la enfermedad tubulointersticial, es importante mencionar que la obstrucción uretral no es una causa común que desencadene la ERC en el hombre. Las principales ventajas de este modelo son su reproducibilidad y sencillez, así como el corto lapso en el que se empieza a observar el fenómeno patológico. Sin embargo, se ha descrito que los cambios en los parámetros de laboratorio son muy sutiles (Becker & Hewitson, 2013).

La Nefrectomía 5/6 ha representado un modelo excelente para reproducir la glomerulosclerosis focal segmental del humano; se trata de una técnica quirúrgica en la que se extirpa un riñón en su totalidad y una semana después al riñón remanente se le impide la función de dos terceras partes, bien mediante la ligadura de ramas arteriales o por la resección de los polos, de tal manera que solo se permite la función del tercio central del riñón, lo que desencadenará de manera inmediata una glomerulosclerosis y daño tubulointersticial progresivo hasta llegar a la uremia (Shimamura & Morrison, 1975). A pesar de que este

método suena sencillo, la reproducibilidad ha sido complicada, ya que es necesario asegurarse que los dos tercios eliminados tengan una proporción parecida en todos los animales de experimentación (Becker & Hewitson, 2013).

El modelo más frecuentemente empleado en los estudios de metabólica de la ERC es el daño con adenina. Se trata de un método sencillo, en el cual por lo menos durante cuatro semanas la rata es alimentada con adenina (Tamura, Aizawa, Hori, & Ozaki, 2009).

Se ha descrito que la adenina dentro del organismo precipita en forma de cristales de 2,8-dihidroxiadenina en el túbulo proximal, causando su degeneración, infiltrado inflamatorio y fibrosis. Los valores de laboratorio tienden a ser característicamente elevados, y resulta muy útil para el estudio de la falla renal a largo plazo (Jia et al., 2013).

De manera particular, en este proyecto se propuso caracterizar un nuevo modelo en el cual se empleó el ácido fólico como inductor de daño renal; el ácido fólico a dosis únicas ha sido ya empleado para generar daño renal agudo debido a su baja solubilidad, que conlleva a la formación de cristales en el lumen renal. (Schmidt et al., 1973). Estudios recientes han sugerido que una administración múltiple puede generar transición de daño renal agudo a ERC (Fu et al., 2018) sin embargo hasta el momento no se ha caracterizado dicha transición.

1.3 Metabolómica

La metabolómica es una disciplina emergente en el campo de la bioquímica analítica y es considerada el punto final del orden jerárquico de la cascada de las ciencias "ómicas" (Dettmer & Hammock, 2004). El término "ómica", derivado del griego, es un sufijo empleado para referirse al estudio de la totalidad o conjunto de moléculas de un sistema biológico. Los principales niveles de la ciencias "ómicas" son: genómica (estudio del DNA), transcriptómica (estudio del contenido del RNA mensajero), proteómica (estudio de las proteínas sintetizadas y modificadas en un organismo) y metabolómica (estudio del conjunto de metabolitos) (R. Bujak, W. Struck-Lewicka, M. J. Markuszewski, & R. Kaliszan, 2015).

Durante la última década los distintos niveles de ciencias "ómicas" han encontrado aplicación en los campos biomédicos y farmacéuticos; así mismo su importancia ha quedado sustancialmente demostrada debido a que ha ayudado a mejorar el entendimiento de las distintas rutas y fenotipos observados (Guillemin et al., 2016).

1.3.1 Origen y desarrollo de la metabolómica

Desde hace años investigadores y bioquímicos clínicos han realizado pruebas auxiliares de laboratorio, lo que se conoce como la bioquímica clínica clásica; donde la cuantificación de un metabolito específico puede ser correlacionado de manera directa con el estado de salud de un individuo (Gomase, Changbhale, Patil, & Kale, 2008; Jeremy K. Nicholson & Lindon, 2008).

La idea de que cada individuo debe tener un patrón de metabolitos en sus fluidos biológicos que refleje su condición fisiopatológica fue propuesta por Roger Williams al inicio de 1950; sin embargo su propuesta de trabajo no trascendió debido a lo complejo y laborioso que resultaban las técnicas analíticas de ese tiempo (Gates & Sweeley, 1978). Este concepto no fue retomado hasta principios de 1970 en la Universidad de California en San Diego (UCSD), con el proyecto experimental de “medicina ortomolecular” bajo la dirección de Linus Pauling y Art Robinson, quienes buscaron sustituir la cuantificación de un solo analito, por una aproximación masiva y simultánea que cuantificara un mayor número de analitos en una muestra biológica mediante el empleo de la cromatografía de gases acoplada a la espectroscopia de masas (Robinson & Robinson, 2011). En el mismo periodo, Horning E.C. y cols. introducen el término metabolómica para hacer referencia a los metabolitos endógenos normales que pueden ser caracterizados en un fluido biológico (Horning & Horning, 1971), mientras que en 1999, Nicholson J.K. acuña el termino metabonómica para hacer referencia a la respuesta metabólica que se presenta ante estímulos patofisiológicos (J. K. Nicholson, Lindon, & Holmes, 1999); actualmente éstos términos, son usados de manera intercambiable (Renata Bujak, Wiktoria Struck-Lewicka, Michał J Markuszewski, & Roman Kaliszan, 2015).

El avance y desarrollo en este campo se ha visto impulsado debido a la evolución de las técnicas espectroscópicas de alta resolución junto a los avances tecnológicos que permiten el reconocimiento de patrones para mejorar la interpretación de la información metabólica contenida en las muestras biológicas (Gomase et al., 2008).

1.3.2 Definición actual: metabolómica y metabolitos

La metabolómica complementa la información proporcionada por la bioquímica clásica, la biología molecular y la fisiología, dando lugar a una nueva visión de las rutas metabólicas implicadas en los procesos biológicos. Actualmente es definida como la disciplina científica que se encarga de estudiar pequeñas moléculas orgánicas, denominadas metabolitos, resultantes de la actividad enzimática celular y la exposición a estímulos ambientales presentes en un sistema biológico (Vinayavekhin, Homan, & Saghatelian, 2010).

Los metabolitos son pequeñas moléculas orgánicas (<1,500 Da) que pueden ser importantes moduladores, sustratos, subproductos o bloques de construcción de diversos procesos biológicos (R. Bujak et al., 2015). Por esta razón, la presencia, ausencia o acumulación de metabolitos específicos en una célula o muestra biológica ofrece información importante acerca del estado fisiológico y funcional del sistema biológico (Gowda et al., 2008; Jeremy K. Nicholson & Lindon, 2008).

Los metabolitos pueden ser clasificados en dos categorías: a) metabolitos endógenos, producidos de manera natural por un organismo: aminoácidos, ácidos orgánicos, ácido nucleicos, ácidos grasos, azúcares, vitaminas, cofactores, pigmentos y b) metabolitos exógenos que provienen de la interacción con el exterior: fármacos, contaminantes ambientales, aditivos alimentarios, toxinas y otros xenobióticos (Holmes, Wilson, & Nicholson, 2008).

1.3.3 Enfoques de la metabolómica

Existen dos enfoques complementarios que se utilizan para las investigaciones metabolómicas:

- Huella metabólica dactilar (Fingerprinting o huella digital/ no orientado). Es un análisis no dirigido, cuyo objetivo es el análisis completo del metaboloma en un tiempo específico de un sistema biológico. Corresponde al patrón metabólico que caracteriza un sistema biológico en una condición en particular, su objetivo principal es identificar y cuantificar el mayor número posible de metabolitos, por lo que no existe una plataforma analítica universal. Implica la localización de aquellos con variaciones estadísticamente significativas en abundancia dentro de un conjunto de muestras experimentales, frente a muestras de control y la determinación de su estructura química. Permite conectar el metabolito con la condición biológica (Ellis, Dunn, Griffin, Allwood, & Goodacre, 2007).

- Perfilado metabólico (Metabolómica orientada). Tiene un enfoque específico ya que solo se analizan (identificación y cuantificación) metabolitos predeterminados, es decir aquellos que *a priori* se sabe que intervienen en el fenómeno que se desea estudiar. Por lo que las técnicas de preparación de muestra y analíticas deben ser más específicas, con la finalidad de facilitar el análisis del metabolito determinado. Se considera un análisis dirigido a un solo compuesto a un pequeño conjunto de metabolitos específicos (Beckonert et al., 2007).

1.3.4 Metabolómica en la búsqueda de biomarcadores para la ERC

El empleo de la metabolómica para la investigación del estado fisiológico ha permitido la identificación de nuevo biomarcadores. Los biomarcadores hacen referencia a una sustancia química característica que pueda ser identificada y/o cuantificada para emplearse como indicadores de un proceso patológico o para evaluar la respuesta de las intervenciones terapéuticas. De manera ideal un biomarcador permite reconocer los estadios tempranos de una enfermedad, por lo que la búsqueda de biomarcadores mediante las ciencias ómicas ha sido de particular interés para aquellas enfermedades crónico degenerativas (Showiheen et al., 2019).

De manera particular en la ERC la metabolómica ha propuesto distintos metabolitos como biomarcadores para el diagnóstico, que a la vez han permitido ir elucidando los mecanismos de desarrollo y progresión de la enfermedad. Por mencionar algunos ejemplos, recientemente se ha propuesto la arginina como un marcador de la función de filtrado glomerular (George & Gounden, 2019), mientras que el N-óxido de trimetilamina (TMAO) se ha correlacionado con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares en pacientes con ERC (Tomlinson & Wheeler, 2017). También las vías metabólicas de las purinas y el triptófano han sido asociados al daño renal crónico ya que tanto la alantoína como el ácido quinolínico han sido reportados de manera consistente entre los diversos estudios metabólicos (Abbiss & Maker, 2019).

Una revisión reciente realizada por nuestro grupo de trabajo, demostró que los metabolitos implicados en las rutas metabólicas de aminos cuaternarios y aminoácidos como el TMAO, el indoxilsulfato y derivados de la dimetilarginina

representan una alternativa prometedora para la identificación, clasificación y pronóstico de la ERC (Perales-Quintana et al., 2017; Saucedo-Yanez et al., 2018).

1.4 Plataformas analíticas aplicadas en la metabolómica

Las muestras biológicas contienen un gran número de metabolitos, todos con características químicas propias: diversidad de grupos funcionales, pesos moleculares, estabilidad y/o reactividad entre otras características. Debido a la cantidad de analitos que se desean analizar y la variedad de propiedades químicas que se pueden encontrar, el desarrollo de técnicas analíticas ha sido uno de los pivotes fundamentales para su desarrollo. Desde el inicio de los estudios de la metabolómica, se ha buscado técnicas sencillas y rápidas, capaces de garantizar la máxima cobertura en la identificación de los metabolitos presentes y con un alto nivel de sensibilidad, rendimiento, robustez y reproducibilidad (Misra & van der Hooft, 2016).

Desde etapas tempranas de la investigación metabolómica la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y la Espectrometría de Masas (MS) han sido las técnicas más reportadas en la literatura (Emwas, Salek, Griffin, & Merzaban, 2013). Ambas plataformas han demostrado ser adecuadas, cada una con sus fortalezas y debilidades, permitiendo un análisis más amplio e incluyente (Tabla 7, pp 27) (Gowda et al., 2008). El presente proyecto se enfocó en el análisis mediante RMN, por lo cual describiremos más respecto a esta técnica analítica.

TABLA 7
COMPARACIÓN ANALÍTICA ENTRE RESONANCIA MAGNÉTICA
NUCLEAR Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS

	RMN	MS
Sensibilidad	Baja sensibilidad, del orden micromolar (10^{-6})	Elevada sensibilidad, del orden picomolar (10^{-12}) con técnicas estándar.
Recuperación de muestra	No se destruye la muestra, por lo que puede ser recuperada, almacena y reanalizada.	Técnica destructiva, no es posible recuperar la muestra.
Reproducibilidad	Muy alta	Moderada
Preparación de muestra	Mínima.	Demandante, necesario el empleo de extracción y separación cromatográfica específica.
Análisis de tejido	Es posible, mediante técnicas de rotación en el ángulo mágico	No, requiere extracción del tejido.
Análisis dirigido	No es relevante para el análisis dirigido	Superior en el análisis dirigido.
Estudios <i>in vivo</i>	Sí, se emplea ampliamente la espectroscopia de resonancia magnética del ^1H , y en menor grado ^{31}P y ^{13}C	No, a pesar de que se ha sugerido el empleo de la desorción/ionización por electrospray durante cirugías.

Fuente: Gowda GN et al. Expert review of molecular diagnostics. 2008; 8(5):617-33

1.4.1 Fundamentos de la RMN

La RMN es una técnica espectroscópica basada en las propiedades magnéticas de los núcleos. Los núcleos, al igual que otras partículas elementales, poseen una propiedad denominada *espín* que está caracterizada por un número cuántico específico. Este número cuántico de espín (I), puede adquirir determinados valores como 0, $\frac{1}{2}$, 1, $\frac{3}{2}$. El valor de I determina el número de orientaciones que puede asumir un núcleo, de acuerdo con la fórmula $2I+1$, al interactuar con un campo magnético externo (denotado por B_0). En ausencia de un campo magnético externo, los espines de los núcleos se orientan al azar; sin embargo, cuando se colocan estos núcleos en un campo magnético intenso, adoptarán orientaciones específicas. Los núcleos con $I = \frac{1}{2}$ (como el átomo de ^1H y ^{13}C), por la interacción con el campo magnético, generan dos estados de espín. Estos niveles de energía están caracterizados por el número cuántico m , denominado como el número cuántico magnético, que puede tener valores de $-I, -I+1, \dots, I-1, I$. Cuando $I = \frac{1}{2}$, $m = -\frac{1}{2}$ y $m = +\frac{1}{2}$. Tradicionalmente, el estado $m = +\frac{1}{2}$ se define como el de menor energía y se caracteriza porque los espines nucleares están alineados en el mismo sentido del campo externo; en cambio, cuando $m = -\frac{1}{2}$, se tiene un estado de mayor energía en el que las orientaciones de los espines nucleares están alineadas en contra del campo magnético. La alineación a favor con el campo es la más estable, por lo que se requiere la absorción de energía mediante una frecuencia apropiada para invertir la alineación y así colocarlo contra el campo, que es la situación menos estable. Cuando ocurre la “inversión del espín” y se presenta el fenómeno de relajación al estado basal, se dice que los núcleos magnéticos están en resonancia con la

radiación aplicada, de ahí el nombre de resonancia magnética nuclear (Morrison & Boyd, 1998; Silverstein, Webster, Kiemle, & Bryce, 2014).

La energía necesaria para invertir el espín del protón depende de la intensidad del campo externo; a mayor intensidad de campo, mayor es la tendencia a permanecer alineado con él y más elevada es la frecuencia de la radiación necesaria para conseguir la inversión. La ecuación, conocida como condición de resonancia o frecuencia de Larmor, indica que la transición entre niveles de energía está determinada también por las propiedades magnéticas del núcleo:

$$\nu = \frac{\gamma B_0}{2\pi}$$

Siendo

ν = frecuencia, en Hz

γ = Constante giromagnética

B_0 = Intensidad del campo magnético

Cuando el pulso de radiofrecuencia que provoca la inversión cesa, los espines empiezan a regresar a su estado de equilibrio (relajación) y se emite una señal (denominada FID), que posteriormente es procesada mediante la transformada de Fourier, dando lugar al espectro de RMN que conocemos (Figura 2) (Silverstein et al., 2014).

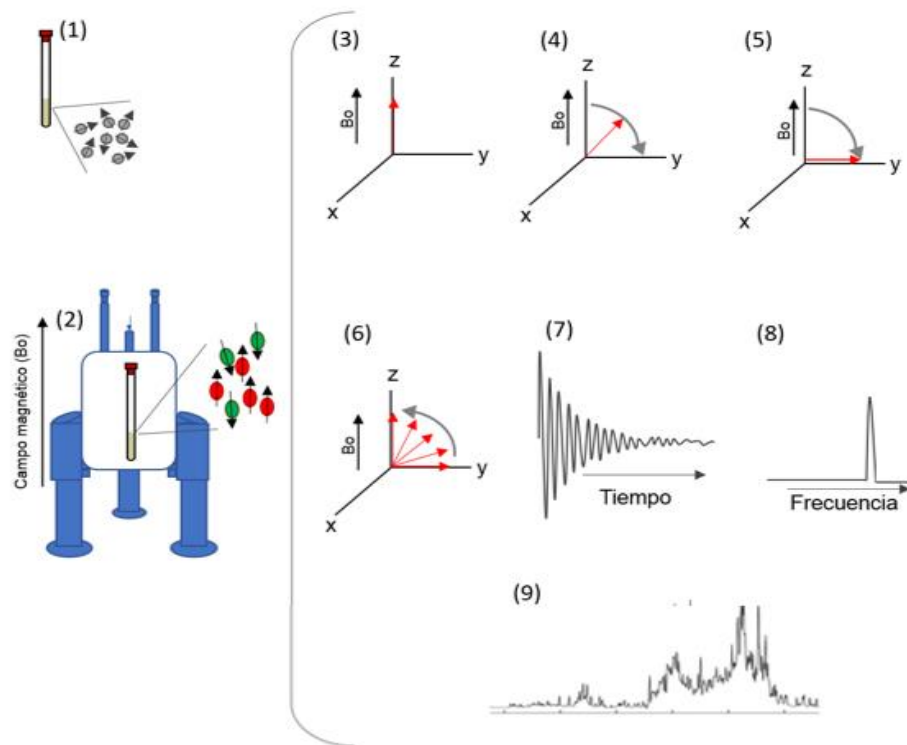


Figura 2. Descripción gráfica del fenómeno de RMN. (1) En ausencia de un campo magnético, las energías de los estados magnéticos de un núcleo son idénticas. (2) Cuando un núcleo con número cuántica de espín de $\frac{1}{2}$ se somete a un campo magnético externo (B_0) su momento magnético se orienta a favor o en contra del B_0 . (3) El vector de magnetización indicado con la flecha roja representa del exceso de núcleos de menor energía. (4) y (5) Las flechas representan la rotación del vector magnético durante el tiempo que la muestra se somete al pulso de radiofrecuencia. (6) Cuando cesa el pulso de radiofrecuencia los espines nucleares regresan a su orientación inicial. (7) La señal que se emite durante la relajación, se conoce como decaimiento libre de la inducción (FID). (8) y (9) La señal del FID es procesada mediante una Transformada de Fourier para generar el espectro en función de la frecuencia.

1.4.1.1 Secuencia de pulsos de RMN comúnmente empleados en metabolómica

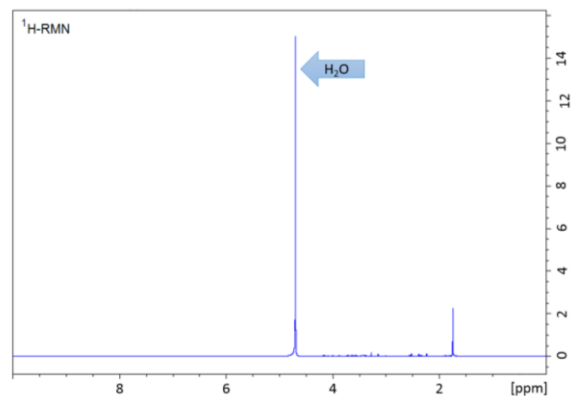
El estudio del metaboloma por RMN ha llevado a la generación y estandarización de diversas secuencias de pulsos, en su mayoría experimentos de una dimensión (1D) (Le Guennec, Tayyari, & Edison, 2017).

Los especímenes biológicos clínicos comúnmente analizados (biofluidos como orina, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo) en técnicas metabolómicas contienen una gran cantidad de agua, es decir un número considerable de núcleos de hidrógeno que impacta en la proporción de los tamaños de los picos de los metabolitos estudiados, por lo que la supresión de la señal del agua es crucial para obtener mejores resultados espectrales (Figura 3).

Existen diversas técnicas de presaturación y/o saturación de la señal del agua, tales como: 1D NOESY PRESAT (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy con presaturación), WEFT (Water Eliminated Fourier Transform), ESCW (Excitation Sculpting accompanied by a CW on-resonance saturation pulse) o ESWGL (Excitation Sculpting accompanied by a adiabatic frequency modulation “WigGLy” pulse), entre otros.

Sin embargo, la secuencia 1D NOESY PRESAT (Bruker, Inc.) es la más ampliamente empleada entre los estudios de metabolómica, por su robustez y reproducibilidad, ya que permite suprimir la señal del agua sin generar pérdida de intensidad del resto de las señales, y debido a que no aplica gradientes no se generan imperfecciones a la línea base del espectro (Kruk et al., 2017; Le Guennec et al., 2017).

A.



B.

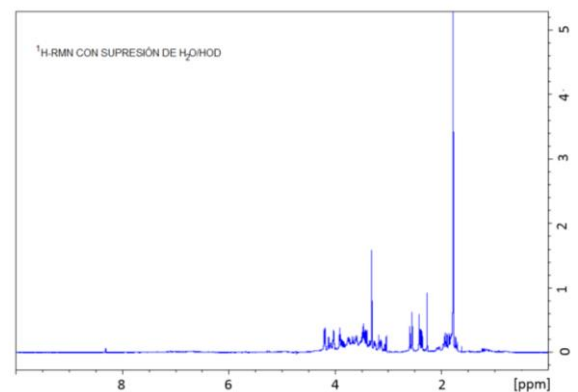


Figura 3. Experimentos de 1D- ^1H de muestras de orina de rata. En A podemos observar que el gran tamaño de la señal de los protones del agua produce que las señales del resto de las moléculas sean de menor tamaño, por lo que se vuelve complicado la identificación de los otros componentes de la orina. Por otra parte, en B se realizó un experimento para la supresión de la señal del agua empleando la secuencia noesypr1d generando de manera artificial que la señal de los protones del agua desaparezca y por consiguiente aumente la intensidad de las señales de las otras moléculas para facilitar su posterior identificación.

A continuación, se hace una breve revisión de esta secuencia:

La secuencia del experimento 1D NOESYPRESAT consiste en la serie de pulsos que se muestran en la Figura 4.

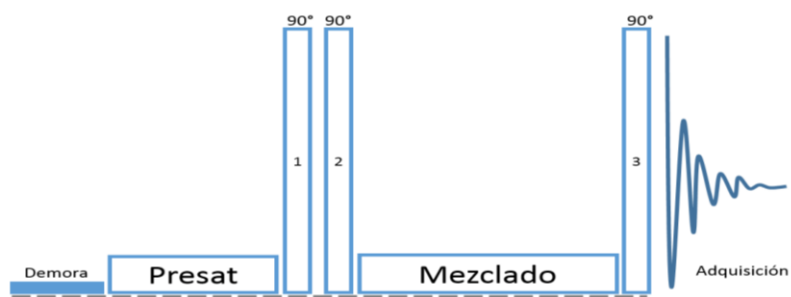


Figura 4. Representación de la secuencia de pulsos del experimento 1D NOESYPRESAT. La recuperación de la magnetización para alcanzar la condición de equilibrio está representada por la etapa de “Demora”. Los bloques “Presat” y “Mezclado” hacen referencia a los periodos de saturación para excitar de forma selectiva al disolvente, en este caso H₂O. Los rectángulos verticales 1 y 2 representan los primeros dos pulsos de 90° y 3 representa el último pulso de 90° previo a la adquisición de la señal. En la etapa de “Adquisición” se registra la señal de resonancia (Mckay, 2011).

La secuencia 1D NOESYPRESAT toma ventaja de las diferencias en los tiempos de relajación entre los solutos y el agua, éste inicia con un periodo de presaturación seguido por dos pulsos de 90°, un tiempo de mezclado, un último pulso de 90° y finalmente la adquisición. La supresión de la señal del agua se logra por la irradiación selectiva de la frecuencia del agua en el periodo de presaturación. Los primeros dos pulsos de 90° invierten la magnetización (tanto de soluto y disolvente) al eje $-z$. Posteriormente, durante el tiempo de mezclado

los solutos y el agua se relajan y se dirigen al eje +z. El agua tiene un tiempo de relajación más largo que los solutos, por lo que de esta manera es posible suprimir la señal del agua (Teng, 2012). Aunque la técnica permite la supresión de la señal del agua, es posible encontrar picos residuales, por lo que la región que corresponde a la señal de resonancia del agua (4.50 – 5.00 ppm) suele ser excluida del análisis metabólico.

1.5 Análisis multivariable.

Los métodos espectroscópicos como MS y RMN hacen posible la recolección de una gran cantidad de información (variables) a partir de una sola muestra; esto genera grandes matrices de datos que se vuelven complicadas de analizar. La quimiometría a través del análisis multivariable permite afrontar esta dificultad a partir de herramientas matemáticas y estadísticas que facilitan la interpretación de datos por medio de la extracción de información relevante.

El análisis multivariable se clasifica en:

- Métodos no supervisados, los cuales reducen el número de variables debido al empleo de modelos matemáticos que permiten la combinación de las variables para generar nuevos factores o componentes de tal forma que sea posible detectar similitudes/tendencias o valores atípicos entre los datos estudiados. Dentro de estos métodos se encuentran el análisis de componentes principales (PCA), el análisis factorial (FA) y el análisis de conglomerados jerárquico (HCA).

- Métodos supervisados, los cuales construyen modelos matemáticos en base a la identificación de variables responsables de la separación de muestras a partir de datos previamente categorizados, de tal forma que después se pueda predecir la pertenencia de una muestra desconocida a una clase específica. Dentro de estos métodos se encuentran el análisis discriminante con mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) y el modelado blando independiente de analogías de clases (SIMCA), entre otros.

1.5.1 Pretratamiento de datos

Una vez adquiridos las variables a evaluar y previo al análisis de los datos, es necesario llevar a cabo la fase de pretratamiento o pre-procesado de datos, con la finalidad de eliminar y/o reducir las diferencias e interferencias producto de las variaciones debido al ruido o efectos externos que puedan afectar la identificación de la estructura para el modelado quimiométrico. Es decir, por medio de estas correcciones el conjunto de datos se hace comparable, lo que facilita y mejora las interpretaciones de los datos (Ebbels, Lindon, & Coen, 2011; Smolinska, Blanchet, Buydens, & Wijmenga, 2012). En cuanto a datos espectroscópicos, los principales pretratamientos son: transformación para minimizar los efectos de la dispersión de la luz (para métodos de detección espectrofotométricos), derivadas, normalización, escalado, corrección de la línea base, alineación, centrado (Esbensen, Guyot, Westad, & Houmoller, 2002). A continuación, se describen las técnicas de pretratamiento utilizadas en este proyecto que permitieron la posterior aplicación del método de reconocimiento de pautas basado en PCA.

a. Combinado de datos adyacentes (binning): Es usado para combinar variables adyacentes o muestras de una matriz de datos, de tal manera que permite disminuir la resolución sin perder calidad de la información.

b. Alineación: La posición de las señales en el espectro es sensible al entorno químico de los núcleos, pero muchas otras variables como factores instrumentales, el pH y la temperatura, la concentración de sales, diluciones, entre otras pueden influir en la localización de una determinada señal. Para esta fase se puede realizar una alineación global a toda la ventana espectral a partir de un espectro de referencia; sin embargo, debido a que no todas las señales se ven afectadas de la misma manera, ni se desplazan todas hacia el mismo sentido ha sido necesario el desarrollo de otros algoritmos. El alineamiento por regiones aplica un algoritmo, donde cada región aislada del espectro toma como referencia un espectro representativo y el alineamiento se lleva a cabo sin modificar la posición del resto de las señales del espectro (Savorani, Tomasi, & Engelsen, 2010).

c. Normalización: En el caso de los biofluidos los factores de dilución difieren entre cada una de las muestras; en el caso específico de la orina la ingesta de agua impactará en el volumen de orina excretado. Estas diferencias de dilución generan variaciones en la intensidad de las señales que pueden confundirse con la respuesta metabólica; por lo que las técnicas de normalización compensan las posibles variaciones de tal manera que permite comparar de manera veraz las muestras entre ellas. Existen distintas técnicas de normalización: se puede emplear un metabolito de referencia, o algoritmos como normalización integral, normalización por máximo espectral, normalización con

cociente probabilístico (PQN) (Euceda, Giskeødegård, & Bathen, 2015). El PQN fue la estrategia de normalización que se empleó en el presente proyecto, el método escala espectros en base a las diluciones más probables. Esta dilución más probable se estima analizando la distribución de los cocientes de las amplitudes del espectro a normalizar con respecto a un espectro de referencia (Dieterle, Ross, Schlotterbeck, & Senn, 2006).

1.5.2 Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales o PCA es el método de análisis multivariante más empleado para el análisis de exploración de datos. Tiene como objetivo la simplificación y/o reducción de datos, la detección de muestras atípicas (outliers), la selección de variables y la clasificación de muestras (Wold, Esbensen, & Geladi, 1987).

El objetivo del PCA es transformar un conjunto de variables originales en un nuevo conjunto de variables que en menor número, sean capaces de describir la mayor parte de la varianza; estas nuevas variables se denominan componentes principales (PCs). La primera componente explica en un mayor grado la variabilidad total, la segunda componente explicará la mayor parte de la varianza restante, es decir, de la que no explicaba el primero y así sucesivamente. Debido a que las primeras componentes definen la mayor fracción de la variación del conjunto de datos. Las últimas PC contienen la mínima información de los datos y suelen ir asociados al “ruido” del sistema (Esbensen, Guyot, Westad, & Houmoller, 2002).

1.5.2.1 Definición del PCA

El punto de partida para el PCA es una matriz de datos (X), compuesta por columnas (K) que corresponden a las variables o atributos estudiados (parámetros físicos, químicos, respuestas biológicas, etc.) y filas (I) que representan los objetos de estudio (muestras o casos), la cual se ilustra en la Figura 5.

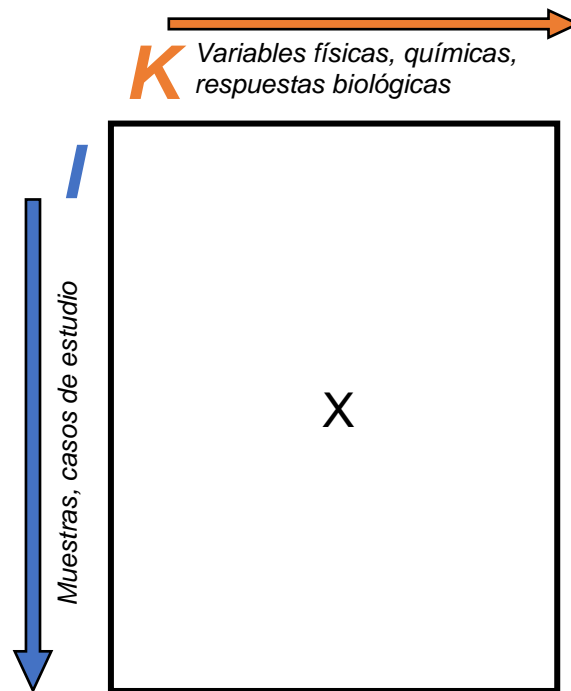


Figura 5. Representación gráfica de una matriz de datos (X) con sus columnas (K) y filas (I)

De manera general, el análisis mediante PCA transforma X en una estructura y ruido:

$$X = \text{Estructura} + \text{Ruido}$$

Lo cual en términos matemáticos es:

$$X = TP^T + E$$

T corresponde a la matriz de scores, mientras que P^T es la matriz de loadings transpuesta. El término E no es parte del modelo, se le denomina matriz residual y corresponde a la parte de X que no es usada en las componentes principales, es decir, es una contribución que no es explicada por el modelo y contiene el ruido y/o el error experimental. En términos prácticos, el PCA genera nuevas variables a partir de las combinaciones lineales de las variables originales. Es decir, el PCA proyecta las columnas de X en un vector de loadings (P^T) y las filas en el vector de scores (T) complementario; el término $T P^T$ en conjunto es la nueva variable y se denomina componente principal (PC), esto se ejemplifica en la Figura 6.

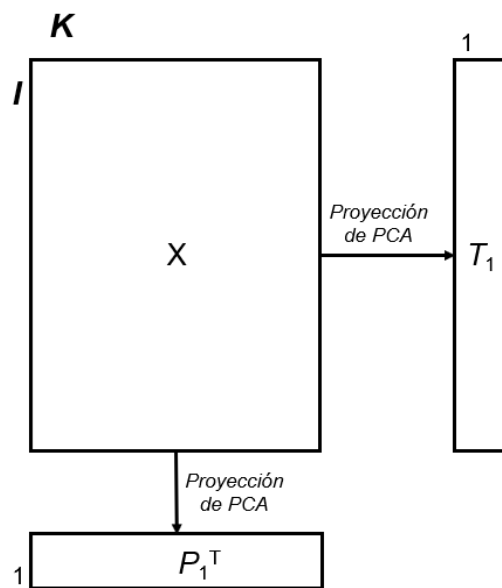


Figura 6. Representación de la obtención de componentes principales de una matriz de datos (X) con sus columnas (K) y filas (I). PCA genera un vector de loadings (P_1^T) a partir de las columnas y un vector de scores (T_1) a partir de las filas, constituyendo así el primer componente principal.

1.5.2.2 Componentes principales

Las PCs son un nuevo conjunto de variables generadas a partir de las combinaciones lineales de las variables originales de la matriz. Estas nuevas variables soportan la mayor parte de la variación de las muestras y son elegidas de tal manera que sean ortogonales entre sí, de tal forma que PC1 explica la mayor variación, PC2 explica la segunda fracción más grande de la variación, la PC3 explica menor variación que la anterior y así sucesivamente hasta llegar a E. Teóricamente es posible obtener tantas componentes principales como variables originales, pero debido a que el PCA permite que la mayor parte de la varianza sea explicada por las primeras componentes, es posible tener un número mucho menor de PCs que explican prácticamente toda la variación de muestras. Para seleccionar el número adecuado de PCs existen diversos procedimientos, pero en general es suficiente con seleccionar un número de PCs que nos permita explicar la mayor varianza posible. Además, es posible verificar un modelo mediante un sistema de validación cruzada evaluando la raíz del error cuadrático medio de la validación cruzada (RMSECV, por sus siglas en inglés root mean square error of cross-validation), la cual es una medida de la capacidad de un modelo para predecir las muestras que no fueron utilizadas para construir dicho modelo durante el procedimiento de la validación cruzada (Esbensen, Guyot, Westad, & Houmoller, 2002).

1.5.2.3 Scores y loadings

Los resultados del PCA son reportados en términos de “scores” y “loadings”.

Los scores se definen como las coordenadas de cada muestra en el espacio definido por las componentes principales, puede tener un sentido positivo o negativo de acuerdo con la parte del semi-eje en el que se ubiquen. La matriz de score (T), es la colección de scores de todos los objetos estudiados. Estos al ser graficados nos permite observar de manera general todas las muestras para lograr identificar tendencias, agrupamientos y muestras atípicas (outliers).

Por otra parte, los loadings representan la contribución de las variables para cada PC. La matriz de loadings (P), es la colección de loadings de todos los PCs, y puede ser definida como una matriz transformada entre el espacio de las variables originales y el nuevo espacio ocupado por las PCs (Esbensen, Guyot, Westad, & Houmoller, 2002).

Existen gráficos de mérito que permiten evaluar los scores y loadings producidos por el modelo PCA:

- 1) Gráficos de scores (Gráficos de casos)

Representan los valores que toman las muestras en el nuevo espacio, siendo posible observar relaciones entre ellas.

- 2) Gráficos de loadings (Gráficos de variables)

Muestra cuales variables tienen una mayor contribución al posicionamiento de las muestras en el gráfico de scores y por lo tanto son las responsables del agrupamiento en el gráfico de scores.

1.6 Justificación

La ERC se ha convertido en un problema de salud pública en nuestro país, ya que además de ser la decimoprimer causa de muerte es una complicación frecuente de la diabetes mellitus y diversas cardiopatías. Afecta severamente la calidad y expectativa de vida de los pacientes, además de que el tratamiento final basado en diálisis y reemplazo renal representa un elevado costo para el sistema de salud. Lamentablemente, los métodos de diagnóstico actuales solamente permiten detectar la ERC cuando se encuentra en etapas intermedias y avanzadas, por lo que es necesario desarrollar nuevas estrategias de análisis químico-clínicos para detectar las etapas iniciales y monitorear su progresión.

El presente proyecto constituye una primera aproximación al estudio de la progresión de la ERC en un modelo animal empleando métodos metabolómicos, con la finalidad de establecer diferencias en los perfiles urinarios de las distintas etapas.

1.7 Objetivo General

Establecer el perfil metabólico urinario de las distintas etapas de la ERC en un modelo experimental mediante resonancia magnética nuclear y análisis quimiométricos.

1.8 Objetivos Específicos

1. Desarrollar un modelo de daño renal crónico que simule las etapas de daño renal en el humano.
2. Establecer la diferencia entre los biomarcadores de lesión renal, inmunológicos e histológicos de los grupos con y sin daño renal entre las diversas fases de estudio.
3. Implementar una metodología para el procesamiento de datos a partir de los espectros de ^1H -RMN e identificar las señales características de los metabolitos mayoritarios.
4. Definir los pre-tratamientos de datos y los parámetros estadísticos adecuados para la construcción de los diferentes modelos quimiométricos, para la obtención de los perfiles metabólicos de las distintas fases de la ERC.
5. Evaluar la aplicabilidad de los modelos matemáticos construidos para el diagnóstico y categorización de la etapa de evolución de la ERC en el modelo experimental.

CAPÍTULO 2

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Material

2.1.1 Material General

- Alimento Nutri-Cubo para rata
- Aserrín
- Bolsas de RPBI amarillas
- Bolsas de RPBI rojas
- Cassettes de inclusión
- Celdas de curazo de 1 cm de trayecto óptico
- Criocajas de plástico
- Criotubo de 2 mL
- Gradillas
- Hoja de Bisturí N° 10
- Jaulas metabólicas
- Jeringas 1 mL 27G x 13 mm
- Jeringas de 5 mL 22G x 32 mm
- Kit de pinzas quirúrgicas
- Pipeta Automática 100-1000 μ L

- Pipetas de transferencia desechables
- Placas de Petri
- Puntillas 1000 μ L
- Tubo cónico de 1.5 mL
- Tubos de plástico Corning de 50 mL
- Tubos de RMN de 5 mm
- Tubos de vidrio 12 x 100
- Tubos tapón oro con gel separador para determinaciones en suero

2.1.2 Reactivos y Solventes

- Ácido Fólico $\geq 97\%$ (Sigma, St. Louis, MO)
- Agua Bidestilada
- Agua deuterada (D₂O)
- Buffer de Fosfatos (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH: 7.0)
- Formaldehído con Buffer 10%
- Kit BUN para ILab-300 Plus, Instrumentation Laboratory
- Kit comercial FNT- α (Peprotech, Mexico City, Mexico)
- Kit comercial IL-1 (Peprotech, Mexico City, Mexico)
- Kit comercial IL-6 (Peprotech, Mexico City, Mexico)
- Kit creatinina para ILab-300 Plus, Instrumentation Laboratory
- Ketamina (100 mg/kg; Anesket, PiSA Agropecuaria, S.A. de C.V.)
- Trimetilsililpropionato de sodio (TSP)
- Xilazina (10 mg kg⁻¹; Sedaject, Vedilab S.A. de C.V.)

2.1.3 Equipo y Software

- Agitador Vortex
- Balanza analítica Denver Instrument APX-200
- Báscula digital
- Centrifuga
- Centrifuga IEC Micro MB
- Equipo ILab-300 Plus, Instrumentation Laboratory
- Espectrómetro RMN Bruker 400MHz Avance (de 9.4 teslas de campo magnético), sonda BBO SmartProbe de 5 mm con gradientes de campo magnético en z.
- Lector de microplacas ThermoScientificMultiskan FC Modelo 357
- Microscopio
- Software GraphPad Prism (versión 6 GraphPad Software, Inc)
- Software PLS-Toolbox (versión 7.9, The MathWorks, Inc).
- Software TOPSPIN (versión 3.5, Bruker BiospinLtd)
- Ultracongelador So-Low a - 80°C

2.1.4 Material Biológico

- Ratas macho Wistar(Rattusnorvegicusalbinus)

2.2 Métodos

2.2.1 Área de trabajo

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Hígado y el Departamento de Química Analítica pertenecientes a la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

2.2.2 Desarrollo del modelo experimental

El presente estudio se condujo bajo la aprobación del comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León (No. De registro HI17-00004) siguiendo lo establecido por la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Los animales de experimentación se mantuvieron en cajas de policarbonato bajo condiciones ambientales apropiadas en temperatura y humedad, así como en ciclos de 12h/luz 12h/oscuridad y con agua y alimento estándar para roedor (NUTRICUBO) *ad libitum*.

2.2.2.1 Modelo experimental de ácido fólico

Se trabajó con un grupo control (n=6) al cual se le administró solamente el vehículo y con un grupo de daño (n=18) a partir del cual se obtuvieron 6 animales para cada uno de los distintos estadios de la enfermedad (leve, moderado y severo, con n=6 para cada grupo).

De manera inicial se administró la dosis establecida de 250 mg/kg de ácido fólico con intervalos de tres días que permitió el desarrollo y recuperación

del daño renal agudo; posteriormente se cambió a un intervalo de dosis diarias (Figura 8).

Durante la administración diaria, cada 6 días las ratas se colocaron en jaulas metabólicas de manera individual por un periodo de 24 horas con la finalidad de obtener muestras de orina (Figura 9), posterior a esto se tomó una muestra de sangre de la vena caudal y se analizaron los valores de BUN para correlacionar con el nivel de daño renal generado (Figuras 10 y 11).

Cuando el daño renal se encontró dentro de alguno de los estadios propuestos, el animal fue anestesiado mediante una dosis de ketamina (90 mg/kg) y xilacina (8 mg/kg), para la obtención de sangre, tejido renal y sacrificio de la rata. La muestra de orina que se obtuvo previo al sacrificio de la rata se almacenó a -80°C para su posterior análisis metabólico.

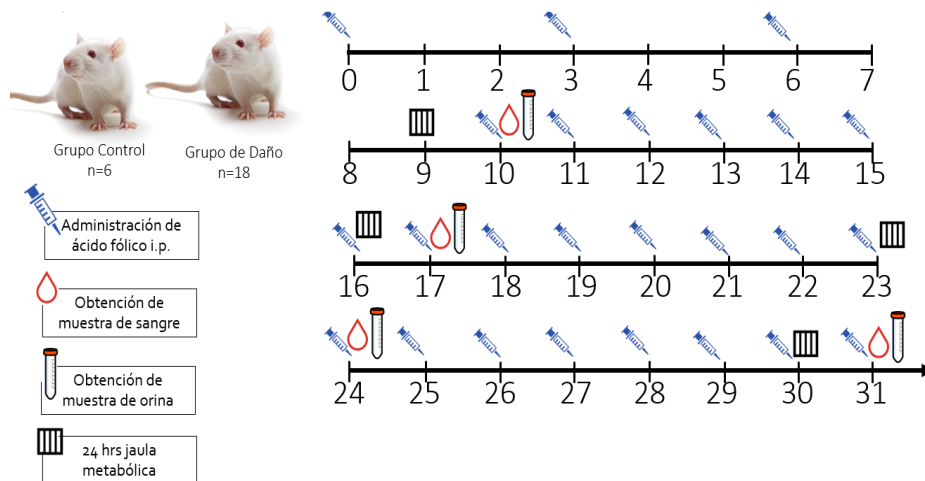


Figura 8. Esquema de trabajo implementado para el modelo experimental de daño renal con ácido fólico (250 mg/kg i.p.)



Figura 9. Obtención de muestra de orina en jaulas metabólicas. Las ratas fueron colocadas de manera individual por jaula para la recolección de orina.

2.2.3 Análisis Bioquímico

Las pruebas de funcionamiento renal incluyeron la concentración de creatinina y BUN. Estas se llevaron a cabo en el equipo ILab-Aries (Instrumentation Laboratory, Milan, Italy), el cual es un sistema automático de química húmeda. Las metodologías incluyen pruebas colorimétricas, cinéticas, enzimáticas y de potenciometría.

2.2.4 Mediadores inflamatorios

Los mediadores inflamatorios (MI): Interleucina-1 (IL-1), Interleucina-6 (IL-6) y el Factor de Necrosis Tumoral- α (FNT- α), se determinaron por la técnica de ELISA-sándwich, todos por medio de kits comerciales de Peptotech. Los kits emplean un anticuerpo monoclonal anti-MI inmovilizado en las celdillas de la

microplaca para así atrapar el MI de las muestras o estándares. Después de una pequeña incubación, el exceso de la muestra o estándar se eliminó con el lavado, y se adicionó un anticuerpo policlonal de conejo anti-MI. Este anticuerpo se une al MI capturado en la placa. Después de incubar una hora y media a temperatura ambiente, el exceso de anticuerpo se eliminó por el lavado y se adicionó el anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con la peroxidasa de rábano, el cual se une al anticuerpo policlonal anti-MI. El exceso del conjugado se eliminó con un lavado y se adicionó el sustrato. Después de una corta incubación, la reacción enzimática se detuvo generando un color. Se realizó la lectura de la absorbancia a la longitud de onda indicada en el inserto de cada uno de los kits de los mediadores inflamatorios, la densidad óptica medida fue directamente proporcional a la concentración del MI.

Procedimiento: Se pipeteó 100 μ L del diluyente en el pocillo S0 (0 ng/mL estándar); mientras en los pocillos S1 al S6 se pipetearon 100 μ L de los estándares del 1 al 6 del mediador inflamatorio correspondiente a la placa y 100 μ L de cada una de las muestras de estudio se pipetearon en cada uno de los pocillos restantes de manera individual. Los contenidos se incubaron a temperatura ambiente por 2 horas. Después de este tiempo, los pocillos se vaciaron y lavaron con la solución de Tween-20 en PBS, este procedimiento se repitió 4 veces. Posteriormente, se añadió 100 μ L anticuerpo de detección específico para cada uno de los mediadores inflamatorios en cada pocillo. Las placas de pocillos se mezclaron y se mantuvieron a temperatura ambiente por 2 horas. Después de este tiempo, los pocillos de las placas se lavaron por triplicado y se agregaron 100 μ L del conjugado de avidina; se incubó por 30 minutos.

Posteriormente el contenido de cada pocillo se vació, y se realizaron 3 lavados. A continuación, se agregó 100 μ L de la solución del sustrato, se dejó incubar para el desarrollo de color. El desarrollo del color fue monitoreado mediante lecturas cada 5 minutos por 45 minutos en un lector de ELISA, empleando una longitud de onda de 405 nm con una corrección a 650 nm.

2.2.5 Marcadores de lesión renal

Los marcadores proteicos de lesión renal (MLR): la molécula-1 de lesión renal (KIM-1) por sus siglas en inglés kidney injury molecule-1), la cistatina C y la lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL) y fueron determinadas por kits de ensayo de ELISA tipo sándwich.

Estos kits emplean un anticuerpo monoclonal anti-MLR inmovilizado en las celdillas de la microplaca para así atrapar al MLR correspondiente de las muestras o estándares. Después de la incubación, el exceso de muestra o estándar se eliminó mediante el lavado; posteriormente se añadió otro anticuerpo monoclonal anti-MLR marcado con biotina, el cual reaccionó cuando se añadió el revelador de peroxidasa de rábano conjugado con estreptavidina, generando un sustrato coloreado. La placa con pocillos llevó a lectura al lector de placas empleando la longitud de onda indicada en el inserto.

Procedimiento: Se pipeteo 100 μ L del diluyente en el pocillo de S0 (0 ng/mL estándar); mientras en los pocillos S1 al S6 se agregaron 100 μ L del estándar correspondiendo para cada uno de los mediadores inflamatorios y 100 μ L de cada una de las muestras de estudio se pipetearon en cada uno de los pocillos restantes de manera individual. Las placas se sellaron con una película plástica

e incubaron a temperatura ambiente por 90 minutos, después de este tiempo se descartó el contenido de cada pocillo. Se agregó el reactivo 1X Biotinilado anti-MLR de rata en cada pocillo, y nuevamente se selló la placa con una nueva película plástica. Después de 1 hora, la placa se lavó por triplicado con 300 PBS y se añadió en cada pocillo el Complejo ABC. Nuevamente la placa se cubrió con una película plástica y se dejó incubando a 37° C por 30 minutos. Posteriormente, se lavó la placa 5 veces con PBS, después se añadió 90 µL del agente TMB en cada pocillo y se dejó incubando durante 30 minutos y finalmente se agregó 100 µL de la solución de paro TMB en cada pocillo. Las muestras se llevaron al lector de placas para medir su absorbancia a 450 nm en un lector de placas.

2.2.6 Análisis Histológico

El tejido renal obtenido de las ratas Wistar tratadas fue embebido en bloques de parafina y fueron seccionados para obtener cortes de 5 mm para su posterior tinción con hematoxilina-eosina. Los cortes se observaron en microscopía de luz para identificar cambios histológicos mediante la evaluación de variables para el daño agudo y crónico. Para el daño agudo se evaluó la degeneración tubular (edema y vacuolización citoplasmática), dilatación tubular, necrosis tubular, congestión vascular, presencia de cilindros proteicos y neutrofílicos, infiltración inflamatoria intersticial e intratubular; mientras las variables de cronicidad evaluadas fueron la fibrosis intersticial y la atrofia tubular. Las variables se evaluaron en una escala de 0 a 5 de la siguiente forma:

- Grado 0, no existe presencia de alteraciones
- Grado 1, daño hasta un 20% del tejido evaluado
- Grado 2, daño entre 21-40% del tejido evaluado
- Grado 3, daño entre 41-60% del tejido evaluado
- Grado 4, daño entre 61-80% del tejido evaluado
- Grado 5, daño entre 81-100% del tejido evaluado

El análisis de los resultados se denominó índice total histopatológico y se calculó por medio de la suma total de las variables histológicas antes mencionadas.

2.2.7 Análisis estadístico

Los resultados de los análisis bioquímicos, mediadores inflamatorios y de daño renal fueron expresados como media \pm desviación estándar. Los datos fueron analizados utilizando el software GraphPadPrism (versión 6; GraphPad Software, Inc), mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguido de comparaciones múltiples de Tukey. Una $p < 0.05$ fue considerada como significativa.

2.2.8 Preparación de muestras para la adquisición del espectro por ^1H -RMN

Para el análisis por RMN se tomaron 500 μL de las muestras de orina a las cuales se les añadió 60 μL de D_2O al 0.75% (v/v) de TSP y 40 μL de una disolución amortiguadora de fosfatos $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 1.5 M pH=7.0. Posteriormente, la muestra con D_2O y amortiguador fue agitada vigorosamente por 1 minuto y después fue centrifugada a 13000 x g durante 5 minutos.

Finalmente, 550 μ L de sobrenadante fueron transferidos a tubos de RMN de 5 mm.

Las muestras se enviaron al laboratorio de RMN del Departamento de Química Analítica para su análisis en un equipo RMN Bruker de 400 MHz Avance III HD equipado con una sonda BBO SmartPRObe a temperatura controlada a 298 K. Los datos de RMN se obtuvieron a través del experimento de una dimensión del efecto Overhauser nuclear con presaturación (1D NOESYPRD), el cual permite eliminar de manera artificial la señal del agua.

Los espectros se obtuvieron con 128 incrementos y 32768 puntos de datos sobre una anchura espectral de 21.04 ppm (8417.509 Hz), empleando un tiempo de adquisición de 1.95 segundos. Los espectros se corrigieron y se referenciaron al patrón interno del TSP, calibrado la señal singulete de este compuesto a 0.0 ppm.

Todos los espectros se adquirieron y procesaron usando el programa TOPSPIN (versión 3.5, Bruker BiospinLtd) de forma semi-automática aplicando las siguientes funciones de procesamiento: LB (0.1), EM, FT con corrección manual de línea base y finalmente la función de normalización de línea base ABSN.

A continuación, se realizó una búsqueda bibliográfica de metabolitos reportados en la literatura en muestras de orina examinadas por RMN, la cual fue empleada como guía para la identificación de los metabolitos presentes en las muestras analizadas de los grupos experimentales. A partir de cada uno de los metabolitos listados se realizó una búsqueda en las bases de datos de la Human Metabolomic Data Base (HMDB, <http://www.hmdb.ca/>) y de la Biological Magnetic Resonance Bank (BMRB, <http://www.bmrwisc.edu/>), las cuales permitieron la obtención de

los espectros para su comparación con los espectros de cada grupo experimental. La comparación entre los datos obtenidos y los reportados en las bases de datos fueron respecto al desplazamiento químico, multiplicidad de la señal y constantes de acoplamiento.

2.2.9 Pretratamiento de datos

Para la importación y el tratamiento estadístico de los datos contenidos en los espectros se utilizó el programa PLS-Toolbox (versión 7.9 para entorno Matlab, de Eigenvector Research). Los datos fueron importados al entorno de Matlab (The MathWorks, Inc) con el comando `jcampreadr`, el cual permite convertir archivos JCAMP-Dx, provenientes de los espectros de RMN a matrices matemáticas almacenadas en el programa como un arreglo de datos.

Para el preprocesamiento previo al análisis estadístico, se revisó de manera general los espectros y se identificaron áreas que no aportaban información útil como las regiones de los extremos (0.0-0.5 y 9.5-21.00 ppm), además de regiones que podían interferir para un análisis multivariante adecuado como lo son la señal de la supresión del agua (4.68-5.05 ppm) en conjunto con las señales que corresponden al ácido fólico (1.95–2.19; 2.23–2.37; 4.25–4.35; 4.46–4.49; 6.74–6.79; 7.60–7.70; 8.05–8.12; y 8.68–8.72 ppm). Asimismo, reportes en la literatura indican que previo al análisis metabólico de la orina es necesario corregir los fenómenos de “desplazamiento a la deriva” y variaciones por dilución hídrica. El “desplazamiento a la deriva” genera que las señales de los metabolitos sufran corrimientos debido a la diversidad del ambiente químico propio de cada orina y estos no se presenten en las regiones

descritas en la literatura por lo que es necesario emplear estrategias de alineación. Por otra parte, las variaciones debido a la dilución son resultado del estado hídrico de cada organismo, lo que afecta la intensidad de las señales por lo que se vuelve necesario realizar normalización de los espectros. A partir de estos hallazgos se procedió con la evaluación para el pretratamiento de los datos el cual permitió ir corrigiendo las señales espectrales.

2.2.10 Análisis de componentes principales

El PCA fue empleado con la finalidad de examinar la formación de agrupamientos entre las muestras y poder identificar las variables que contribuían a dichas separaciones. El modelo fue validado empleando la validación cruzada y para evaluarlo se empleó el RMSECV.

Los gráficos de score de las primeras tres componentes fueron empleados para evaluar la separación entre agrupamientos, mientras que los gráficos de loadings fueron empleados para la identificación de las variables espectrales que contribuían a la separación de los grupos.

2.2.11 Evaluación de la aplicabilidad del PCA

Para evaluar la aplicabilidad del modelo matemático construido se tomaron muestras de orina de ratas ajenas al modelo experimental utilizado para construir el PCA: una como control, tres en del grupo de daño leve y dos del grupo de daño moderado; las cuales se procesaron de acuerdo con el pretratamiento de datos establecido y se proyectaron en el PCA construido para ver si se ubicaban dentro del grupo correspondiente.

2.2.12 Evaluación de rutas metabólicas alteradas

Con la finalidad de poder comparar los resultados obtenidos en la identificación de variables del PCA se realizó el análisis de las vías metabólicas con el software en línea Metaboanalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/>). Para el análisis en la plataforma se dieron de alta los nombres de los metabolitos que tuvieron una mayor contribución en la separación de los distintos grupos. El software emplea la base de datos de la KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) y presenta un gráfico de los compuestos químicos ordenados de acuerdo con sus puntuaciones del análisis de enriquecimiento (eje de las ordenadas) y análisis topológico (eje de las abscisas). El color del nodo es en base a sus valores de p y el radio del nodo determina el valor de impacto que tiene en la vía metabólica (a mayor tamaño mayor impacto).

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Desarrollo de un modelo experimental de daño renal crónico que simule las etapas de daño renal en el humano

La administración de dosis diarias de ácido fólico por vía intraperitoneal permitió generar la transición progresiva del daño renal agudo hacia el daño renal crónico. De manera macroscópica los riñones de los grupos experimentales se observaron hipertróficos, más pálidos y era posible apreciar la precipitación del ácido fólico, imágenes representativas se muestran en la Figura 10. El daño renal crónico se evaluó por medio de la clasificación de Ormrod D. y Miller T. la cual emplea la cuantificación de BUN sérico para estratificar las fases de daño en: leve (40-99 mg/dL), moderado (100-200 mg/dL) y severo (>200 mg/dL). También se evaluaron los niveles séricos de creatinina. Los resultados de los parámetros bioquímicos de la función renal se muestran en la Tabla 8, en donde se observó una diferencia significativa entre los cuatro grupos.

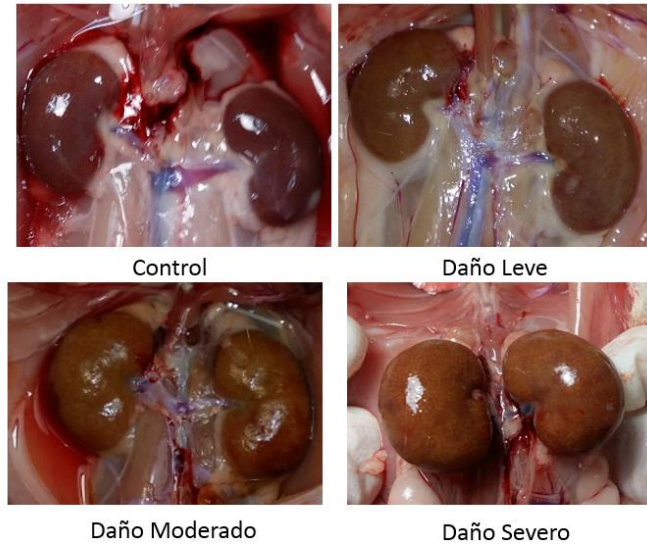


Figura 10. Apreciación macroscópicas de los riñones en las distintas fases del modelo experimental .

TABLA 8
PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN SUERO DE LOS DISTINTOS ESTADIOS
DE LA ENFERMEDAD RENAL EN EL MODELO EXPERIMENTAL

Parámetro	Control n=6	Daño Leve n=6	Daño moderado n=6	Daño Severo n=6	p
Creatinina (mg/dL)	0.60 ± 0.11	1.25 ± 0.30	2.17 ± 0.24	5.11 ± 1.31	< 0.0001
BUN (mg/dL)	20.83 ± 2.31	56.83 ± 11.84	112.80 ± 10.74	261.70 ± 55.65	< 0.0001

3.2 Establecimiento de la diferencia entre los biomarcadores de lesión renal, inmunológicos e histológicos de los grupos con y sin daño renal entre las diversas fases de estudio.

3.2.1 Parámetros proteicos

Molécula 1 de lesión renal (KIM-1): Se determinó el contenido sérico de KIM-1 mediante el Kit de ELISA Ab119597- KIM-1 Rat (Abcam, Inc.). La concentración del grupo control (22.02 ± 12.31 pg/mL) fue menor en comparación con el grupo de daño leve (901.25 ± 277.52 pg/mL, $p \leq 0.0001$), grupo de daño moderado (929.16 ± 349.43 pg/mL, $p \leq 0.001$) y grupo de daño severo (1538.12 ± 318.37 pg/mL, $p \leq 0.0001$). Entre los grupos de daño, solo se observa diferencia significativa entre el grupo de daño severo frente al grupo de daño leve y moderado ($p=0.0236$) (Figura 11).

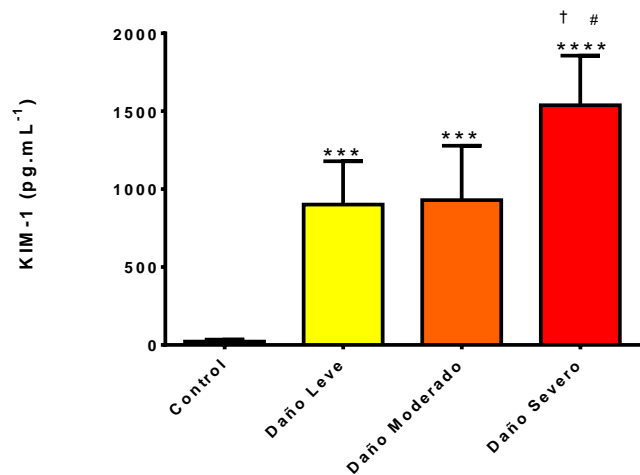
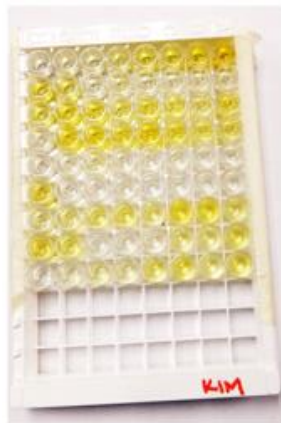


Figura 11. Niveles de KIM-1 sérico. *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ versus control; † $p < 0.05$, versus daño leve; # $p < 0.05$ versus daño moderado.

Cistatina C: La cuantificación sérica de la proteína Cistatina C se llevó a cabo con el Kit de ELISA Quantikine ELISA kit Mouse/Rat Cystatin C (R&D Systems, Inc.). El grupo control (4.16 ± 1.73 pg/mL) mostró una diferencia significativa en comparación con cada uno de los distintos grupos de daño: leve (7.91 ± 1.58 pg/mL, $p \leq 0.0001$), moderado (9.36 ± 1.02 pg/mL $p \leq 0.0001$) y severo (9.62 ± 0.66 pg/mL) con una tendencia a mostrar mayor concentración sérica conforme se incrementó la severidad del daño. (Figura 12).

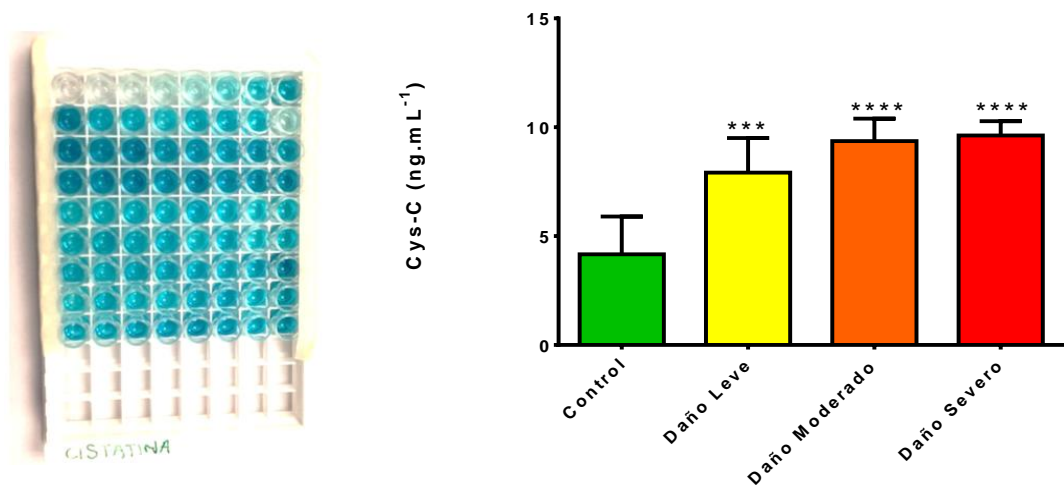


Figura 12. Niveles de cistatina C en suero. *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs control.

Lipocalina asociada a la gelatinasa neutrófila (NGAL): La cuantificación sérica de NGAL mediante el Kit Ab119602- Lipocalin-2 Rat ELISA Kit (Abcam, Inc.) mostró diferencia significativa entre el grupo control (8.96 ± 2.58 pg/mL) respecto a cada uno de los grupos de daño: leve (16.62 ± 0.83 pg/mL, $p < 0.05$), y severo (4.25 ± 0.79 pg/mL, $p < 0.0001$). Se observó un aumento en la fase de daño

leve y después disminuyó su contenido conforme aumentó la severidad del daño. Entre las diversas fases de daño solo se observó diferencia significativa entre el grupo de daño leve frente al daño moderado y severo (Figura 13).

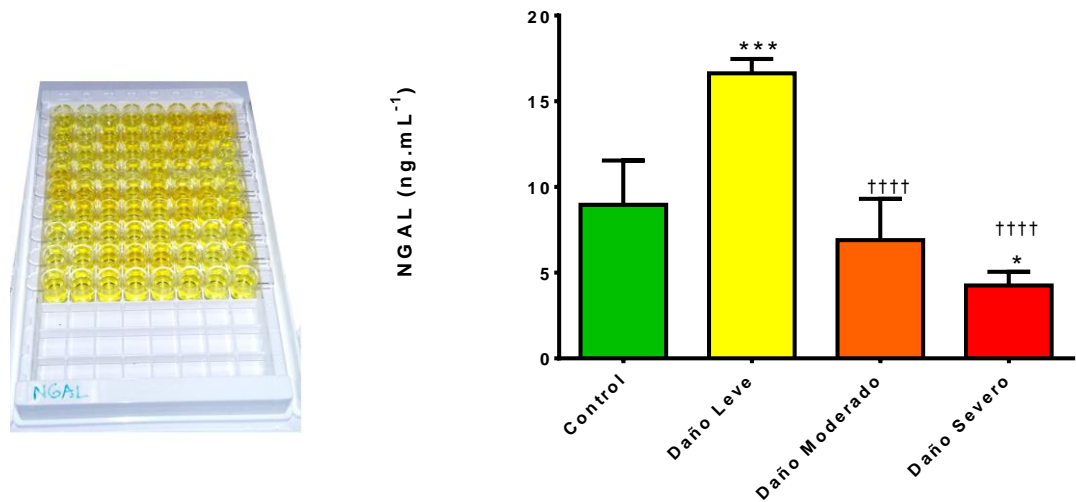


Figura 13. Niveles de NGAL sérico. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, *versus* control.

†††† $p < 0.0001$ *versus* daño leve.

3.2.2 Parámetros inmunológicos

Los valores séricos de los mediadores inflamatorios: IL-1 β , IL-6 y FNT- α , fueron evaluados con su correspondiente kit de rata (PeproTech, Mexico). (Figura 14).

La IL-1 β mostró diferencia significativa entre el grupo control (0.07 ± 0.3 ng/mL) y los grupos de daño moderado (1.22 ± 0.16 ng/mL, $p < 0.0001$) y severo (1.84 ± 0.19 ng/mL, $p < 0.0001$); se observó tendencia al aumento de su concentración conforme el daño progresó.

La IL-6 mostró diferencia significativa ente el grupo control (0.86 ± 0.14 ng/mL) y los grupos de daño moderado (1.75 ± 0.37 ng/mL, $p < 0.0001$) y severo (2.06 ± 0.30 ng/mL, $p < 0.0001$).

El FNT- α mostró diferencia significativa entre el grupo control (0.37 ± 0.25 ng/mL) respecto a cada uno de los grupos de daño: leve (1.85 ± 0.09 ng/mL, $p < 0.0001$), moderado (4.25 ± 0.34 ng/mL, $p < 0.0001$) y severo (6.44 ± 1.07 ng/mL, $p < 0.0001$); se observó una tendencia en el aumento de su concentración conforme aumento la severidad del daño.

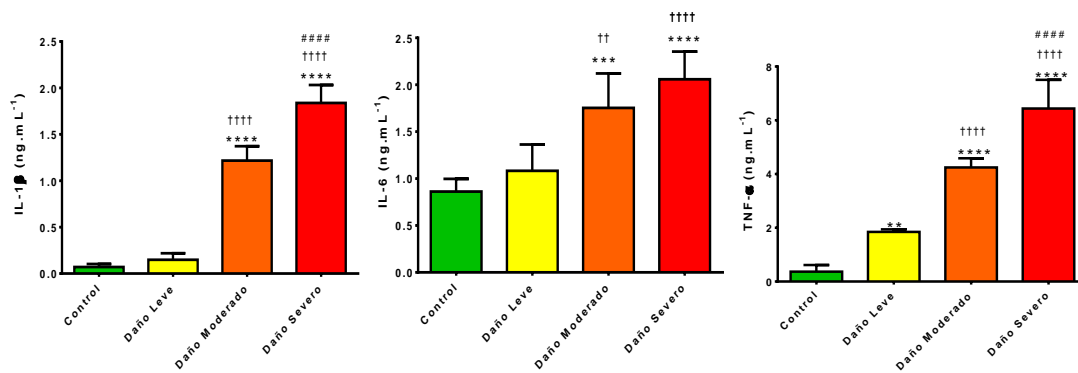


Figura 14. Citocinas proinflamatorias en suero. *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs control; †† $p < 0.01$, ††† $p < 0.0001$ vs daño leve; #### $p < 0.0001$ vs daño moderado

3.2.3 Parámetros histológicos

La histología del riñón del grupo control y los grupos experimentales se evaluaron en una escala histológica que se muestra en la Tabla 9. El tejido del grupo control mostró una arquitectura normal, con parénquima, túbulos contorneados y glomérulos bien conservados; a diferencia de las muestras del

grupo de daño leve, en la cual se apreció una arquitectura alterada en un 30% de la muestra, con la aparición de intersticio basófilo por infiltrado inflamatorio mixto, además de afectación tubular y dilatación aislada. En el grupo de daño moderado la arquitectura se apreció alterada hasta en un 60% de la muestra, con aumento del intersticio el cual rodeaba islas de tejido conservado, una mayor dilatación tubular y depresión de la cápsula. Finalmente en el grupo de daño severo se apreció alteración de la arquitectura renal hasta en un 90%, con zonas aisladas de tejido conservado, dilatación tubular evidente y severa con cilindros con detritus celulares e infiltrado inflamatorio (Figura 15).

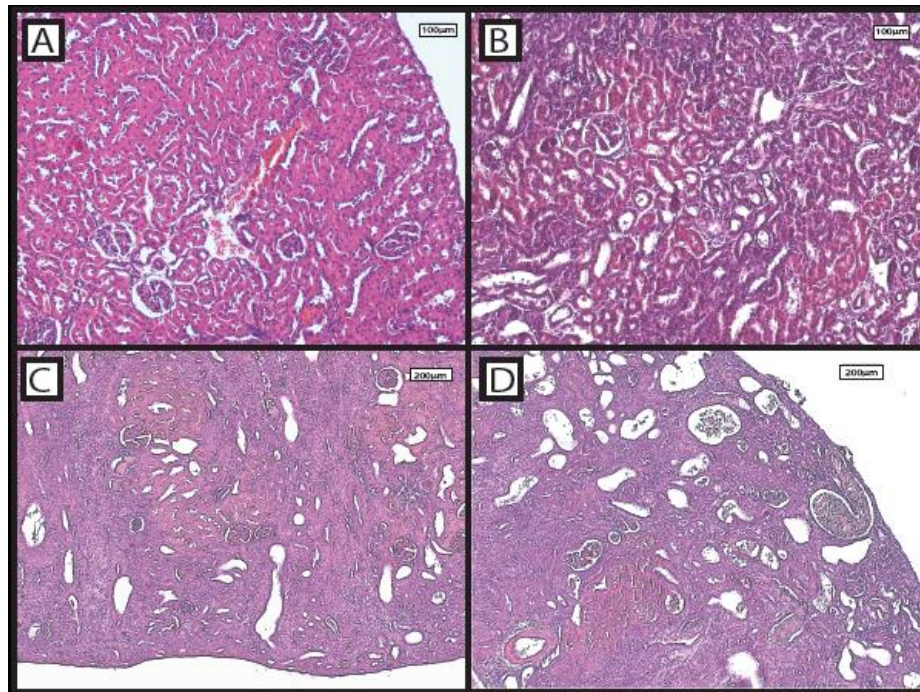


Figura 15. Tejido renal con tinción HyE. a) Control, b) Daño leve, c) Daño moderado, d) Daño Severo.

TABLA 9
EVALUACIÓN HISTOPATOLÓGICA DEL DAÑO INDUCIDO POR
ADMINISTRACIONES REPETIDAS DE ÁCIDO FÓLICO.

Variables evaluadas	Grupos de daño:			
	Control	Leve	Moderado	Severo
Alargamiento del espacio de Bowman	0.7	1.0	2.0	2.7
Cambios degenerativos tubulares	1.0	0.5	2.3	2.7
Dilatación tubular	0.0	2.0	3.7	4.3
Necrosis tubular	0.0	0.0	0.7	1.0
Congestión vascular	1.0	0.5	0.7	1.3
Cilindros proteícos	1.0	1.0	1.7	1.3
Cilindros neutrofílicos	0.0	0.5	2.0	1.7
Infiltración intersticial de leucocitos	0.7	2.5	3.7	4.0
Infiltración intratubular de leucocitos	0.0	1.0	2.7	2.3
Fibrosis intersticial	0.0	0.5	2.0	3.0
Atrofia tubular	0.0	2.0	3.0	3.3
índice total histopatológico	4.3	11.5	24.3	27.6

3.3 Implementación de una metodología para el procesamiento de datos a partir de los espectros de ^1H -RMN e identificación de las señales características de los metabolitos mayoritarios

Las muestras se prepararon como se describió en la sección “2.2.9 Preparación de las muestras para la adquisición de espectros por ^1H -RMN” y posteriormente se enviaron al laboratorio de resonancia del departamento de Química Analítica donde se obtuvieron los espectros de una y dos dimensiones de RMN. En la figura 16 se observan los espectros de ^1H -RMN de las muestras de orina de los distintos grupos.

A continuación, se realizó una búsqueda bibliográfica de metabolitos reportados en la literatura en muestras de orina examinadas por RMN la cual fue empleada como guía para la identificación de los metabolitos presentes en las muestras analizadas de los grupos experimentales (Ji et al., 2016; Jun-Sheng, Lei, Xiao-Li, Huan, & Xue-Mei, 2018; Lenz, Bright, Knight, Wilson, & Major, 2004; Raghunath Pariyani et al., 2017; Potts et al., 2001; Stanley et al., 2005). La asignación de señales se basó en la inspección visual de los espectros de ^1H -RMN, de los cuales se obtuvieron los desplazamiento químico, multiplicidad de señal y constantes de acoplamiento. La información se comparó con bases de datos de la Human Metabolomic Database y Biological Magnetic Resonance. Adicionalmente, el análisis comparativo de los espectros en dos dimensiones TOCSY, COSY y HSQC permitió confirmar la asignación de las señales al verificar correlaciones homonucleares y heteronucleares y datos de desplazamiento químico. De esta manera se consiguió la identificación de 23 metabolitos los cuales se muestran en las Figura 17 y 18.

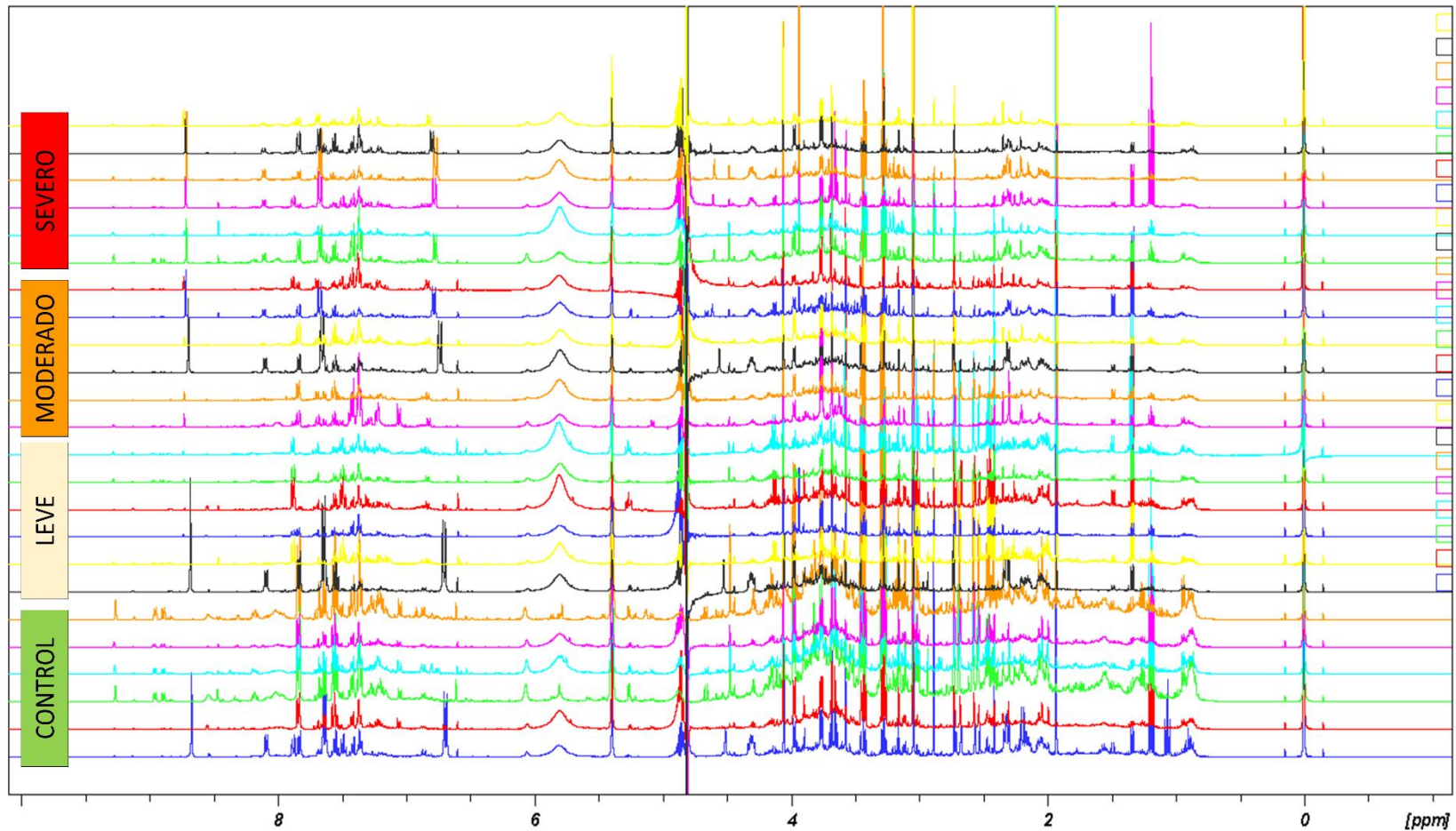


Figura 16. Sobreposición de los espectros de ¹H-RMN de las muestras de orina de cada grupo (n=6) obtenidos a 400 MHz. La referencia de la escala de desplazamiento químico es la señal singulete del TMP a 0.0 ppm.

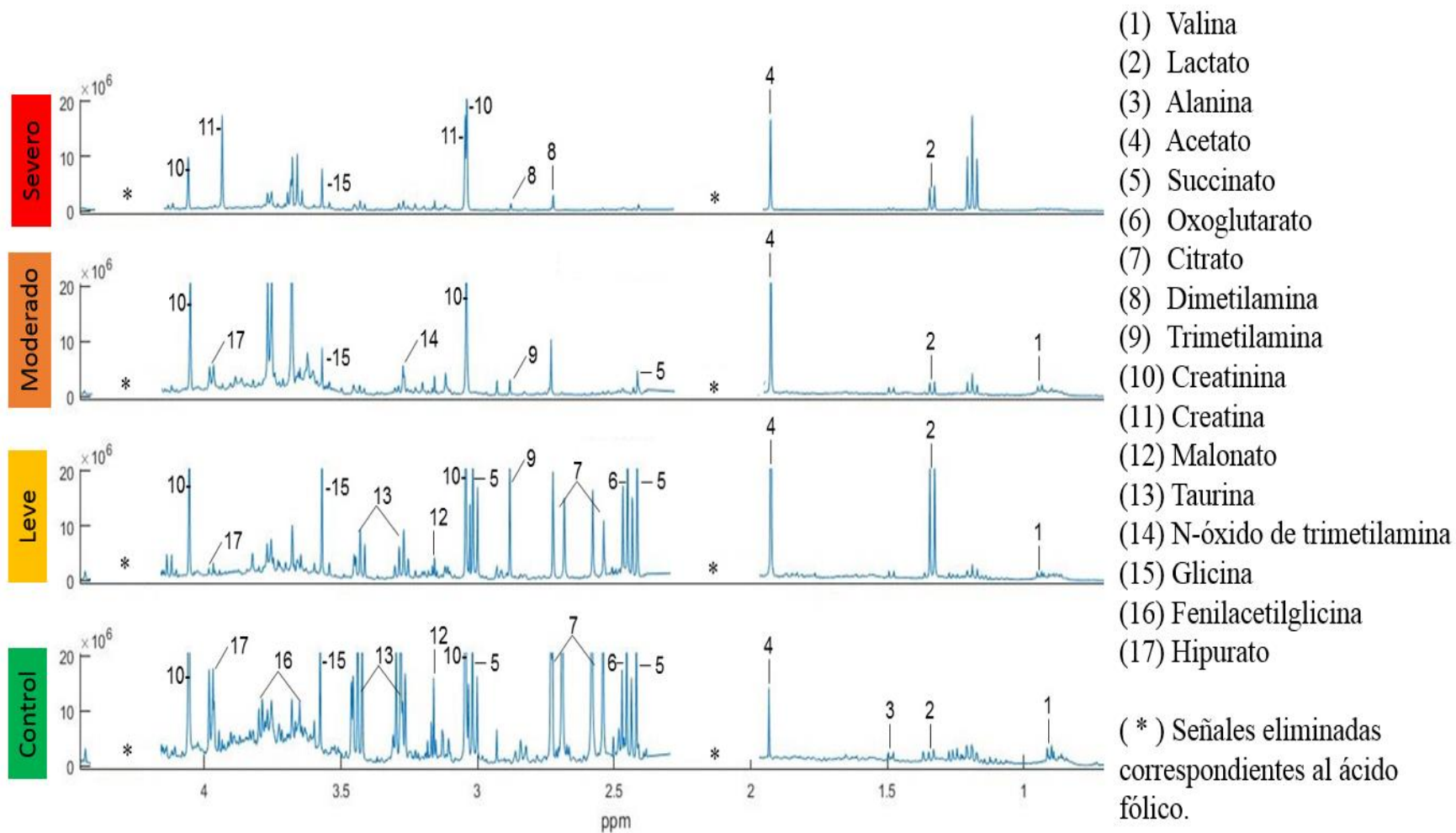


Figura 17. Identificación de las señales de los metabolitos mayoritarios en los espectros de ^1H -RMN a campo alto.

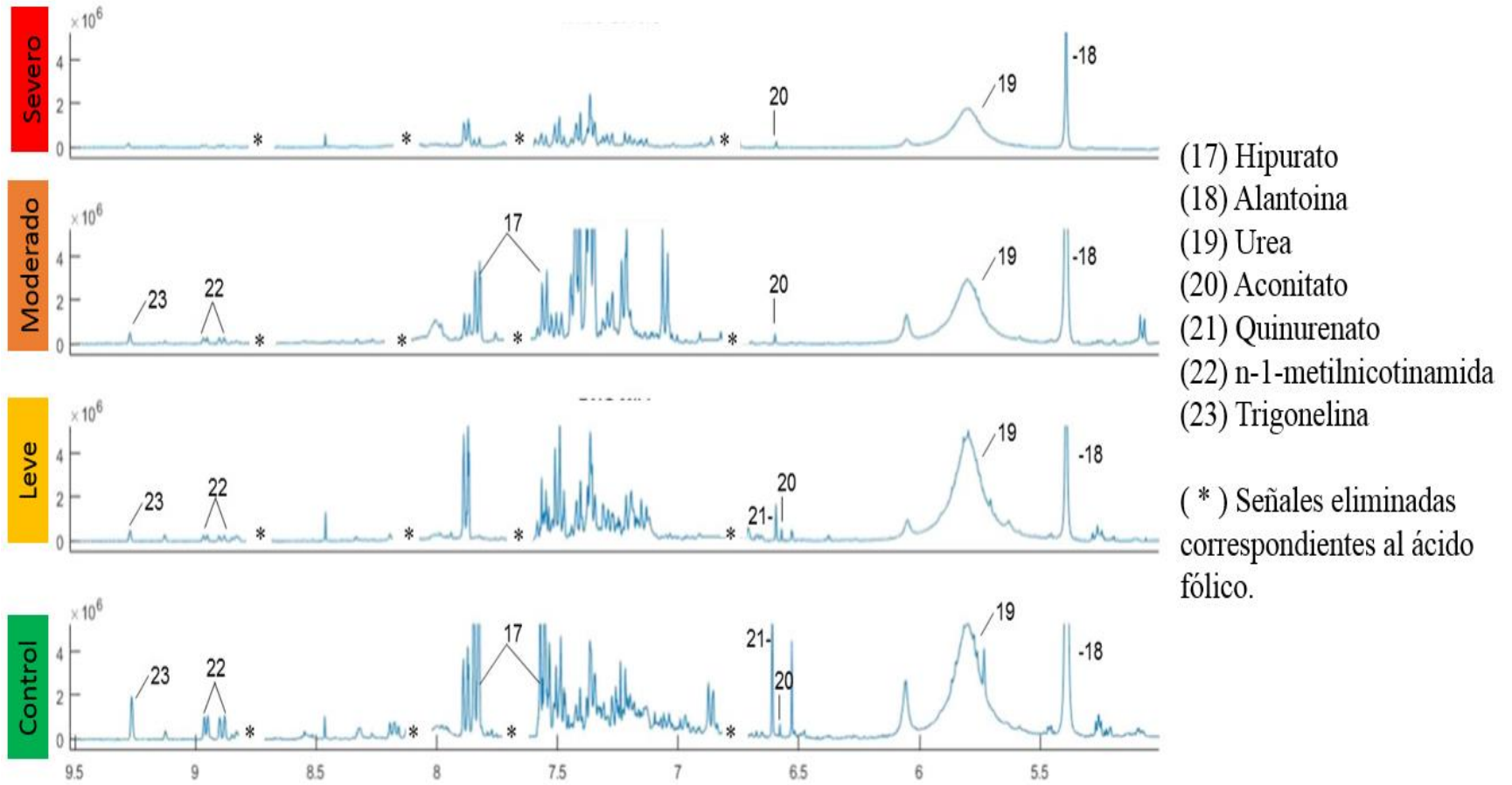


Figura 18. Identificación de las señales de los metabolitos mayoritarios en los espectros de ¹H-RMN a campo bajo.

Los metabolitos que se identificaron en los distintos espectros fueron clasificados de acuerdo con la vía metabólica en la que intervienen y se realizó una comparación de la intensidad de las señales entre los grupos de daño y el grupo control, los resultados se presentan en la Tabla 10. Para facilitar la comparación entre los grupos se realizó un sub-gráfico de cada uno de los grupos experimentales el cual permitió una comparación de la misma región espectral bajo la misma escala, un ejemplo de esto se muestra en la Figura 19. Información complementaria se puede encontrar en el apéndice.

TABLA 10

METABOLITOS IDENTIFICADOS EN LOS ESPECTROS DE ¹H-RMN DE LAS MUESTRAS DE ORINA DE CADA GRUPO

Metabolito	HMDB ID	¹ H-NMR	Leve	Moderado	Severo
		Desplazamiento químico (ppm, multiplicidad)			
Metabolitos energéticos					
Acetato	HMDB0000042	1.92 (s)	↑	↑	↑
Aconitato	HMDB0000072	3.45 (d) 6.58 (s)	↑	↑	↑
Citrato	HMDB0000094	2.54 (d) 2.69 (d)	↓	↓	↓
Creatinina	HMDB0000562	3.03 (s) 4.05 (s)	↓	↓	↓
Lactato	HMDB0000190	1.33 (d)	↑	≈	≈
Oxoglutarato	HMDB0000208	2.44 (t) 3.01 (t)	≈	↓	↓
Succinato	HMDB0000254	2.41 (s)	↑	↓	↓
Metabolismo de aminoácidos					
Alanina	HMDB0000161	1.48 (d)	≈	≈	↓
Creatina	HMDB0000064	3.04 (s) 3.93 (s)	≈	≈	↑
Glicina	HMDB0000123	3.56 (s)	↑	↓	↓
Quinurenato	HMDB0000715	6.61 (s)	↓	↓	↓
Malonato	HMDB0000691	3.11 (s)	↓	↓	↓
Urea	HMDB0000294	5.80 (s)	≈	↓	↓
Valina	HMDB0000883	0.99 (dd)	↓	↓	↓

TABLA 10 Continuación

Metabolito	HMDB ID	¹ H-NMR Desplazamiento químico (ppm, multiplicidad)	Leve	Moderado	Severo
Hipurato	HMDB0000714	3.97 (d) 7.55 (t) 7.64 (t) 7.83 (d)	↓	↓	↓
Osmolitos orgánicos					
DMA	HMDB0000087	2.72 (s)	↓	↓	↓
TMA	HMDB0000906	2.89 (s)	↑	↑	↑
TMAO	HMDB0000925	3.27 (s)	↓	↓	↓
Taurina	HMDB0000251	3.27 (t) 3.43 (t)	↓	↓	↓
Metabolismo de cofactores y vitaminas					
NMN	HMDB0000699	9.27 (s) 8.99(d) 8.89 (d) 8.18 (t) 4.48 (s)	↓	↓	↓
Otros					
Alantoína	HMDB0000462	5.39 (s)	↓	↓	↓
PAG	HMDB0000821	3.67 (s) 3.76 (d)	↓	↓	↓
Trigonelina	HMDB0000875	8.06 (tt) 8.83 (tt) 9.11 (s)	↓	↓	↓

DMA: dimetilamine; TMA: trimetilamine; TMAO: N oxido de trimetilamina; NMN= N1-metilnicotinamida; PAG=*fenilacetilglicina*

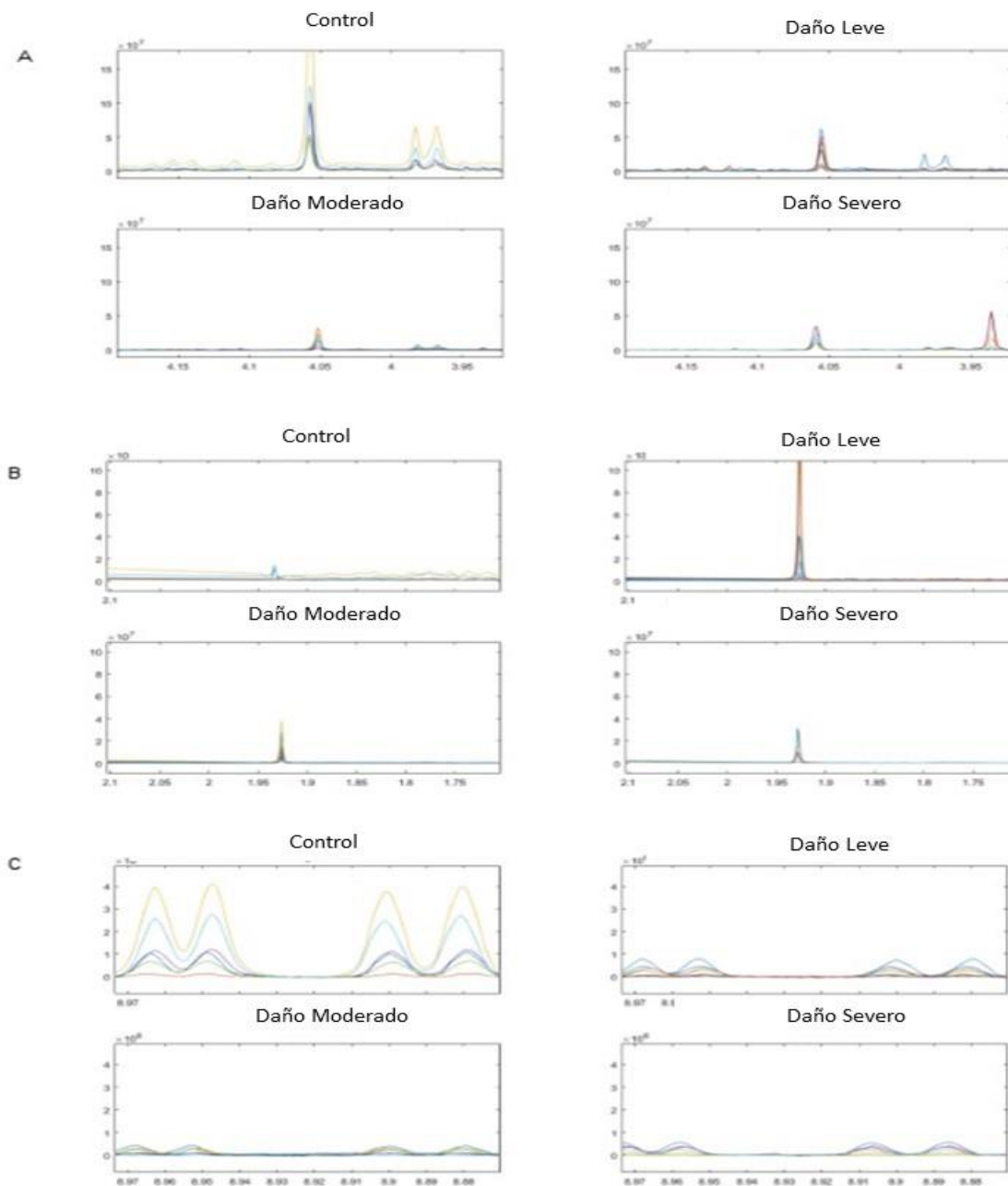


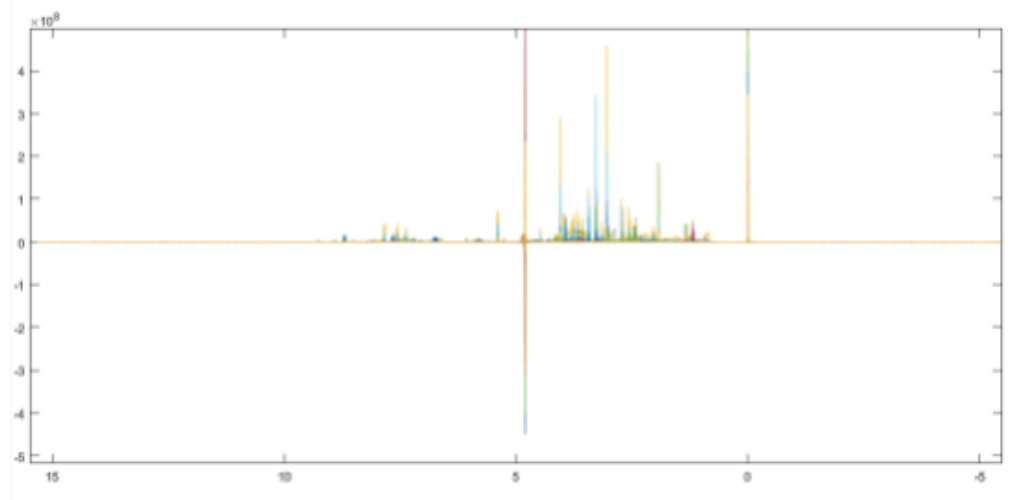
Figura 19. Regiones seleccionadas del espectro de $^1\text{H-NMR}$ de las muestras de orina de cada grupo experimental. (A) Señal singulete de la creatinina (4.05 ppm) y doblete del hipurato (3.97 ppm). (B) Señal de singulete del acetato (1.92 ppm). (C) Señal doblete de n-1-meilnicotinamida (8.89 and 8.99 ppm).

3.4 Definición de los pretratamientos de datos y los parámetros estadísticos adecuados para la construcción de los diferentes modelos quimiométricos, para la obtención de los perfiles metabolómicos de las distintas fases de la ERC.

3.4.1 Selección de regiones relevantes

Se seleccionaron las regiones que aportan información relevante y se eliminaron aquellas que no aportan información útil para el análisis multivariante. En el caso específico de las muestras de orina, las regiones iniciales y finales (0.0-0.5 y 9.5-21.0 ppm respectivamente) se eliminaron ya que no existen señales de metabolitos. Además, la señal residual del agua (4.68-5.05 ppm) generó interferencias en el análisis quimiométrico, por lo que también fue eliminada. Esta selección permitió disminuir de 32,787 puntos de cada uno de los espectros a tan solo 13,445 puntos por espectro. La apariencia final del espectro se muestra en la Figura 20.

A.



B.

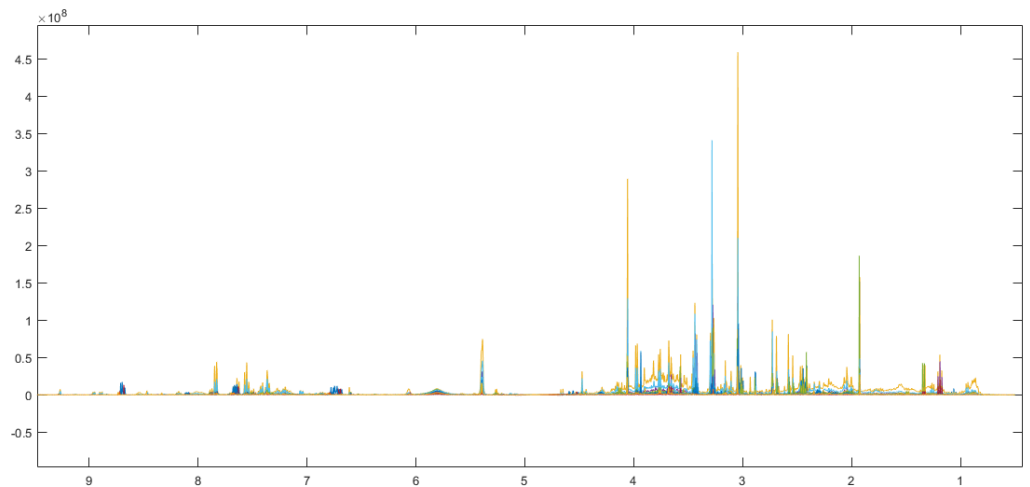


Figura 20. Comparación de los espectros de RMN del conjunto de muestras antes y después de la selección de regiones relevantes. a) Datos crudos obtenidos directos del espectro y b) después de eliminar las regiones de -5.63 a 0.50 ppm (región inicial), 4.50 a 4.90 ppm (región de supresión del agua) y 9.5 a 15.33 ppm (región final).

3.4.2 Combinación de datos (binning)

El binning de los datos se realizó empleando el promedio de la combinación de dos columnas; y permitió reducir la información sin perder la calidad informativa, como se observa en la Figura 21.

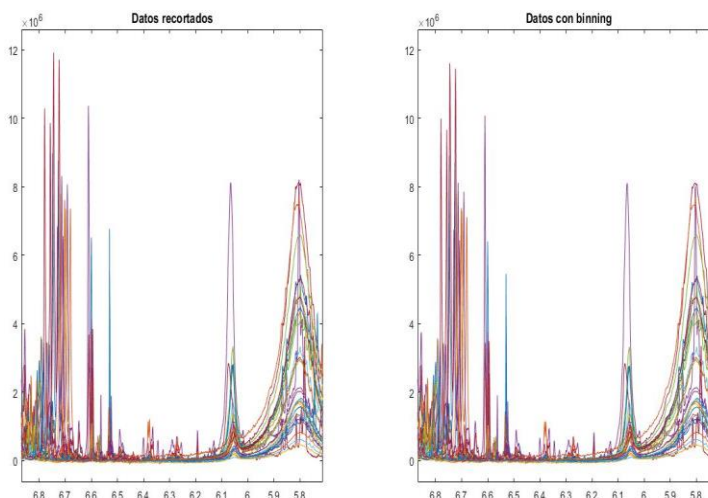


Figura 21. Comparación de los espectros de RMN del conjunto de muestras posterior a la combinación de datos (binning). a) Datos recortados y b) después de la combinación.

3.4.3 Alineado

Para corregir los corrimientos generados debido al ambiente químico de las muestras de orina se empleó el algoritmo de desplazamiento de intervalos correlacionado optimizado, también conocido como icoshift (Savorani, Tomasi, & Engelsen, 2010).

La alineación se realizó por grupos, mediante la selección de 45 intervalos (0.5-1.025, 1.1299-1.2313, 1.3135-1.3841, 1.9079-1.9490, 1.9670-2.1095, 2.3959-2.5050, 2.5191-2.6000, 2.6539-2.7464, 2.862-2.8992, 2.9582-3.0263,

3.0276-3.07, 3.1098-3.1406, 3.1419-3.1765, 3.1778-3.24.20, 3.2444-3.3357, 3.391-3.4757, 3.5540-3.5874, 3.6246-3.6991, 3.7363-3.7864, 3.9225-3.9495, 3.9508-3.9957, 4.0394-4.0817, 4.0830-4.2243, 4.2551-4.3694, 4.4194-4.4952, 4.4965-3.6801, 5.0595-5.1532, 5.1751-5.2341, 5.2354- 5.3009, 5.3330-5.4344, 6.5566-6.6285, 6.6298-6.8969, 7.0073-7.0766, 7.1177-7-3142, 7.3155-7.3938, 7.3951-7.4580, 7.4593-7.6005, 7.6018-7.7379, 7.7957-7.8599, 7.8612-7.9048, 8.0550-8.1398, 8.1411-8.2168, 8.6341-8.7227, 8.8087-9.0052, 9.2453-9.3210 ppm), los cuales fueron seleccionados por inspección visual de acuerdo a la presencia de señales. Para el espectro de referencia se empleó la opción “max”, el cual implica que se utiliza como referencia el espectro que tiene las características máximas como referencia. En la Figura 22 se muestra una región representativa para la comparación del espectro previo y después a la alineación.

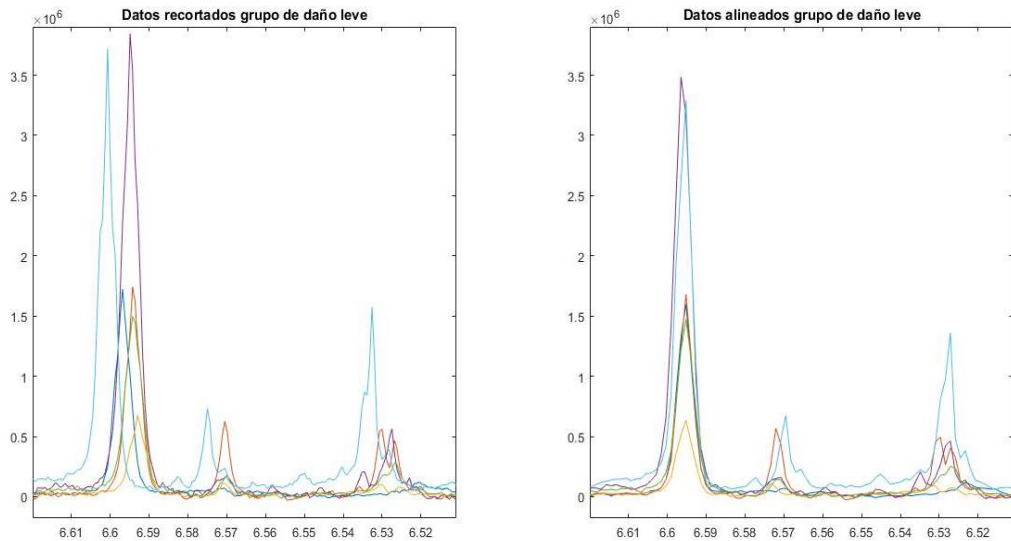


Figura 22. Comparación de una región espectral antes y después del alineado.

3.4.4 Eliminación de las señales de ácido fólico

Posterior a la alineación se eliminaron las señales correspondientes al ácido fólico ya que podrían influenciar de manera negativa en el análisis multivariante. Estas señales se identificaron empleando la metodología ya descrita para la identificación de los metabolitos y correspondieron a las regiones: 1.95–2.19; 2.23–2.37; 4.25–4.35; 4.46–4.49; 6.74–6.79; 7.60–7.70; 8.05–8.12; y 8.68–8.72 ppm. Además, los espectros experimentales se compararon con una muestra de orina de rata control adicionada con ácido fólico.

3.4.5 Normalización

Para la normalización se probaron distintos métodos (SNV, MSC, EMSC y PQN), cuyos efectos en los datos espectrales fueron evaluados mediante algunas figuras de mérito del PCA, los resultados se muestran en la Tabla 11. Dentro de los distintos métodos se seleccionó la normalización por cociente probabilístico (PQN), el cual presentó el menor número de componentes principales (3), una mayor explicación con el primer componente (37.53%) y un error cuadrático menor ($RMSECV=0.0002$). En la figura 23 se observan los efectos de la normalización.

TABLA 11
COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS DE NORMALIZACIÓN PROBADOS.

	Número de componentes principales	Varianza acumulada	Explicación de la 1aPC	RMSECV
SNV	5	79.02	33.56	0.4851
PQN	3	74.91	37.53	0.0002
MSC	7	86.53	28.80	1,694,000
EMSC	7	86.55	29.05	1,773,600

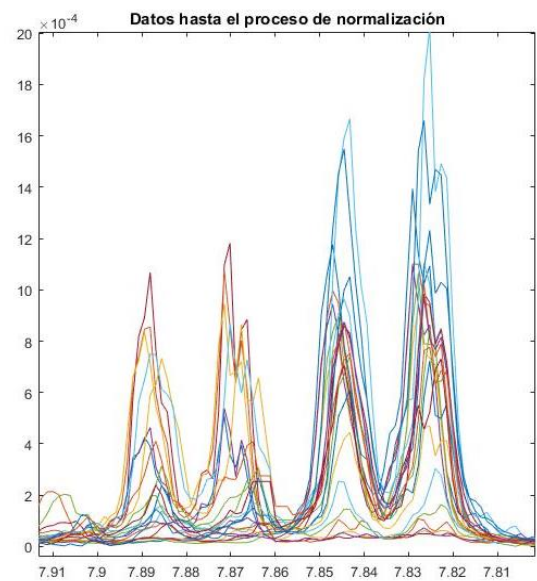
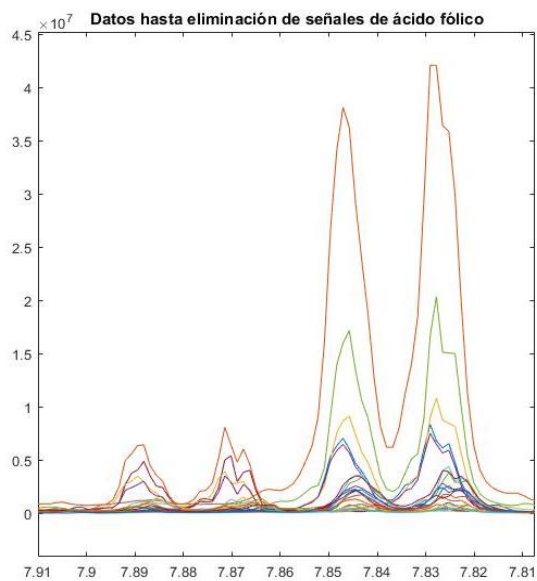


Figura 23. Comparación de una región espectral posterior a la normalización.

3.4.6 Análisis de componentes principales (PCA)

El modelo de PCA fue construido posterior al preprocesamiento, añadiendo el centrado de los datos y empleando 3 componentes principales; presentado una varianza explicada del 74.91%. En el gráfico de scores se pueden observar las pautas de agrupación de acuerdo con el grupo experimental (Figura 24). La primera componente principal separó al grupo de daño severo, al posicionarse en valores positivos del score mientras que los otros grupos se ubicaron en valores negativos. La segunda componente principal separó al grupo control al posicionarse en valores positivos del score. Finalmente, la tercera componente principal separó al grupo de daño leve del grupo de daño moderado; a valores positivos se aglomero el grupo de daño leve; mientras que a valores negativos se observaron las muestras correspondientes al grupo de daño moderado.

El análisis de los loadings (Figura 25) sugirió que la separación del grupo de daño severo por parte de la primer componente se debió principalmente a las variables del espectro de $^1\text{H-RMN}$ ubicadas a 1.93, 3.04, 3.93, 4.05 y 5.39 ppm; el grupo control por parte de la segunda componente fue por las variables ubicadas a 3.04, 3.28, 3.44, 4.05, 7.55 y 7.83 ppm; el grupo de daño leve por parte de valores positivos de la tercera componente principal debido a las variables ubicadas a 1.33, 1.92, 2.41, 2.54, 2.69, 3.04, 3.27, 3.57, 3.05 ppm; mientras que las variables a valores negativos de esta misma componente que diferenció al grupo de daño moderado se ubicaron a 2.54, 2.69, 3.04, 3.27, 3.67, 3.76 y 3.05 ppm. Se relacionaron las ubicaciones de estas variables en el espectro de RMN y se identificaron los metabolitos que hicieron posible la separación de los grupos, los cuales se muestran en la Tabla 12.

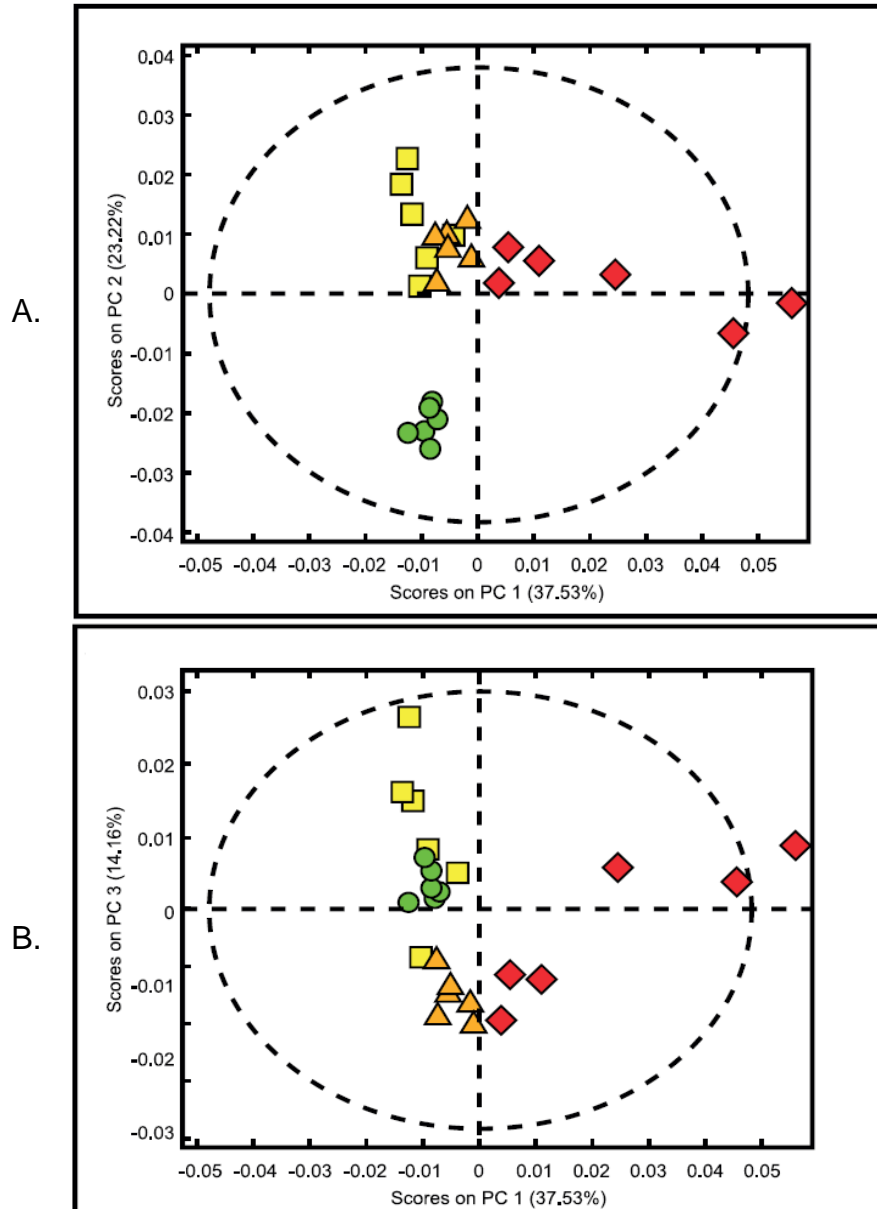


Figura 24. Gráficas de scores del PCA. A. Gráfica 2D de los scores PC1 vs PC2. B. Gráfica 2D de los scores PC1 vs PC3. ● Grupo control; ■ Grupo daño leve; ▲ Grupo daño moderado; ◆ Grupo daño severo.

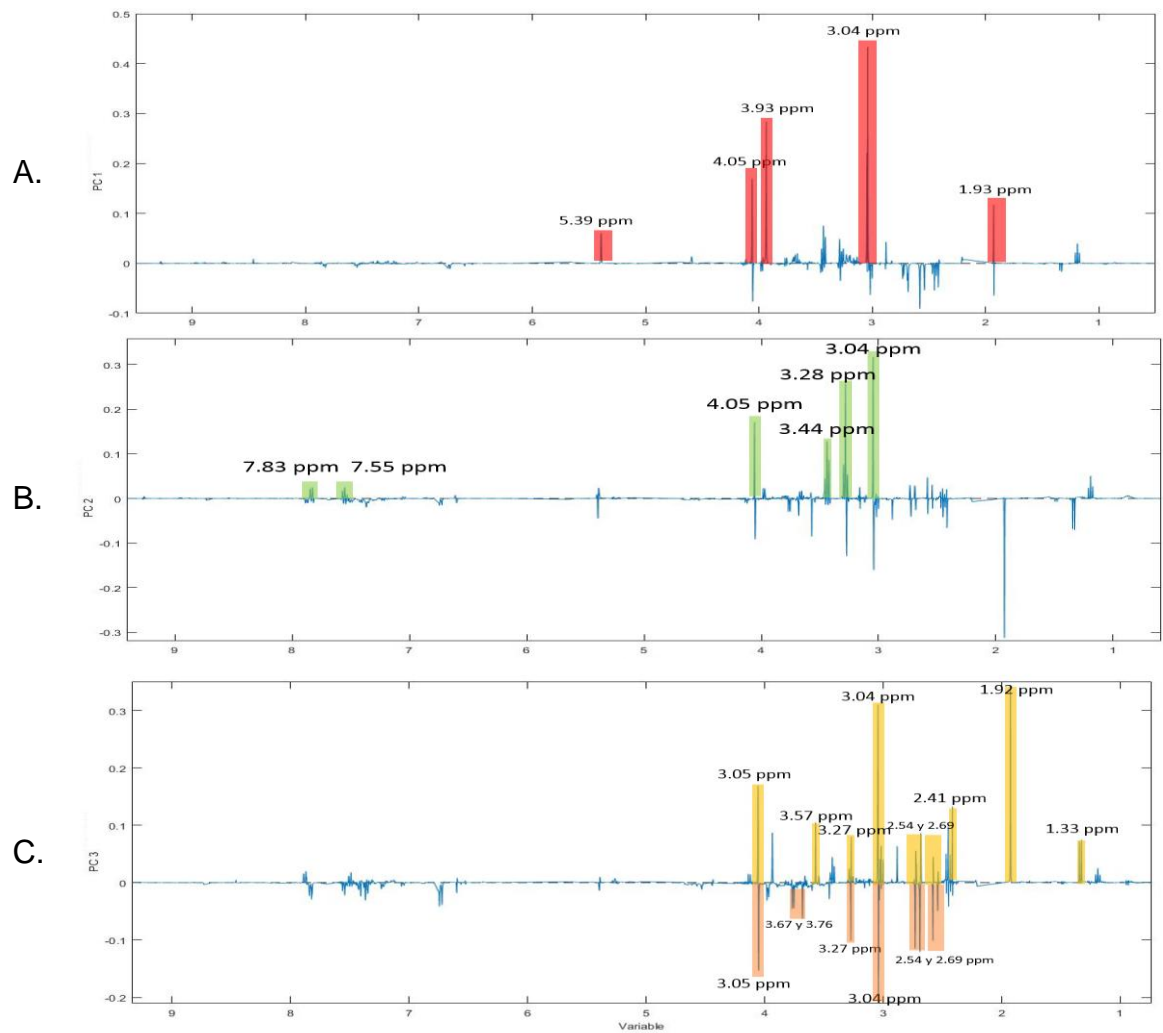


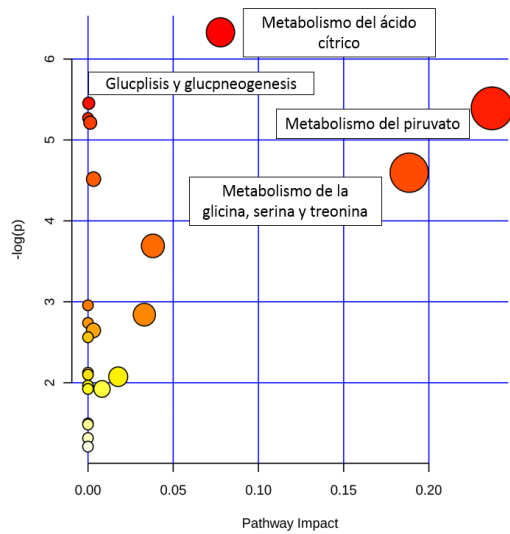
Figura 25. Gráfico de loadings del PCA. A. Gráficos de loadings de PC1. B. Gráficos de loadings de PC2. C. Gráfico de loadings de PC3. En color rojo se resaltaron las variables con mayor contribución para la separación del grupo de daño severo, las variables que contribuyeron para el grupo control se resaltaron en verde, mientras que las variables del grupo de daño leve y moderado se resaltaron en amarillo y naranja respectivamente.

TABLA 12
METABOLITOS QUE CONTRIBUYEN A LA SEPARACIÓN ENTRE LOS
GRUPOS EXPERIMENTALES

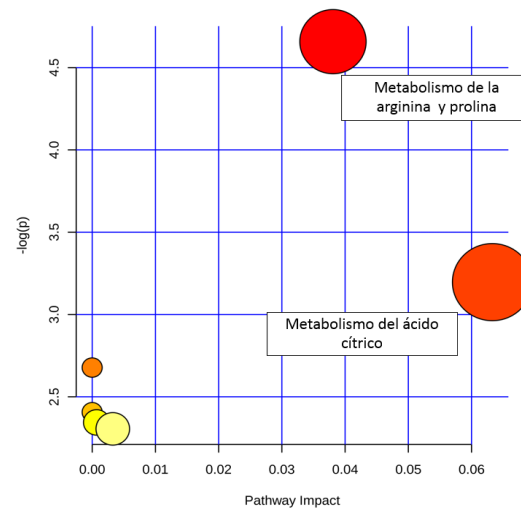
Daño Leve	Daño Moderado	Daño Severo
Acetato	Citrato	Creatinina
Citrato	Creatinina	Acetato
Creatina	PAG	Alantoína
Creatinina	TMAO	Creatina
Glicina		Taurina
Lactato		
Succinato		
TMAO		

El análisis de las de vías metabólicas alteradas realizado en el software Metaboanalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/>) mostró que las principales vías alteradas en el grupo de daño leve corresponden a las vías del metabolismo del ácido cítrico y piruvato; la vía de la glucólisis y gluconeogénesis y la vía metabólica de la glicina, serina y treonina. Con respecto al grupo de daño moderado, las vías alteradas corresponden a la vía del ácido cítrico y a la vía del metabolismo de la arginina y prolina. Mientras que para el grupo severo las vías más relevantes corresponden al metabolismo de la arginina y prolina en conjunto con la vía de la taurina e hipotaurina. Con los metabolitos identificados en cada una de las fases se procedió a realizar el análisis de acuerdo con los resultados que se observan en la Figura 26.

A



B



C

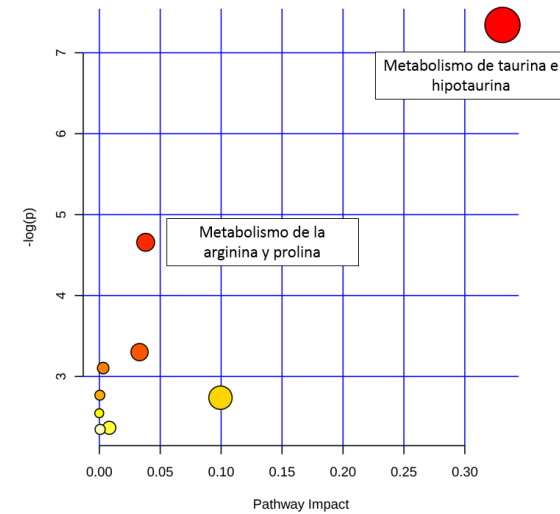


Figura 26. Vías metabólicas alteradas en el modelo experimental. Datos obtenidos a partir del análisis realizado en el software Metaboanalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/>) en base a los metabolitos responsables a la separación entre grupos.

3.5 Evaluación de la aplicabilidad del análisis de componentes principales construidos para el diagnóstico y categorización de la etapa de evolución de la ERC en el modelo experimental.

Después de ser pre-procesadas las seis muestras problemas se proyectaron al modelo de PCA del objetivo anterior, observando que estas se posicionaron correctamente en el gráfico de scores. En la Figura 27A se observa que la muestra problema del grupo control identificada como la estrella en color verde se colocó en valores positivos de la segunda componente, mientras que el resto de las muestras problema se colocaron en valores negativos. El gráfico de score en la Figura 27B demostró que la separación entre las muestras problemas correspondientes al grupo de daño leve y daño moderado (estrellas de color amarillo y naranja respectivamente) se logró de manera satisfactoria gracias a la segunda componente.

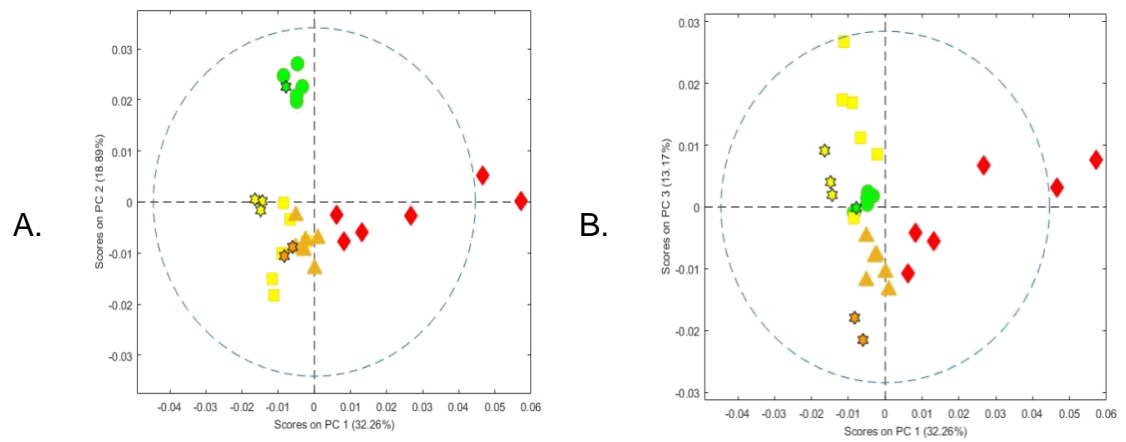


Figura 27. Gráfico de scores para prueba del modelo construido. **A.** Gráfica de scores PC1 vs PC2. **B.** Gráfica de scores PC1 vs PC3. ● Grupo control; ■ Grupo daño leve; ▲ Grupo daño moderado; ◆ Grupo daño severo; ★ Muestra problema de grupo control; ★ Muestra problema de grupo daño leve; ★ Muestra problema de grupo de daño moderado.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

En los últimos años el estudio del desarrollo de la ERC a partir de un episodio severo de enfermedad renal aguda (ERA) o de episodios repetidos de ERA ha ido ganando terreno en investigación (Belayev & Palevsky, 2014; Goldstein, Jaber, Faubel, Chawla, & Nephrology, 2013) . La generación de modelos experimentales que compartan características fisiopatológicas similares a la transición humana entre ERA hacia ERC resulta de gran interés para comprender la progresión de la enfermedad y establecer estrategias que permitan un diagnóstico más temprano.

Actualmente se han descrito diversos modelos que inducen el daño renal experimental como la nefrectomía 5/6 (Chow, Liu, & Chang, 2003), la obstrucción uretral unilateral (R. L. Chevalier, M. S. Forbes, & B. A. Thornhill, 2009), el proceso de isquemia-reperfusión (Le Clef et al., 2016), el empleo de sustancias nefrotóxicas como: adenina (Okada et al., 1999), doxorubicina (Peng, Chen, Lu, & Peng, 2012), ácido fólico (Huguenin et al., 1978) entre otros; algunos generan daño agudo y otros daño crónico. El presente trabajo se enfocó en evaluar el ácido fólico como inductor de daño renal. Altas dosis de ácido fólico ya han sido empleadas para generar falla renal aguda debido a la formación de cristales de ácido fólico que precipitan en los túbulos renales (Klingler, Evan, & Anderson,

1980) y producen necrosis tubular aguda seguida de una regeneración epitelial y cicatrización cortical (Fink, Henry, & Tange, 1987). Además, se ha demostrado que el ácido fólico tiene actividad nefrotóxica en distintos niveles de la nefrona ya que induce un estado pro-oxidante mediante el aumento de la peroxidación lipídica y la reducción de enzimas de protección antioxidante (Gupta, Puri, Sharma, & Puri, 2012). Este daño renal agudo produce un daño estructural residual el cual puede progresar a ERC si es sometido a episodios repetidos del agente nefrotóxico (Hsu, 2012).

Ormrod y Miller establecieron en un modelo de daño experimental quirúrgico tres niveles de daño renal de acuerdo a los valores de BUN: leve (40-80 mg/dL), moderado (100-200 mg/dL) y severo (>200 mg/dL) (Ormrod & Miller, 1980). Estos rangos fueron empleados en el presente estudio como referencia para categorizar el daño renal, pero empleando como inductor de daño el ácido fólico.

En un modelo de ERC inducido con adenina se observó que los animales con daño renal perdieron peso corporal y aumentaron el volumen de orina excretado (Al Za'abi et al., 2015), este mismo efecto fue observado en la inducción de daño renal con el ácido fólico en las tres fases evaluadas.

Los valores de creatinina y el BUN son empleados de manera convencional para la evaluación de la función renal; en base a estos parámetros se logró establecer tres fases de daño renal (leve, moderado y severo) en el presente estudio utilizando al ácido fólico, confirmado en forma ciega por análisis histopatológico con hallazgos característicos en cada una de las fases evaluadas (Figura 17).

Diversos estudios han descrito la utilidad de la cistatina C como marcador de función renal y a KIM-1 y NGAL como marcadores de daño renal (G. M. McMahon & Waikar, 2013; Rysz, Gluba-Brzozka, Franczyk, Jablonowski, & Cialkowska-Rysz, 2017; Shlipak & Day, 2013). En este estudio se establecieron los valores de estos tres marcadores proteicos en las distintas fases del daño renal inducido con ácido fólico.

La proteína KIM-1 (también conocida como TIM-1 y HAVCR-1) ha sido identificada como una proteína altamente expresada posterior a un evento de daño renal; en ERA desempeña un papel protector en la modulación de las células tubulares supervivientes. Sin embargo, su expresión sostenida promueve la generación de fibrosis y por lo tanto el desarrollo de la ERC (Bonventre, 2014). En un estudio de una sola fase de daño renal inducido con adenina se reportó un incremento de los niveles de KIM urinarios respecto a su grupo control (Nemmar et al., 2017). En modelos de daño renal inducido por isquemia-reperfusión se reportó un aumento en la expresión del gen *Lcn2* que codifica para KIM-1 respecto al grupo control en todos los tiempos analizados, sin embargo sus valores disminuyeron conforme progresaba el tiempo (Ko et al., 2010; Le Clef et al., 2016). En este estudio solo se evaluaron los niveles séricos de KIM-1, se encontró que conforme fue mayor el daño renal, mayores fueron los niveles de esta proteína resaltando que dichos niveles siempre fueron en incremento según el grado de daño. Diversos estudios han descrito que esta proteína deja de producirse debido a la atrofia del túbulo renal producida por la lesión por isquemia-reperfusión. En este estudio la producción de KIM-1 fue continua y aumentaba conforme el grado de daño renal avanzaba; esto puede ser explicado

debido a que en la histología el grado de daño tubular es menor con respecto a los otros estudios.

El NGAL (también conocida como lipocalina-2, siderocalina, o LCN2) es una proteína de la familia de las lipocalinas involucrada en el transporte transmembrana de moléculas hidrofóbicas (Saucedo-Yanez et al., 2018), su síntesis en las células del túbulo renal se ha correlacionado con la prevención del daño por la regulación en la expresión de enzimas antioxidantes (Mori et al., 2005). Los modelos que han evaluado una sola fase de daño renal inducido con adenina reportan un aumento en los niveles séricos de NGAL respecto a los controles (Al Za'abi et al., 2018; Ali et al., 2018; Ali et al., 2017). En otro estudio se evaluó un modelo trifásico de daño renal inducido por adenina y se reportó un aumento significativo de los valores séricos y urinarios de NGAL en presencia del inductor de daño. Sin embargo, en ausencia del inductor de daño los niveles de este marcador disminuyeron conforme al tiempo (Gil et al., 2016). En el presente estudio se observó que los niveles séricos de NGAL también aumentaron de manera significativa en presencia del ácido fólico. Sin embargo, conforme se avanzó el grado de daño los niveles de NGAL disminuyeron aún en presencia del inductor de daño. Llama la atención que en estudios con ausencia o presencia de inductores de daño renal el NGAL solo se incrementa en la fase inicial del daño renal ya que posteriormente sus niveles disminuyen conforme avanza el grado de daño. Esto también concuerda con estudios donde se evaluó la expresión del gen *Lcn2* que codifica para NGAL en daño por isquemia reperusión y la expresión de este gen disminuyó conforme transcurrió el tiempo post-isquemia (Ko et al., 2010; Le Clef et al., 2016).

La cistatina C es una proteína generada por todas las células nucleadas y ha sido propuesta como marcador de la función renal, ya que es filtrada libremente en glomérulo, y posteriormente reabsorbida y degradada por las células tubulares proximales; por lo que se ha propuesto que sustituya a la creatinina para los cálculos de la TFG (G. M. McMahon & Waikar, 2013). Estudios de daño renal inducidos con adenina de una sola fase mostraron un incremento de los niveles séricos de cistatina C respecto a su grupo control (Al Za'abi et al., 2015; Al Za'abi et al., 2018; Ali et al., 2015; Ali et al., 2018; Ali et al., 2017; Bokenkamp, Ciarimboli, & Dieterich, 2001; Thakur et al., 2018). En el presente estudio se encontró que los niveles séricos de cistatina C se incrementaron en las distintas fases estudiadas conforme aumentaba el grado de daño renal. Aunque histológicamente el daño inducido por ácido fólico no afectó la estructura del glomérulo, la cistatina C parece no ser filtrada de manera adecuada por lo que sus niveles séricos aumentaron en las fases de daño, manteniendo valores muy similares entre las fases moderada y severa.

Por otro lado, se ha reportado que una respuesta inflamatoria persistente contribuye en la perpetuación del daño renal. La elevación de las citocinas pro inflamatorias como IL-1B, IL-6, TNF- α es un hallazgo común en los casos de ERC (Furuichi, Kaneko, & Wada, 2009) y se emplean como marcadores de mortalidad en pacientes con enfermedad renal (Castillo-Rodriguez et al., 2017). También se ha reportado la elevación en la expresión de los genes para estas citocinas en diversos modelos de daño renal como el daño inducido por isquemia-reperfusión (Le Clef et al., 2016), adenina (Ali et al., 2018) y nefrectomía 5/6 (Agharazii et al.,

2015). En este estudio se observó la elevación de los valores séricos de las tres citocinas pro-inflamatorias IL-1 β , IL-6 y FNT- α conforme progresó el grado de daño renal inducido por ácido fólico, lo cual concuerda con los hallazgos histológicos de un incremento en el infiltrado inflamatorio conforme aumentó el grado de daño renal por este inductor de daño.

En este estudio se empleó el diseño experimental de metabolómica basada en RMN para investigar los metabolitos urinarios asociados a la progresión de la ERC. A partir de los datos de espectros de ^1H -RMN obtenidos del experimento NOESYPRESAT fueron analizadas 24 muestras de orina de rata. Como se puede ver en la Figura 16 los espectros muestran las señales características de los metabolitos que han sido identificados en la orina (Beckonert et al., 2007). Destacan por su intensidad las señales de acetato, creatinina, creatina, hipurato, taurina y alantoína; llama la atención que la señal de la urea es de menor intensidad con respecto a los espectros reportados en la literatura.

Para la identificación de los metabolitos por RMN se aplicó la estrategia sugerida por Breton para moléculas orgánicas (Breton & Reynolds, 2013) y recientemente descrita por Dona para su aplicación en el análisis metabolómico (Dona et al., 2016). Los metabolitos que están presentes en concentraciones relativamente altas o que tienen señales distintivas pueden ser identificados por inspección de espectros de ^1H -RMN basados en su desplazamiento químico, multiplicidad de señal y constantes de acoplamiento. La información que se obtuvo se comparó con bases de datos públicas, tales como la Human Metabolomic Database (<http://www.hmdb.ca/>), y Biological Magnetic Resonance

Bank (<http://www.bmrb.wisc.edu/>). Adicionalmente, el análisis comparativo de los espectros en dos dimensiones TOCSY, COSY y HSQC permitió confirmar la asignación de las señales al verificar correlaciones homonucleares y heteronucleares. Este análisis espectroscópico detallado permitió la identificación inequívoca de compuestos químicamente similares como es el caso de la creatina y creatinina, cuya asignación de señales únicamente a partir del espectro de protón habría sido ambigua debido a que los desplazamientos químicos son similares; una situación similar se presentó en el caso de la taurina y el TMAO en donde la intensidad de los multipletes de la taurina se ve distorsionada por el traslape del singulete del TMAO.

Para explicar las diferencias en el perfil metabólico urinario entre cada uno de los grupos experimentales se realizó un análisis de PCA de los espectros de ^1H -RMN. Los datos de ^1H -RMN se utilizaron para explorar la variabilidad de metabolitos entre las distintas muestras a través de métodos estadísticos multivariados basados en PCA. Para proporcionar resultados relevantes a través del procedimiento de análisis multivariado, los datos de ^1H -RMN fueron tratados previamente, como se describe de manera detallada en el capítulo 2 en la sección “2.2.9 Pretratamiento de datos”. El tratamiento de los datos se completó sin alteraciones evidentes, como se observó mediante la comparación visual de los espectros antes y después de la recopilación de datos, y no se detectaron cambios en el comportamiento de las puntuaciones cuando se compararon con los PCA preliminares, lo que indica que la información química de la muestra reflejada en el espectro de ^1H -RMN no se modificó después de la etapa de pretratamiento de datos. Bajo estas condiciones experimentales se construyó

exitosamente un modelo de PCA empleando 3 PCs con un RMSECV de 0.0002 y con una varianza explicada de 74.91%.

El análisis por PCA y la comparación de los espectros mostró que la progresión del daño renal está relacionada con metabolitos que forman parte de las vías energéticas, de los aminoácidos y osmolitos orgánicos. Mediante la evaluación de los gráficos de scores y de loadings en conjunto, fue posible identificar 11 metabolitos responsables de la formación de grupos. Estos metabolitos fueron: acetato, alantoína, citrato, creatina, creatinina, glicina, lactato, PAG, succinato, taurina y TMAO. Las variaciones en la intensidad de las señales de estos metabolitos permitieron explicar el comportamiento entre las agrupaciones; por ejemplo, la agrupación de las muestras del daño severo se debió a un aumento en la intensidad de las señales del acetato y creatina asociada con una disminución de la alantoína, creatinina y taurina.

Los metabolitos asociados a las vías del metabolismo energético de manera específica el acetato, citrato, lactato y succinato contribuyeron en la separación del grupo de daño leve, mientras que el citrato y acetato contribuyeron a la agrupación de los animales que presentaban daño moderado y severo respectivamente. Estudios metabolómicos previos de fibrosis renal, diabetes nefrogénica e isquemia-reperfusión reportaron la elevación del acetato y lactato en muestras de orina; asociando la presencia de estos metabolitos al estrés celular renal o al daño renal (Hauet et al., 2000; Hwang, Yang, Ryu, & Kwon, 2009; R. Pariyani et al., 2017; Ryu et al., 2019; Liangcai Zhao et al., 2016); en el presente estudio también se observó aumento en la intensidad de la señal del acetato y lactato. Por otra parte, en este estudio se observó que la intensidad de

la señal del citrato disminuye. La disminución del citrato urinario se describió en modelos de ácido aristolóquico, nefrotoxicidad por cisplatino e isquemia-reperfusión renal (Jouret et al., 2016; R. Pariyani et al., 2017; Y. Y. Zhao et al., 2015). Además, en el presente estudio los resultados concuerdan con estudios clínicos de pacientes con estadios avanzados de ERC, los cuales mostraron bajos niveles de citrato asociados a su reabsorción. Se sugiere que la reabsorción del citrato es debido a que el metabolito es empleado como un buffer orgánico que contrarresta la acidosis metabólica generada por el daño renal (Posada-Ayala et al., 2014).

Los aminoácidos son excretados en muy bajas cantidades por la orina en condiciones normales. En este estudio se observó un aumento de la intensidad de la señal de dos metabolitos relacionados con los aminoácidos: la creatina y glicina; éstos dos metabolitos contribuyeron para el agrupamiento del grupo de daño leve, mientras que la creatina de manera individual contribuyó a la separación del grupo de daño severo. En el modelo de daño con ácido fólico se encontró un aumento en la intensidad de la señal de la glicina, esto ya ha sido reportado en otro modelo de daño renal por cisplatino (R. Pariyani et al., 2017; Ryu et al., 2019), sugiriendo que es resultado del daño generado al túbulo proximal, ya que la presencia de glicina en la orina se ha descrito en modelos animales tratados con toxinas tubulares y en patologías que afectan el túbulo proximal (Zuppi et al., 1997). Además la glicina e histidina urinaria están relacionadas con la incidencia de ERC (Gearoid M. McMahon et al., 2017). Por otra parte, la intensidad de la señal de la creatina también se encontró elevada en este modelo de daño renal; niveles elevados de creatina en orina ya han sido

reportados en otros modelos de daño renal causados por adenina, cisplatino e isquemia-reperfusión (Jouret et al., 2016; R. Pariyani et al., 2017; Ryu et al., 2019; Z. H. Zhang et al., 2015); mientras en la parte clínica se reportó que pacientes con acidosis metabólica muestran un aumento en la excreción de creatina debido a un defecto en la reabsorción tubular (Davies, Iles, Stacey, & Chalmers, 1990).

Los osmolitos orgánicos, como la taurina y los derivados del metabolismo de las metilaminas (TMA, TMAO y DMA), son pequeños solutos empleados por las células para mantener el volumen intracelular y antioxidantes (Yancey, 2005). La disminución en los niveles de excreción de estos osmolitos orgánicos han sido reportados en estudios experimentales (Liangcai Zhao et al., 2016; L. Zhao et al., 2011) y en pacientes con ERC (Posada-Ayala et al., 2014). En el presente estudio se observó una disminución en los niveles de los osmolitos a medida que el daño renal progresaba.

El metabolito PAG está influenciado por la microbiota intestinal. Estudios previos de modelos de adenina y ácido aristolóquico han reportado un aumento en la excreción de PAG (Z. H. Zhang et al., 2015; Y. Y. Zhao et al., 2015). En este estudio la señal de PAG es una de las variables que contribuyen a la separación del grupo de daño moderado, ya que la intensidad de su señal disminuye en comparación al grupo control. Es posible que los cambios de PAG sean debido a la alteración en la microbiota intestinal como ya ha sido descrito en estudios de daño renal previos (Vaziri et al., 2013).

La alantoína es el producto de la oxidación del ácido úrico o del metabolismo de las purinas. Ha sido descrito como un potencial biomarcador de daño renal en modelos experimentales con ácido aristolóquico, OUU y cisplatino (R. Pariyani et

al., 2017; Z. H. Zhang, He, Qin, Zhao, & Tan, 2018; Y. Y. Zhao et al., 2015). La reducción en la excreción de la alantoína contribuyó a la agrupación del grupo de daño severo. De manera reciente, la alantoína y el fumarato han sido asociados con altas tasas de mortalidad en pacientes con ERC, y niveles de alantoína elevados en sangre son correlacionados con un aumento de estrés oxidativo (Suzuki & Abe, 2018).

Para complementar la comparación con otros modelos experimentales y plataformas analíticas se analizaron las vías metabólicas implicadas en los grupos experimentales de daño. Se observó que las vías del ácido cítrico y del metabolismo de la taurina e hipotaurina ya han sido reportados en modelos de ácido aristolóquico y cisplatino (Li et al., 2017; P. Zhang et al., 2016; Y. Y. Zhao et al., 2015). Por otra parte las vías del metabolismo de la glicina, serina y treonina, en conjunto con el metabolismo de la arginina y prolina han sido reportadas en modelos de adenina y cisplatino respectivamente (Li et al., 2017; Z. H. Zhang et al., 2015).

Hasta nuestro conocimiento este es el primer estudio en el cual se establecen tres fases de daño renal utilizando como inductor al ácido fólico, por lo que la administración de éste puede considerarse una alternativa para producir un modelo de enfermedad renal. El análisis metabolómico de la orina hizo posible la identificación de potenciales biomarcadores para el diagnóstico de las distintas fases de la enfermedad renal. Entre los posibles biomarcadores se encuentra: acetato, alantoína, citrato, creatina, creatinina, glicina, lactato, PAG, succinato, taurina y TMAO.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

- El ácido fólico fue capaz de inducir un daño renal crónico descrito por primera vez, y se caracterizaron tres fases de daño (leve, moderado y severo) a través de marcadores bioquímicos como BUN y creatinina.
- El grado de daño renal causado por ácido fólico en cada una de las fases se caracterizó por un incremento diferencial de los niveles de las citocinas, marcadores de lesión renal como KIM-1, cistatina C y alteraciones histopatológicas.
- El perfil metabólico en este modelo de daño renal con ácido fólico fue característico para cada una de las fases de daño. Los metabolitos que contribuyeron mayoritariamente a la separación de los grupos fueron: acetato, alantoína, citrato, creatina, creatinina, glicina, lactato, PAG, succinato, taurina y TMAO.
- El modelo quimiométrico fue capaz de describir a un individuo de acuerdo con la fase de daño inducido con ácido fólico.

CAPÍTULO 6

PERSPECTIVAS

- Analizar el comportamiento de los principales metabolitos que contribuyen a la agrupación de cada una de las fases de daño renal.
- Extrapolar el diseño del análisis multivariante a muestras clínicas para su posible aplicación como un método diagnóstico no invasivo en las fases temprana de la ERC.
- Aplicar el modelo de daño renal en la búsqueda de alternativas terapéuticas nefroprotectoras: como terapia celular y fármacos / extractos de plantas.

REFERENCIAS

- Abbiss, H., & Maker, G. L. (2019). Metabolomics Approaches for the Diagnosis and Understanding of Kidney Diseases. *9*(2). doi: 10.3390/metabo9020034
- Agharazii, M., St-Louis, R., Gautier-Bastien, A., Ung, R. V., Mokas, S., Lariviere, R., & Richard, D. E. (2015). Inflammatory cytokines and reactive oxygen species as mediators of chronic kidney disease-related vascular calcification. *Am J Hypertens*, *28*(6), 746-755. doi: 10.1093/ajh/hpu225
- Al Za'abi, M., Al Busaidi, M., Yasin, J., Schupp, N., Nemmar, A., & Ali, B. H. (2015). Development of a new model for the induction of chronic kidney disease via intraperitoneal adenine administration, and the effect of treatment with gum acacia thereon. *Am J Transl Res*, *7*(1), 28-38.
- Al Za'abi, M., Al Salam, S., Al Suleimani, Y., Manoj, P., Nemmar, A., & Ali, B. H. (2018). Gum Acacia Improves Renal Function and Ameliorates Systemic Inflammation, Oxidative and Nitrosative Stress in Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats with Adenine-Induced Chronic Kidney Disease. *Cell Physiol Biochem*, *45*(6), 2293-2304. doi: 10.1159/000488176
- Ali, B. H., Adham, S. A., Al Za'abi, M., Waly, M. I., Yasin, J., Nemmar, A., & Schupp, N. (2015). Ameliorative Effect of Chrysin on Adenine-Induced

- Chronic Kidney Disease in Rats. *PLoS One*, 10(4), e0125285. doi: 10.1371/journal.pone.0125285
- Ali, B. H., Al-Salam, S., Al Suleimani, Y., Al Kalbani, J., Al Bahlani, S., Ashique, M., . . . Schupp, N. (2018). Curcumin Ameliorates Kidney Function and Oxidative Stress in Experimental Chronic Kidney Disease. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 122(1), 65-73. doi: 10.1111/bcpt.12817
- Ali, B. H., Karaca, T., Al Suleimani, Y., Al Za'abi, M., Al Kalbani, J., Ashique, M., & Nemmar, A. (2017). The effect of swimming exercise on adenine-induced kidney disease in rats, and the influence of curcumin or lisinopril thereon. *PLoS One*, 12(4), e0176316. doi: 10.1371/journal.pone.0176316
- Aréstegui, A. H., & Rivera, J. E. R. Enfermedad Renal Crónica Terminal y Factores de Riesgo en Perú Análisis Costo-Beneficio de la Prevención.
- Ausiello, D. A., & Goldman, L. (2009). *Cecil Tratado de medicina interna*: Elsevier Health Sciences Spain.
- Becker, G. J., & Hewitson, T. D. (2013). Animal models of chronic kidney disease: useful but not perfect. *Nephrol Dial Transplant*, 28(10), 2432-2438. doi: 10.1093/ndt/gft071
- Beckonert, O., Keun, H. C., Ebbels, T. M., Bundy, J., Holmes, E., Lindon, J. C., & Nicholson, J. K. (2007). Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat Protoc*, 2(11), 2692-2703. doi: 10.1038/nprot.2007.376

- Belayev, L. Y., & Palevsky, P. M. (2014). The Link Between AKI and CKD. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 23(2), 149-154. doi: 10.1097/01.mnh.0000441051.36783.f3
- Bidin, M. Z., Shah, A. M., Stanslas, J., & Seong, C. L. T. (2019). Blood and urine biomarkers in chronic kidney disease: An update. *Clinica Chimica Acta*, 495, 239-250. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.04.069>
- Bokenkamp, A., Ciarimboli, G., & Dieterich, C. (2001). Cystatin C in a rat model of end-stage renal failure. *Ren Fail*, 23(3-4), 431-438.
- Bonventre, J. V. (2014). Kidney Injury Molecule-1: A Translational Journey. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, 125, 293-299.
- Brenner, B. M., Lawler, E. V., & Mackenzie, H. S. (1996). The hyperfiltration theory: A paradigm shift in nephrology. *Kidney Int*, 49(6), 1774-1777. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.1996.265>
- Breton, R. C., & Reynolds, W. F. (2013). Using NMR to identify and characterize natural products. *Nat Prod Rep*, 30(4), 501-524. doi: 10.1039/c2np20104f
- Bujak, R., Struck-Lewicka, W., Markuszewski, M. J., & Kaliszan, R. (2015). Metabolomics for laboratory diagnostics. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 113, 108-120.
- Bujak, R., Struck-Lewicka, W., Markuszewski, M. J., & Kaliszan, R. (2015). Metabolomics for laboratory diagnostics. *J Pharm Biomed Anal*, 113, 108-120. doi: 10.1016/j.jpba.2014.12.017
- Castillo-Rodriguez, E., Pizarro-Sanchez, S., Sanz, A. B., Ramos, A. M., Sanchez-Nino, M. D., Martin-Cleary, C., . . . Ortiz, A. (2017).

Inflammatory Cytokines as Uremic Toxins: "Ni Son Todos Los Que Estan, Ni Estan Todos Los Que Son". *Toxins (Basel)*, 9(4). doi: 10.3390/toxins9040114

Chevalier, R. L., Forbes, M. S., & Thornhill, B. A. (2009). Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. *Kidney Int*, 75(11), 1145-1152.

Chevalier, R. L., Forbes, M. S., & Thornhill, B. A. (2009). Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. *Kidney Int*, 75(11), 1145-1152. doi: 10.1038/ki.2009.86

Chow, K.-M., Liu, Z.-C., & Chang, T. M.-S. (2003). Animal Remnant Kidney Model of Chronic Renal Failure Revisited. *Hong Kong Journal of Nephrology*, 5(2), 57-64. doi: [https://doi.org/10.1016/S1561-5413\(09\)60109-5](https://doi.org/10.1016/S1561-5413(09)60109-5)

Christou-Savina, S., Beales, P. L., & Osborn, D. P. S. (2015). Evaluation of Zebrafish Kidney Function Using a Fluorescent Clearance Assay. (96), e52540. doi: doi:10.3791/52540

Davies, S. E., Iles, R. A., Stacey, T. E., & Chalmers, R. A. (1990). Creatine metabolism during metabolic perturbations in patients with organic acidurias. *Clin Chim Acta*, 194(2-3), 203-217.

Dettmer, K., & Hammock, B. D. (2004). Metabolomics--a new exciting field within the "omics" sciences. *Environmental Health Perspectives*, 112(7), A396-A397.

Dhondt, A., Vanholder, R., Van Biesen, W., & Lameire, N. (2000). The removal of uremic toxins. *Kidney Int*, 58, S47-S59.

- Dieterle, F., Ross, A., Schlotterbeck, G., & Senn, H. (2006). Probabilistic Quotient Normalization as Robust Method to Account for Dilution of Complex Biological Mixtures. Application in ^1H NMR Metabonomics. *Anal Chem*, 78(13), 4281-4290. doi: 10.1021/ac051632c
- Dona, A. C., Kyriakides, M., Scott, F., Shephard, E. A., Varshavi, D., Veselkov, K., & Everett, J. R. (2016). A guide to the identification of metabolites in NMR-based metabonomics/metabolomics experiments. *Comput Struct Biotechnol J*, 14, 135-153. doi: 10.1016/j.csbj.2016.02.005
- Eaton, D. C. (2004). *Fisiología renal de Vander*. MacGraw-Hill.
- Ebbels, T. M., Lindon, J. C., & Coen, M. (2011). Processing and modeling of nuclear magnetic resonance (NMR) metabolic profiles. *Metabolic Profiling: Methods and Protocols*, 365-388.
- Ellis, D. I., Dunn, W. B., Griffin, J. L., Allwood, J. W., & Goodacre, R. (2007). Metabolic fingerprinting as a diagnostic tool. *Pharmacogenomics*, 8(9), 1243-1266. doi: 10.2217/14622416.8.9.1243
- Emwas, A.-H. M., Salek, R. M., Griffin, J. L., & Merzaban, J. (2013). NMR-based metabolomics in human disease diagnosis: applications, limitations, and recommendations. *Metabolomics*, 9(5), 1048-1072. doi: 10.1007/s11306-013-0524-y
- Esbensen, K. H., Guyot, D., Westad, F., & Houmoller, L. P. (2002). *Multivariate Data Analysis: In Practice : an Introduction to Multivariate Data Analysis and Experimental Design*: CAMO.

- Euceda, L. R., Giskeødegård, G. F., & Bathen, T. F. (2015). Preprocessing of NMR metabolomics data. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, 75(3), 193-203.
- Fassi, A., Sangalli, F., Maffi, R., Colombi, F., Mohamed, E. I., Brenner, B. M., . . . Remuzzi, A. (1998). Progressive glomerular injury in the MWF rat is predicted by inborn nephron deficit. *J Am Soc Nephrol*, 9(8), 1399-1406.
- Fink, M., Henry, M., & Tange, J. D. (1987). Experimental folic acid nephropathy. *Pathology*, 19(2), 143-149.
- Fischer, M. J., Hsu, J. Y., Lora, C. M., Ricardo, A. C., Anderson, A. H., Bazzano, L., . . . Lash, J. P. (2016). CKD Progression and Mortality among Hispanics and Non-Hispanics. *J Am Soc Nephrol*, 27(11), 3488-3497. doi: 10.1681/asn.2015050570
- Fleck, C., Appenroth, D., Jonas, P., Koch, M., Kundt, G., Nizze, H., & Stein, G. (2006). Suitability of 5/6 nephrectomy (5/6NX) for the induction of interstitial renal fibrosis in rats – Influence of sex, strain, and surgical procedure. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 57(3), 195-205. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.etp.2005.09.005>
- Franco-Marina, F., Tirado-Gómez, L. L., Estrada, A. V., Moreno-López, J. A., Pacheco-Domínguez, R. L., Durán-Arenas, L., & López-Cervantes, M. (2011). Una estimación indirecta de las desigualdades actuales y futuras en la frecuencia de la enfermedad renal crónica terminal en México. *Salud Pública de México*, 53, 506-515.

- Fu, Y., Tang, C., Cai, J., Chen, G., Zhang, D., & Dong, Z. (2018). Rodent models of AKI-CKD transition. *Am J Physiol Renal Physiol*, 315(4), F1098-f1106. doi: 10.1152/ajprenal.00199.2018
- Furuichi, K., Kaneko, S., & Wada, T. (2009). Chemokine/chemokine receptor-mediated inflammation regulates pathologic changes from acute kidney injury to chronic kidney disease. *Clinical and Experimental Nephrology*, 13(1), 9-14. doi: 10.1007/s10157-008-0119-5
- Gates, S. C., & Sweeley, C. C. (1978). Quantitative metabolic profiling based on gas chromatography. *Clin Chem*, 24(10), 1663-1673.
- George, J. A., & Gounden, V. (2019). Chapter Four - Novel glomerular filtration markers. In G. S. Makowski (Ed.), *Advances in Clinical Chemistry* (Vol. 88, pp. 91-119): Elsevier.
- Gil, A., Brod, V., Awad, H., Heyman, S. N., Abassi, Z., & Frajewicki, V. (2016). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in a triphasic rat model of adenine-induced kidney injury. *Ren Fail*, 38(9), 1448-1454. doi: 10.1080/0886022x.2016.1194164
- Global, Burden, of, Disease, Study, & 2013. (2014). Age-Sex Specific All-Cause and Cause-Specific Mortality 1990-2013. Retrieved 24-03, 2016, from <http://vizhub.healthdata.org/le/#>
- Goldstein, S. L., Jaber, B. L., Faubel, S., Chawla, L. S., & Nephrology, A. K. I. A. G. o. t. A. S. o. (2013). AKI transition of care: a potential opportunity to detect and prevent CKD. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 8(3), 476-483.

- Gomase, V. S., Changbhale, S. S., Patil, S. A., & Kale, K. V. (2008).
Metabolomics. *Curr Drug Metab*, 9(1), 89-98.
- Gowda, G. N., Zhang, S., Gu, H., Asiago, V., Shanaiah, N., & Raftery, D. (2008).
Metabolomics-based methods for early disease diagnostics. *Expert
review of molecular diagnostics*, 8(5), 617-633.
- Grossman, R. C. (2010). Experimental models of renal disease and the
cardiovascular system. *The open cardiovascular medicine journal*, 4(1).
- Group, K. D. I. G. O. C.-M. W. (2009). KDIGO clinical practice guideline for the
diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney
Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney international.
Supplement*(113), S1.
- Guillemin, N., Horvatic, A., Kules, J., Galan, A., Mrljak, V., & Bhide, M. (2016).
Omics approaches to probe markers of disease resistance in animal
sciences. *Molecular BioSystems*. doi: 10.1039/C6MB00220J
- Gupta, A., Puri, V., Sharma, R., & Puri, S. (2012). Folic acid induces acute renal
failure (ARF) by enhancing renal prooxidant state. *Exp Toxicol Pathol*,
64(3), 225-232. doi: 10.1016/j.etp.2010.08.010
- Hauet, T., Baumert, H., Gibelin, H., Hameury, F., Goujon, J. M., Carretier, M., &
Eugene, M. (2000). Noninvasive Monitoring of Citrate, Acetate, Lactate,
and Renal Medullary Osmolyte Excretion in Urine as Biomarkers of
Exposure to Ischemic Reperfusion Injury. *Cryobiology*, 41(4), 280-291.
doi: <https://doi.org/10.1006/cryo.2000.2291>

- Held, J. R. (1983). APPROPRIATE ANIMAL MODELS. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 406(1), 13-19. doi: 10.1111/j.1749-6632.1983.tb53481.x
- Henry, J. B. (2007). *Laboratorio* (MARBÁN Ed. 20 ed.).
- Hewitson, T. D., Ono, T., & Becker, G. J. (2009). Small animal models of kidney disease: a review. *Methods Mol Biol*, 466, 41-57. doi: 10.1007/978-1-59745-352-3_4
- Holmes, E., Wilson, I. D., & Nicholson, J. K. (2008). Metabolic phenotyping in health and disease. *Cell*, 134, 714-717.
- Horning, E. C., & Horning, M. G. (1971). Metabolic profiles: gas-phase methods for analysis of metabolites. *Clin Chem*, 17(8), 802-809.
- Hsu, C.-y. (2012). Yes, AKI truly leads to CKD. *Journal of the American Society of Nephrology*, 23(6), 967-969.
- Huda, M. N., Alam, K. S., & Harun-Ur-Rashid. (2012). Prevalence of Chronic Kidney Disease and Its Association with Risk Factors in Disadvantageous Population. *International Journal of Nephrology*, 2012, 7. doi: 10.1155/2012/267329
- Huguenin, M. E., Birbaumer, A., Brunner, F. P., Thorhorst, J., Schmidt, U., Dubach, U. C., & Thiel, G. (1978). An Evaluation of the Role of Tubular Obstruction in Folic Acid-Induced Acute Renal Failure in the Rat. *Nephron*, 22(1-3), 41-54.
- Hwang, G.-S., Yang, J.-Y., Ryu, D. H., & Kwon, T.-H. (2009). Metabolic profiling of kidney and urine in rats with lithium-induced nephrogenic diabetes insipidus by 1H-NMR-based metabonomics. *American Journal of*

Physiology-Renal Physiology, 298(2), F461-F470. doi:

10.1152/ajprenal.00389.2009

- INEGI. (2013, 24 de abril de 2015). Principales causas de mortalidad por residencia habitual, grupos de edad y sexo del fallecido. Retrieved Marzo 2016, 2016, from <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/PC.asp?t=14&c=11817>
- Jha, V., Garcia-Garcia, G., Iseki, K., Li, Z., Naicker, S., Plattner, B., . . . Yang, C.-W. (2013). Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *The Lancet*, 382(9888), 260-272.
- Ji, J., Zhang, L., Zhang, H., Sun, C., Sun, J., Jiang, H., . . . Sun, X. (2016). ¹H NMR-based urine metabolomics for the evaluation of kidney injury in Wistar rats by 3-MCPD. *Toxicology research*, 5(2), 689-696.
- Jia, T., Olauson, H., Lindberg, K., Amin, R., Edvardsson, K., Lindholm, B., . . . Larsson, T. E. (2013). A novel model of adenine-induced tubulointerstitial nephropathy in mice. *BMC Nephrol*, 14, 116. doi: 10.1186/1471-2369-14-116
- Jouret, F., Leenders, J., Poma, L., Defraigne, J. O., Krzesinski, J. M., & de Tullio, P. (2016). Nuclear Magnetic Resonance Metabolomic Profiling of Mouse Kidney, Urine and Serum Following Renal Ischemia/Reperfusion Injury. *PLoS One*, 11(9), e0163021. doi: 10.1371/journal.pone.0163021
- Jun-Sheng, T., Lei, Z., Xiao-Li, S., Huan, L., & Xue-Mei, Q. (2018). ¹H NMR-based metabolomics approach to investigating the renal protective effects of Genipin in diabetic rats. *Chin J Nat Med*, 16(4), 261-270.

- Klingler, E. L., Jr., Evan, A. P., & Anderson, R. E. (1980). Folic acid-induced renal injury and repair. Correlation of structural and functional abnormalities. *Arch Pathol Lab Med*, *104*(2), 87-93.
- Ko, G. J., Grigoryev, D. N., Linfert, D., Jang, H. R., Watkins, T., Cheadle, C., . . . Rabb, H. (2010). Transcriptional analysis of kidneys during repair from AKI reveals possible roles for NGAL and KIM-1 as biomarkers of AKI-to-CKD transition. *Am J Physiol Renal Physiol*, *298*(6), F1472-1483. doi: 10.1152/ajprenal.00619.2009
- Kruk, J., Doskocz, M., Jodłowska, E., Zacharzewska, A., Łakomic, J., Czaja, K., & Kujawski, J. (2017). NMR Techniques in Metabolomic Studies: A Quick Overview on Examples of Utilization. *Applied Magnetic Resonance*, *48*(1), 1-21. doi: 10.1007/s00723-016-0846-9
- Lamb, E. J., Levey, A. S., & Stevens, P. E. (2013). The Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) Guideline Update for Chronic Kidney Disease: Evolution not Revolution. *Clinical Chemistry*, *59*(3), 462-465. doi: 10.1373/clinchem.2012.184259
- Le Clef, N., Verhulst, A., D'Haese, P. C., & Vervaet, B. A. (2016). Unilateral Renal Ischemia-Reperfusion as a Robust Model for Acute to Chronic Kidney Injury in Mice. *PLoS One*, *11*(3), e0152153. doi: 10.1371/journal.pone.0152153
- Le Guennec, A., Tayyari, F., & Edison, A. S. (2017). Alternatives to Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy Presat and Carr-Purcell-Meiboom-Gill Presat for NMR-Based Metabolomics. *89*(17), 8582-8588. doi: 10.1021/acs.analchem.7b02354

- Lenz, E., Bright, J., Knight, R., Wilson, I., & Major, H. (2004). A metabonomic investigation of the biochemical effects of mercuric chloride in the rat using ¹H NMR and HPLC-TOF/MS: time dependant changes in the urinary profile of endogenous metabolites as a result of nephrotoxicity. *Analyst*, *129*(6), 535-541.
- Li, C. Y., Song, H. T., Wang, X. X., Wan, Y. Y., Ding, X. S., Liu, S. J., . . . Ju, W. Z. (2017). Urinary metabolomics reveals the therapeutic effect of HuangQi Injections in cisplatin-induced nephrotoxic rats. *Sci Rep*, *7*(1), 3619. doi: 10.1038/s41598-017-03249-z
- McClellan, W., Aronoff, S. L., Bolton, W. K., Hood, S., Lorber, D. L., Tang, K. L., . . . Leiserowitz, M. (2004). The prevalence of anemia in patients with chronic kidney disease. *Current medical research and opinion*, *20*(9), 1501-1510.
- Mckay, R. T. (2011). How the 1D-NOESY suppresses solvent signal in metabonomics NMR spectroscopy: An examination of the pulse sequence components and evolution. *Concepts in Magnetic Resonance Part A*, *38A*(5), 197-220. doi: 10.1002/cmr.a.20223
- McMahon, G. M., Hwang, S.-J., Clish, C. B., Tin, A., Yang, Q., Larson, M. G., . . . Fox, C. S. (2017). Urinary metabolites along with common and rare genetic variations are associated with incident chronic kidney disease. *Kidney Int*, *91*(6), 1426-1435. doi: 10.1016/j.kint.2017.01.007

- McMahon, G. M., & Waikar, S. S. (2013). Biomarkers in nephrology: Core Curriculum 2013. *Am J Kidney Dis*, 62(1), 165-178. doi: 10.1053/j.ajkd.2012.12.022
- McPherson, R. A., Pincus, M. R., & Henry, J. B. (2007). *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*: Saunders Elsevier.
- Méndez-Durán, A., Méndez-Bueno, J. F., Tapia-Yáñez, T., Montes, A. M., & Aguilar-Sánchez, L. (2010). Epidemiología de la insuficiencia renal crónica en México. *Diálisis y Trasplante*, 31(1), 7-11.
- Méndez-Durán, A., Pérez-Aguilar, G., Ayala-Ayala, F., Ruiz-Rosas, R. A., de Jesús González-Izquierdo, J., & Dávila-Torres, J. (2014). Panorama epidemiológico de la insuficiencia renal crónica en el segundo nivel de atención del Instituto Mexicano del Seguro Social. *Diálisis y Trasplante*, 35(4), 148-156.
- Misra, B. B., & van der Hooft, J. J. (2016). Updates in metabolomics tools and resources: 2014-2015. *Electrophoresis*, 37(1), 86-110. doi: 10.1002/elps.201500417
- Mori, K., Lee, H. T., Rapoport, D., Drexler, I. R., Foster, K., Yang, J., . . . Barasch, J. (2005). Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest*, 115(3), 610-621. doi: 10.1172/jci23056
- Morrison, R. T., & Boyd, R. N. (1998). *Química orgánica*: Pearson Educación.
- Nakamura, T., Oite, T., Shimizu, F., Matsuyama, M., Kazama, T., Koda, Y., & Arakawa, M. (1986). Sclerotic lesions in the glomeruli of Buffalo/Mna rats. *Nephron*, 43(1), 50-55.

- National, Kidney, & Foundation. (2002). K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification and Stratification. *Am J Kidney Dis*, 39(1), S1-S266.
- Nemmar, A., Karaca, T., Beegam, S., Yuvaraju, P., Yasin, J., & Ali, B. H. (2017). Lung Oxidative Stress, DNA Damage, Apoptosis, and Fibrosis in Adenine-Induced Chronic Kidney Disease in Mice. *Frontiers in Physiology*, 8, 896. doi: 10.3389/fphys.2017.00896
- Nicholson, J. K., & Lindon, J. C. (2008). Systems biology: Metabonomics. *Nature*, 455(7216), 1054-1056.
- Nicholson, J. K., Lindon, J. C., & Holmes, E. (1999). 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*, 29(11), 1181-1189. doi: 10.1080/004982599238047
- Ofstad, J., & Iversen, B. M. (2005). Glomerular and tubular damage in normotensive and hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol*, 288(4), F665-672. doi: 10.1152/ajprenal.00226.2004
- Okada, H., Kaneko, Y., Yawata, T., Uyama, H., Ozono, S., Motomiya, Y., & Hirao, Y. (1999). Reversibility of adenine-induced renal failure in rats. *Clinical and Experimental Nephrology*, 3(2), 82-88. doi: 10.1007/s101570050015
- Ormrod, D., & Miller, T. (1980). Experimental uremia. Description of a model producing varying degrees of stable uremia. *Nephron*, 26(5), 249-254. doi: 10.1159/000181994

- Pariyani, R., Ismail, I. S., Azam, A., Khatib, A., Abas, F., Shaari, K., & Hamza, H. (2017). Urinary metabolic profiling of cisplatin nephrotoxicity and nephroprotective effects of *Orthosiphon stamineus* leaves elucidated by ¹H NMR spectroscopy. *J Pharm Biomed Anal*, *135*, 20-30.
- Pariyani, R., Ismail, I. S., Azam, A., Khatib, A., Abas, F., Shaari, K., & Hamza, H. (2017). Urinary metabolic profiling of cisplatin nephrotoxicity and nephroprotective effects of *Orthosiphon stamineus* leaves elucidated by (1)H NMR spectroscopy. *J Pharm Biomed Anal*, *135*, 20-30. doi: 10.1016/j.jpba.2016.12.010
- Peng, C. C., Chen, K. C., Lu, H. Y., & Peng, R. Y. (2012). Treadmill exercise improved adriamycin-induced nephropathy. *J Biol Regul Homeost Agents*, *26*(1), 15-28.
- Perales-Quintana, M. M., Cordero-Pérez, P., Waksman-Minsky, N. H., Pérez-Rodríguez, E., Lucio-Gutiérrez, J. R., & Saucedo-Yáñez, A. L. (2017). Metabolomics in chronic kidney disease: From experimental model to human disease. *Investigacion Clinica (Venezuela)*, *58*(2), 197-222.
- Pereira Wde, F., Brito-Melo, G. E., de Almeida, C. A., Moreira, L. L., Cordeiro, C. W., Carvalho, T. G., . . . Simoes, E. S. A. C. (2015). The experimental model of nephrotic syndrome induced by Doxorubicin in rodents: an update. *Inflamm Res*, *64*(5), 287-301. doi: 10.1007/s00011-015-0813-1
- Posada-Ayala, M., Zubiri, I., Martin-Lorenzo, M., Sanz-Maroto, A., Molero, D., Gonzalez-Calero, L., . . . Alvarez-Llamas, G. (2014). Identification of a urine metabolomic signature in patients with advanced-stage chronic

kidney disease. *Kidney Int*, 85(1), 103-111. doi:

<https://doi.org/10.1038/ki.2013.328>

Potts, B. C., Deese, A. J., Stevens, G. J., Reily, M. D., Robertson, D. G., & Theiss, J. (2001). NMR of biofluids and pattern recognition: assessing the impact of NMR parameters on the principal component analysis of urine from rat and mouse. *J Pharm Biomed Anal*, 26(3), 463-476.

Radhakrishnan, J., Remuzzi, G., Saran, R., Williams, D. E., Rios-Burrows, N., Powe, N., . . . Jimuro, S. (2014). Taming the chronic kidney disease epidemic: a global view of surveillance efforts. *Kidney Int*, 86(2), 246-250. doi: 10.1038/ki.2014.190

Reckelhoff, J. F., Zhang, H., & Granger, J. P. (1997). Decline in renal hemodynamic function in aging SHR: role of androgens. *Hypertension*, 30(3 Pt 2), 677-681.

Robinson, A. B., & Robinson, N. E. (2011). Origins of metabolic profiling. *Methods Mol Biol*, 708, 1-23. doi: 10.1007/978-1-61737-985-7_1

Rysz, J., Gluba-Brzozka, A., Franczyk, B., Jablonowski, Z., & Cialkowska-Rysz, A. (2017). Novel Biomarkers in the Diagnosis of Chronic Kidney Disease and the Prediction of Its Outcome. *Int J Mol Sci*, 18(8). doi: 10.3390/ijms18081702

Ryu, S. H., Lee, J. D., Kim, J. W., Kim, S., Kim, S., & Kim, K.-B. (2019). ¹H NMR toxicometabolomics following cisplatin-induced nephrotoxicity in male rats. *The Journal of Toxicological Sciences*, 44(1), 57-71. doi: 10.2131/jts.44.57

- Saucedo-Yanez, A. L., Perales-Quintana, M. M., Paniagua-Vega, D., Sanchez-Martinez, C., Cordero-Perez, P., & Minsky, N. W. (2018). Chronic Kidney Disease and the Search for New Biomarkers for Early Diagnosis. *Curr Med Chem*. doi: 10.2174/0929867325666180307110908
- Savorani, F., Tomasi, G., & Engelsen, S. B. (2010). icoshift: A versatile tool for the rapid alignment of 1D NMR spectra. *Journal of Magnetic Resonance*, 202(2), 190-202.
- Schmidt, U., Torhorst, J., Huguenin, M., Dubach, U. C., Bieder, I., & Funk, B. (1973). Acute Renal Failure after Folate: NaKATPase in Isolated Rat Renal Tubule. *European Journal of Clinical Investigation*, 3(3), 169-178. doi: doi:10.1111/j.1365-2362.1973.tb00346.x
- Shimamura, T., & Morrison, A. B. (1975). A progressive glomerulosclerosis occurring in partial five-sixths nephrectomized rats. *Am J Pathol*, 79(1), 95-106.
- Shlipak, M. G., & Day, E. C. (2013). Biomarkers for incident CKD: a new framework for interpreting the literature. *Nat Rev Nephrol*, 9(8), 478-483. doi: 10.1038/nrneph.2013.108
- Showiheen, S. A. A., Sun, A. R., Wu, X., Crawford, R., Xiao, Y., Wellard, R. M., & Prasad, I. (2019). Application of Metabolomics to Osteoarthritis: from Basic Science to the Clinical Approach. *Current Rheumatology Reports*, 21(6), 26. doi: 10.1007/s11926-019-0827-8
- Silverstein, R. M., Webster, F. X., Kiemle, D. J., & Bryce, D. L. (2014). *Spectrometric Identification of Organic Compounds*: Wiley.

- Silverthorn, D. U., & Silverthorn, A. C. (2008). *Fisiología Humana. Un enfoque integrado 4a edición*: Médica Panamericana.
- Smolinska, A., Blanchet, L., Buydens, L. M., & Wijmenga, S. S. (2012). NMR and pattern recognition methods in metabolomics: from data acquisition to biomarker discovery: a review. *Analytica chimica acta*, *750*, 82-97.
- Stanley, E., Bailey, N., Bollard, M., Haselden, J., Waterfield, C., Holmes, E., & Nicholson, J. (2005). Sexual dimorphism in urinary metabolite profiles of Han Wistar rats revealed by nuclear-magnetic-resonance-based metabonomics. *Analytical biochemistry*, *343*(2), 195-202.
- Suzuki, T., & Abe, T. (2018). Crossroads of metabolism and CKD. *Kidney Int*, *94*(2), 242-243. doi: 10.1016/j.kint.2018.03.023
- Tamura, M., Aizawa, R., Hori, M., & Ozaki, H. (2009). Progressive renal dysfunction and macrophage infiltration in interstitial fibrosis in an adenine-induced tubulointerstitial nephritis mouse model. *Histochem Cell Biol*, *131*(4), 483-490. doi: 10.1007/s00418-009-0557-5
- Teng, Q. (2012). *Structural Biology: Practical NMR Applications*: Springer US.
- Thakur, R., Sharma, A., Lingaraju, M. C., Begum, J., Kumar, D., Mathesh, K., . . . Kumar, D. (2018). Ameliorative effect of ursolic acid on renal fibrosis in adenine-induced chronic kidney disease in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *101*, 972-980. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.143>
- Tomlinson, J. A. P., & Wheeler, D. C. (2017). The role of trimethylamine N-oxide as a mediator of cardiovascular complications in chronic kidney disease. *Kidney Int*, *92*(4), 809-815. doi: 10.1016/j.kint.2017.03.053

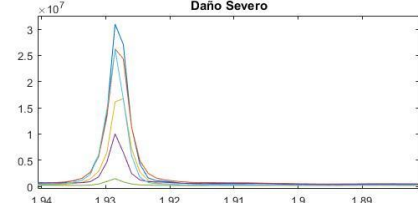
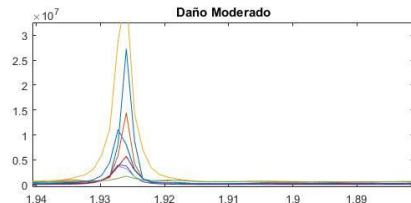
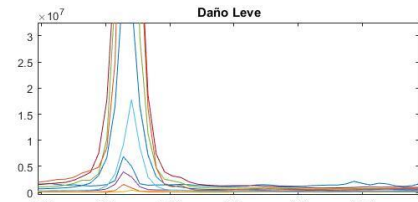
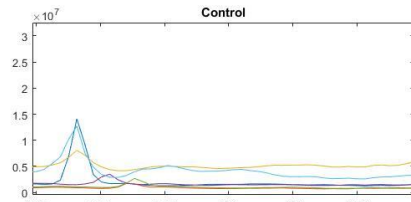
- Vaziri, N. D., Wong, J., Pahl, M., Piceno, Y. M., Yuan, J., DeSantis, T. Z., . . . Andersen, G. L. (2013). Chronic kidney disease alters intestinal microbial flora. *Kidney Int*, 83(2), 308-315.
- Vinayavekhin, N., Homan, E. A., & Saghatelian, A. (2010). Exploring disease through metabolomics. *ACS Chem Biol*, 5(1), 91-103. doi: 10.1021/cb900271r
- Wold, S., Esbensen, K., & Geladi, P. (1987). Principal component analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2(1-3), 37-52.
- Yancey, P. H. (2005). Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *Journal of Experimental Biology*, 208(15), 2819.
- Yang, H. C., Zuo, Y., & Fogo, A. B. (2010). Models of chronic kidney disease. *Drug Discov Today Dis Models*, 7. doi: 10.1016/j.ddmod.2010.08.002
- Zhang, P., Chen, J., Wang, Y., Huang, Y., Tian, Y., Zhang, Z., & Xu, F. (2016). Discovery of Potential Biomarkers with Dose- and Time-Dependence in Cisplatin-Induced Nephrotoxicity Using Metabolomics Integrated with a Principal Component-Based Area Calculation Strategy. *Chem Res Toxicol*, 29(5), 776-783. doi: 10.1021/acs.chemrestox.5b00519
- Zhang, Z. H., He, J. Q., Qin, W. W., Zhao, Y. Y., & Tan, N. H. (2018). Biomarkers of obstructive nephropathy using a metabolomics approach in rat. *Chem Biol Interact*, 296, 229-239. doi: 10.1016/j.cbi.2018.10.004
- Zhang, Z. H., Wei, F., Vaziri, N. D., Cheng, X. L., Bai, X., Lin, R. C., & Zhao, Y. Y. (2015). Metabolomics insights into chronic kidney disease and

- modulatory effect of rhubarb against tubulointerstitial fibrosis. *Sci Rep*, 5, 14472. doi: 10.1038/srep14472
- Zhao, L., Dong, M., Liao, S., Du, Y., Zhou, Q., Zheng, H., . . . Gao, H. (2016). Identification of key metabolic changes in renal interstitial fibrosis rats using metabonomics and pharmacology. *Scientific Reports*, 6, 27194. doi: 10.1038/srep27194
- Zhao, L., Gao, H., Lian, F., Liu, X., Zhao, Y., & Lin, D. (2011). (1)H-NMR-based metabonomic analysis of metabolic profiling in diabetic nephropathy rats induced by streptozotocin. *Am J Physiol Renal Physiol*, 300(4), F947-956. doi: 10.1152/ajprenal.00551.2010
- Zhao, Y. Y., Tang, D. D., Chen, H., Mao, J. R., Bai, X., Cheng, X. H., & Xiao, X. Y. (2015). Urinary metabolomics and biomarkers of aristolochic acid nephrotoxicity by UPLC-QTOF/HDMS. *Bioanalysis*, 7(6), 685-700. doi: 10.4155/bio.14.309
- Zuppi, C., Messana, I., Forni, F., Rossi, C., Pennacchietti, L., Ferrari, F., & Giardina, B. (1997). 1H NMR spectra of normal urines: reference ranges of the major metabolites. *Clin Chim Acta*, 265(1), 85-97.

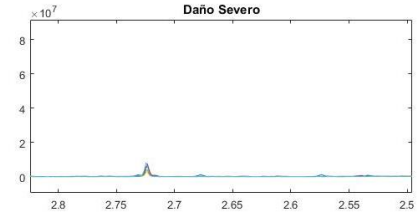
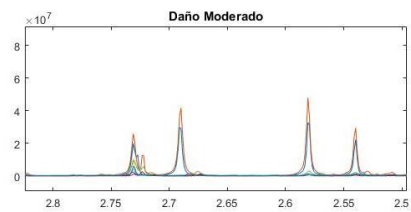
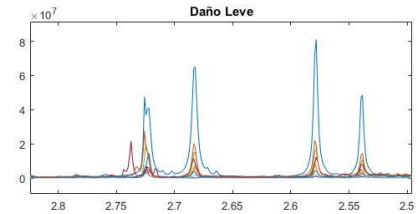
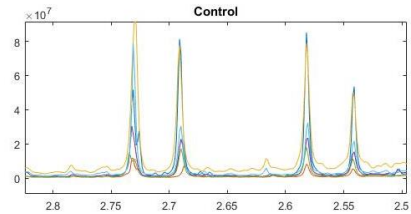
APENDICE A
**Sub-gráficos de los distintos metabolitos identificados para la
comparación entre grupos experimentales.**

Metabolitos energéticos

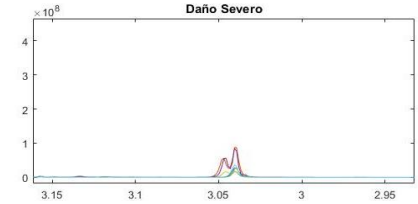
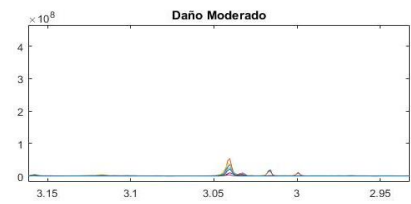
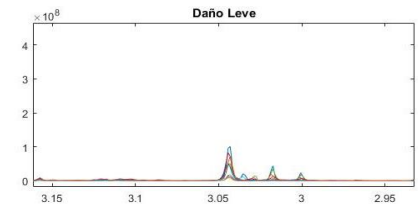
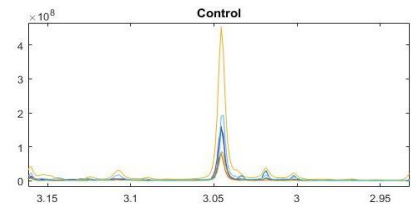
Acetato
1.92 (s)



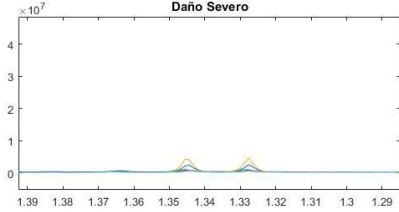
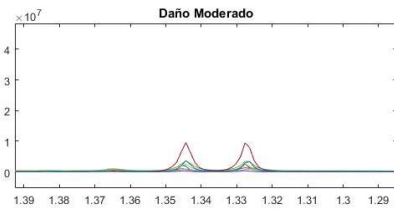
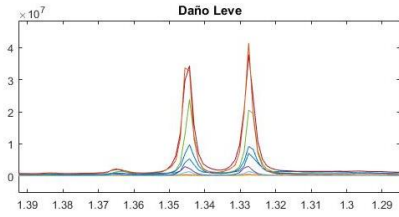
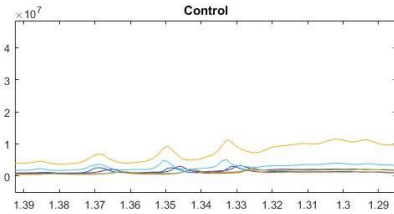
Citrato
2.54 (d) ; 2.69 (d)



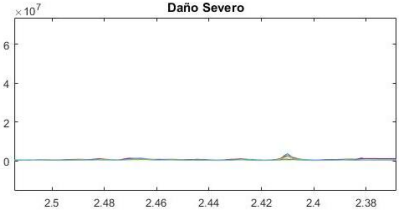
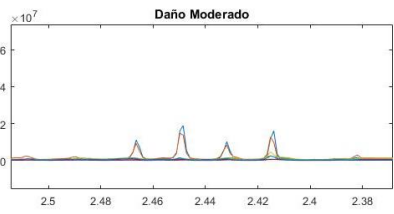
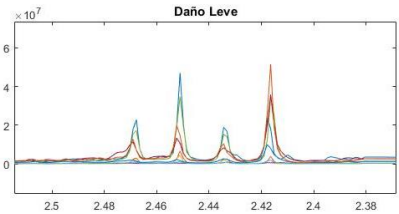
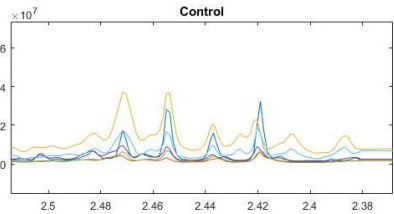
Creatinina
3.03 (s)



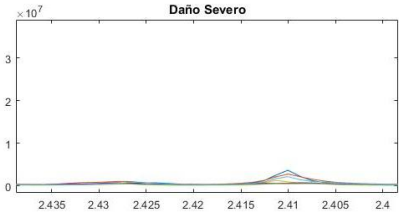
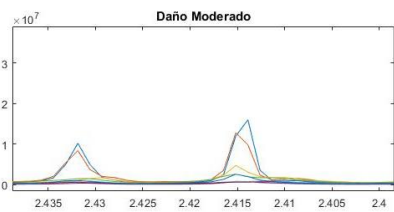
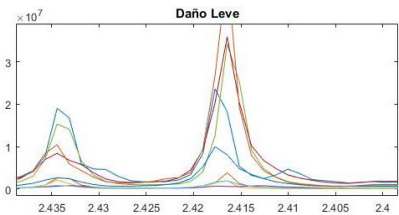
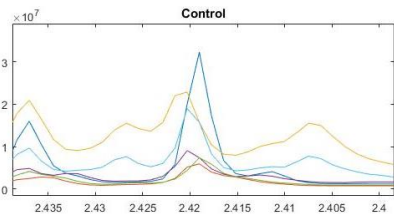
Lactato
1.33 (d)



Oxoglutarato
2.44 (t)

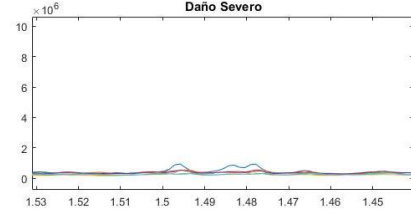
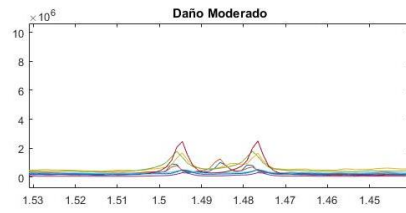
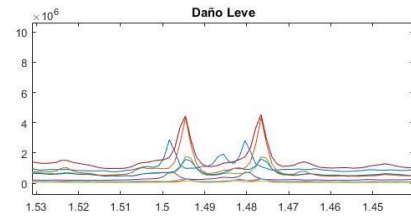
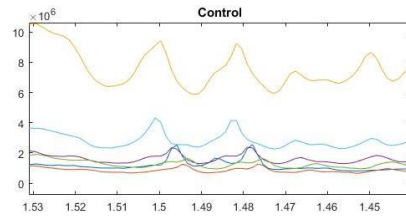


Succinato
2.41 (s)

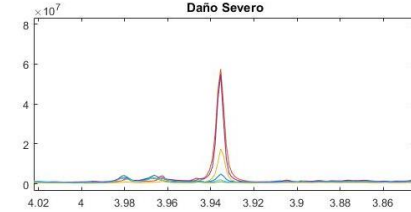
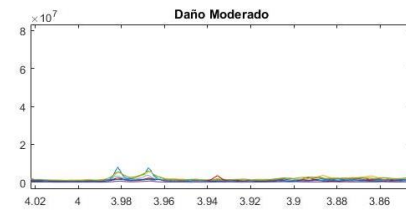
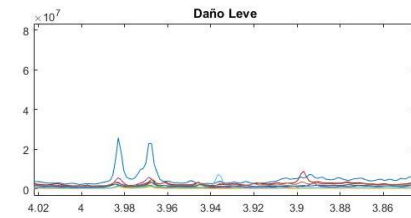
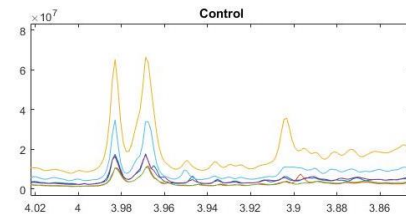


Metabolismo de aminoácidos

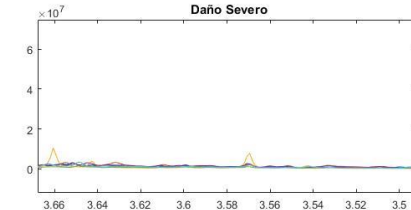
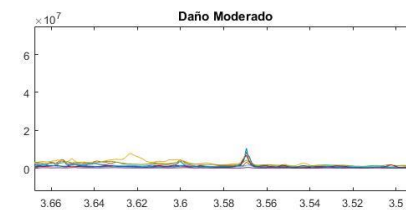
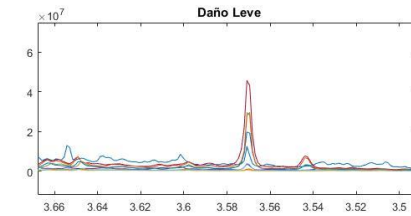
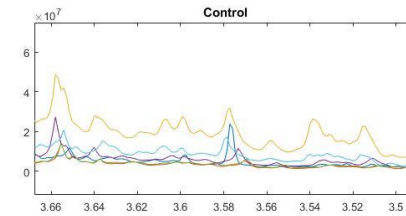
Alanina
1.48 (d)



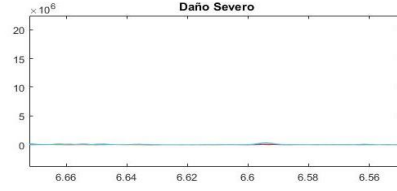
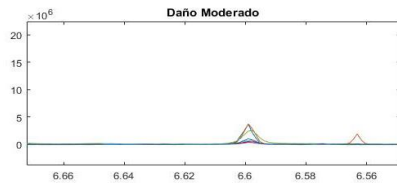
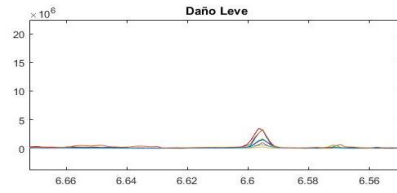
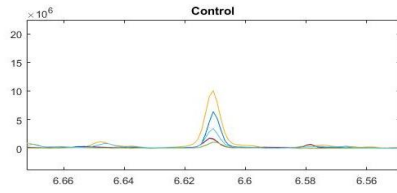
Creatina
3.93 (s)



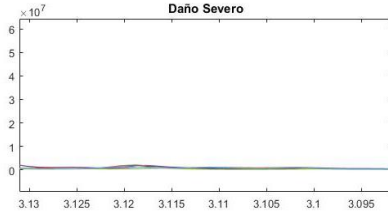
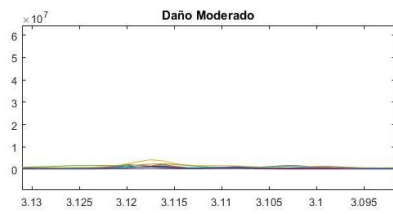
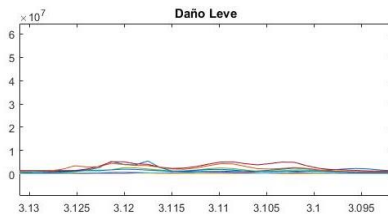
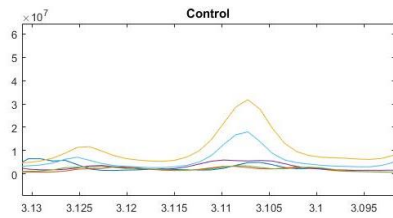
Glicina
3.56 (s)



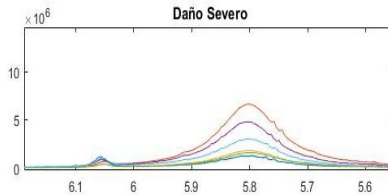
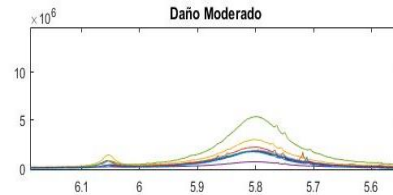
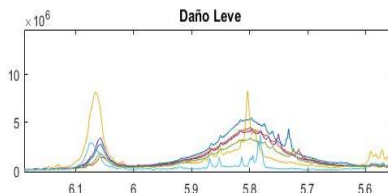
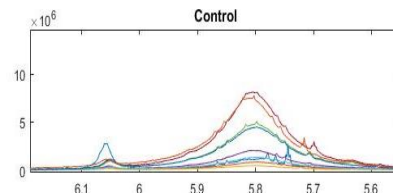
Quinurenato
6.61 (s)



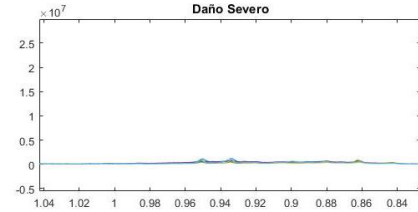
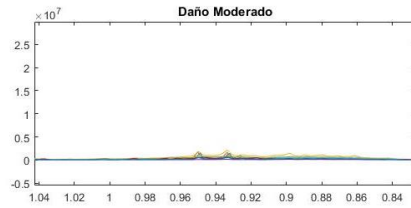
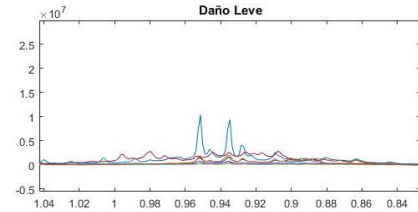
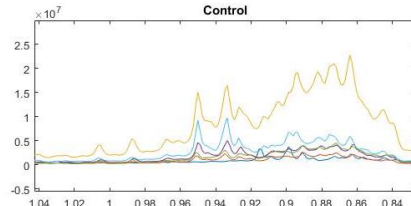
Malonato
3.11 (s)



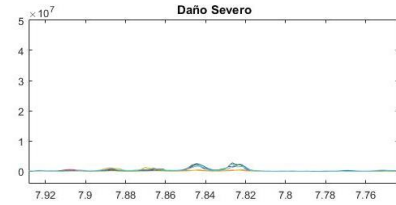
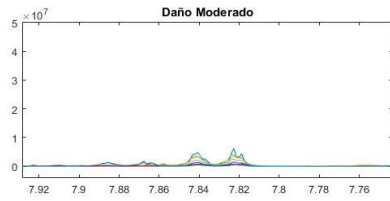
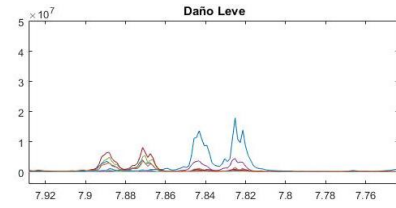
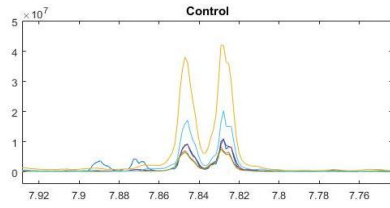
Urea
5.80 (s)



Valina
0.99 (dd)

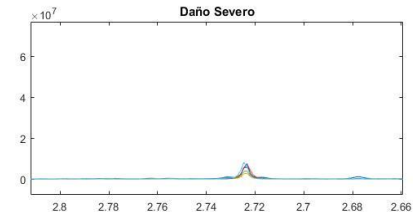
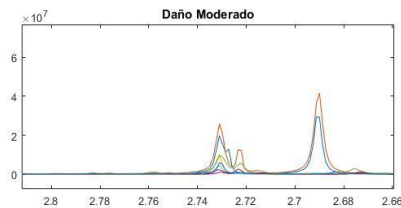
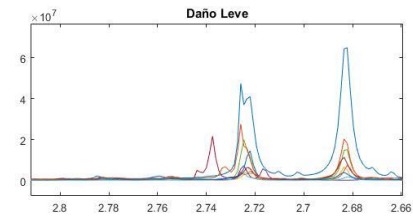
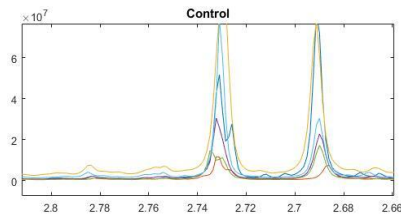


Hipurato
7.83 (d)

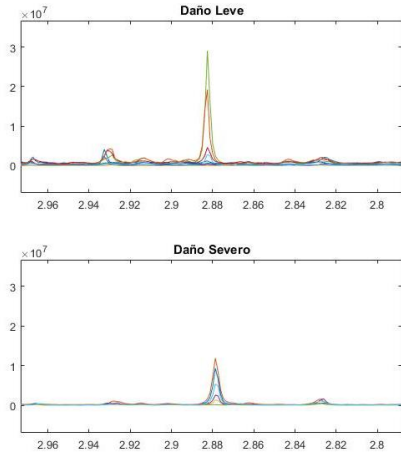
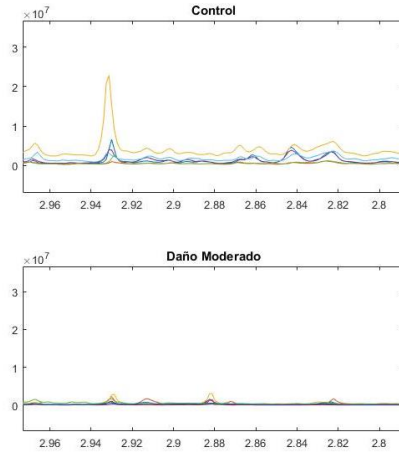


Osmolitos orgánicos

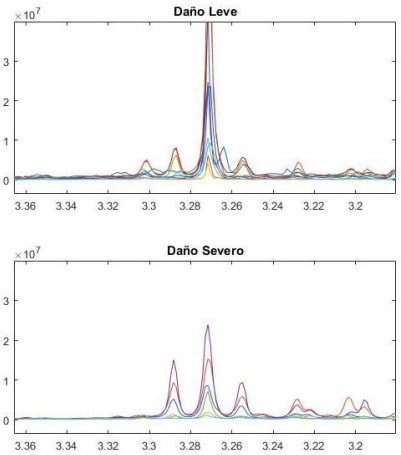
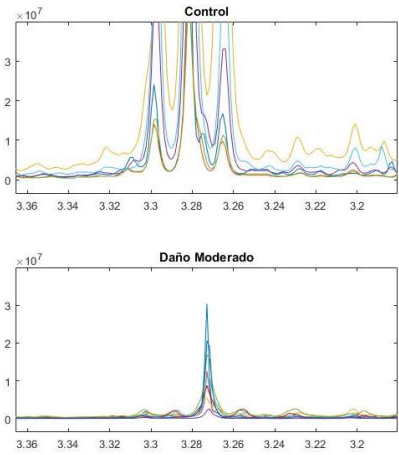
Dimetilamina
2.72 (s)



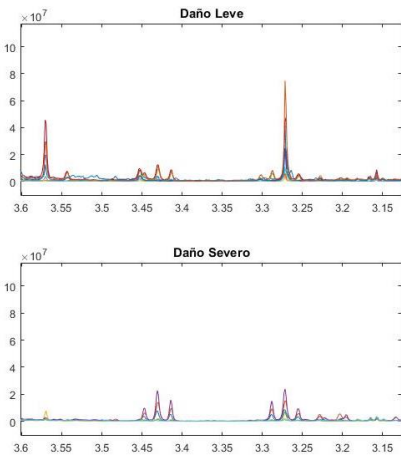
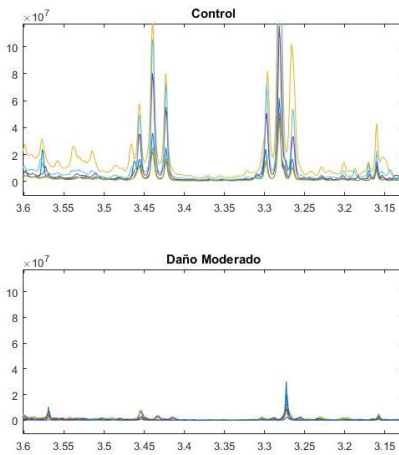
Trimetilamina
2.89 (s)



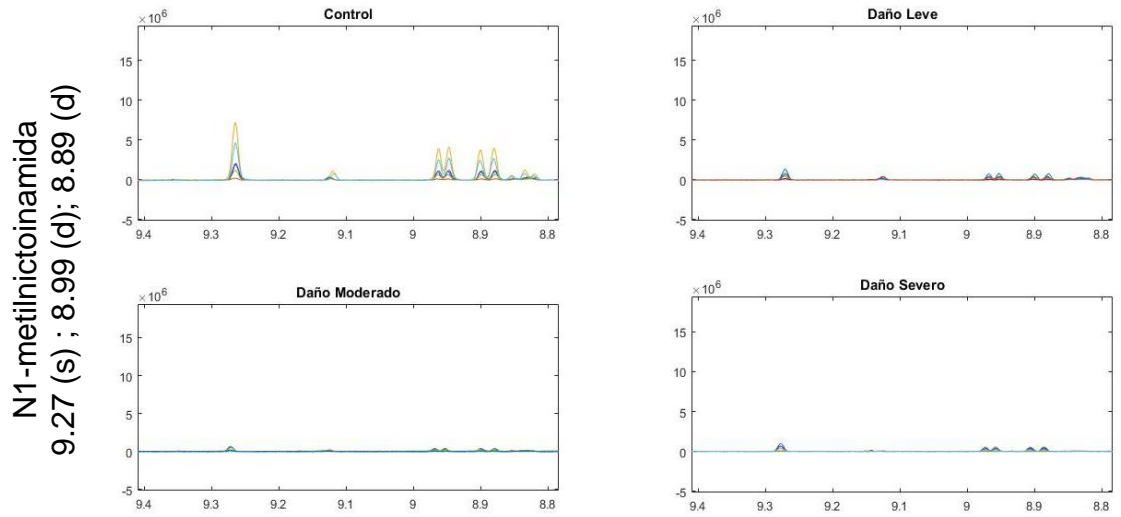
N óxido de trimetilamina
3.27 (s)



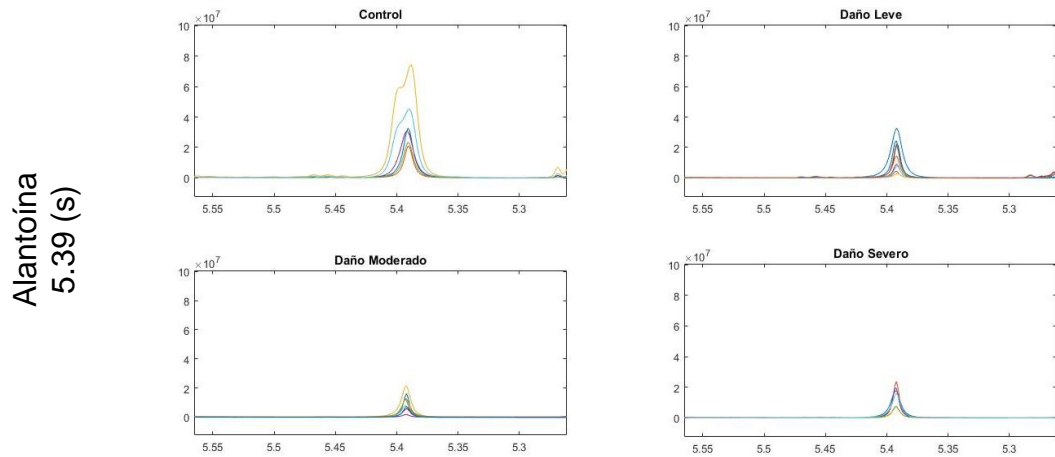
Taurina
3.27 (t) ; 3.43 (t)



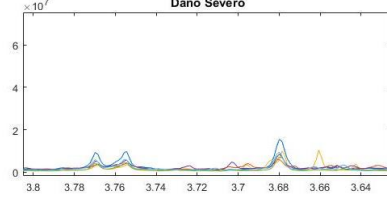
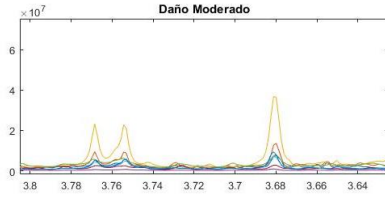
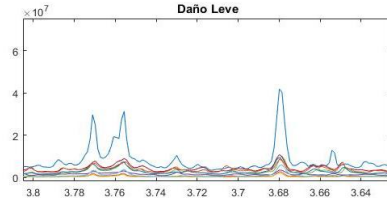
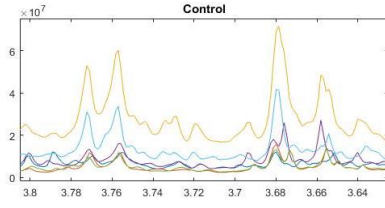
Metabolismo de cofactores y vitaminas



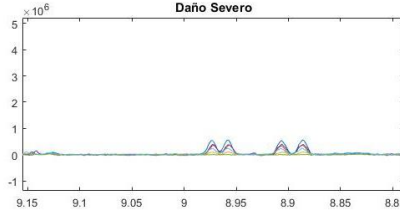
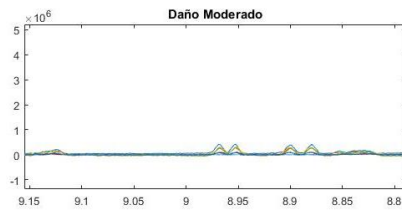
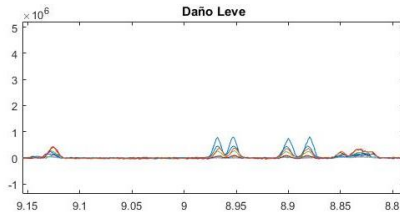
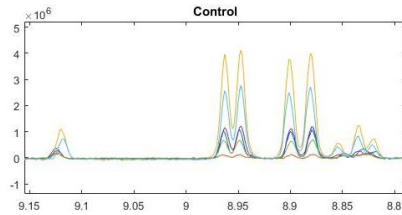
Otros



Fenilacetilglicina
3.67 (s) ; 3.76 (d)



Trigonelina
9.11 (s)



APENDICE B
Comandos empleados en MATLAB para el pretratamiento de datos

Comando	Descripción
<code>[rmn]=jcampreadr</code>	Importar archivos jcamp generados en Topspin.
<code>rmnr=rmn(:,[9680:16191 16767:23699]); axr= axisscale2(:,[9680:16191 16767:23699]);</code>	Eliminar regiones no útiles, en este caso principio, final y señal del agua. Solo permanece área de trabajo.
<code>axrb=coadd(axr); rmnr=coadd(rmnr);</code>	Reducir variables (binning de la matriz ya recortada)
<code>alignedLVE= icoshift ('max', rmnr.data(7:15,:), [1 411, 492 570, 634 689, 1097 1128, 1143 1254, 1477 1562, 1573 1636, 1678 1748, 1840 1869, 1914 1968, 1969 2002, 2003 2057, 2058 2085, 2086 2136, 2137 2209, 2252 2318, 2379 2405, 2433 2492, 2521 2560, 2666 2687, 2688 2723, 2757 2790, 2791 2901, 2925 3014, 3054 3112, 3113 3256, 3264 3337, 3354 3400, 3401 3452, 3477 3556, 4430 4486, 4487 4695, 4781 4835, 4867 5020, 5021 5082, 5083 5132, 5133 5243, 5244 5350, 5395 5445, 5446 5480, 5597 5663, 5664 5723, 6048 6117, 6184 6337, 6523 6583], 'b', [0 1 1]);</code>	Realizar icoshift de cada uno de los grupos de manera individual y realizar la alineación por los segmentos señalados. IMPORTANTE: Tener icoshift en la ventana para poderse llevar a cabo
<code>alignedMOD= icoshift ('max', rmnr.data(16:23,:), [1 411, 492 570, 634 689, 1097 1128, 1143 1254, 1477 1562, 1573 1636, 1678 1748, 1840 1869, 1914 1968, 1969 2002, 2003 2057, 2058 2085, 2086 2136, 2137 2209, 2252 2318, 2379 2405, 2433 2492, 2521 2560, 2666 2687, 2688 2723, 2757 2790, 2791 2901, 2925 3014, 3054 3112, 3113 3256, 3264 3337, 3354 3400, 3401 3452, 3477 3556, 4430 4486, 4487 4695, 4781 4835, 4867 5020, 5021 5082, 5083 5132, 5133 5243, 5244 5350, 5395 5445, 5446 5480, 5597 5663, 5664 5723, 6048 6117, 6184 6337, 6523 6583], 'b', [0 1 1]);</code>	
<code>alignedSEV= icoshift ('max', rmnr.data(24:29,:), [1 411, 492 570, 634 689, 1097 1128, 1143 1254, 1477 1562, 1573 1636, 1678 1748, 1840 1869, 1914 1968, 1969 2002, 2003 2057, 2058 2085, 2086 2136, 2137 2209, 2252 2318, 2379 2405, 2433 2492, 2521 2560, 2666 2687, 2688 2723, 2757 2790, 2791 2901, 2925 3014, 3054 3112, 3113 3256, 3264 3337, 3354 3400, 3401 3452, 3477 3556, 4430 4486, 4487 4695, 4781 4835, 4867 5020, 5021 5082, 5083 5132, 5133 5243, 5244 5350, 5395 5445, 5446 5480, 5597 5663, 5664 5723, 6048 6117, 6184 6337, 6523 6583], 'b', [0 1 1]);</code>	

```
alignedCTRL= icoshift ('max', rmnrb.data(1:6,:), [1 411, 492
570, 634 689, 1097 1128, 1143 1254, 1477 1562, 1573
1636, 1678 1748, 1840 1869, 1914 1968, 1969 2002, 2003
2057, 2058 2085, 2086 2136, 2137 2209, 2252 2318, 2379
2405, 2433 2492, 2521 2560, 2666 2687, 2688 2723, 2757
2790, 2791 2901, 2925 3014, 3054 3112, 3113 3256, 3264
3337, 3354 3400, 3401 3452, 3477 3556, 4430 4486, 4487
4695, 4781 4835, 4867 5020, 5021 5082, 5083 5132, 5133
5243, 5244 5350, 5395 5445, 5446 5480, 5597 5663, 5664
5723, 6048 6117, 6184 6337, 6523 6583 ], 'b', [0 1 1]);
```

```
rmnrba= [AlignedCTRL; alignedLVE; alignedMOD;
alignedSEV]
```

Generar una sola matriz de datos; con los datos recortados, combinados y alineados.

```
rmnrbafofic=rmnrba(:,[1:1122 1466:2921 2999:3724
4083:5150 5183:5609 5658:6092 6139:6723]);
axrbafofic=axrb(:,[1:1122 1466:2921 2999:3724 4083:5150
5183:5609 5658:6092 6139:6723]);
```

Eliminar secciones del ácido fólico.

```
plot(axrbafofic, rmnrbafofic');
f(1)=subplot(1,2,1), plot(axrb,rmnrba'),
f(2)=subplot(1,2,2),plot(axrbafofic, rmnrbafofic');
linkaxes(f,'xy')
```

Realizar gráficos de la nueva información.

```
ax1=subplot(2,2,1), plot(axrbafofic,rmnctrl'), title('Control');
ax2=subplot(2,2,2), plot(axrbafofic,rmnleve'), title('Leve');
ax3=subplot(2,2,3), plot(axrbafofic,rmnmod'),
title('Moderado');ax4=subplot(2,2,4),
plot(axrbafofic,rmnsevero'),
title('Severo');linkaxes([ax1,ax2,ax3,ax4],'xy')
```

Generar cuatro gráficos y comparar metabolitos.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Marlene Marisol Perales Quintana

Candidato para el Grado de

Doctorado en Ciencias con orientación en Química Biomédica

Tesis: ANÁLISIS DEL PERFIL METABOLÓMICO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES URINARIOS EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE LAS DIVERSAS FASES DE LA ENFERMEDAD RENAL

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Biografía:

Datos Personales:

Nacida en Cd. Victoria, Tamaulipas el día 25 de Junio de 1986, hija de Ma. De Jesús Quintana Hernández y Olegario Perales González.

Educación:

Egresada de la Facultad de Medicina, UANL; grado obtenido de Químico Clínico Biólogo en 2009 con mención honorífica, tercer lugar en la generación.

Egresada de la Facultad de Ciencias Químicas, UANL; grado obtenido de Maestría en Administración en 2011.

