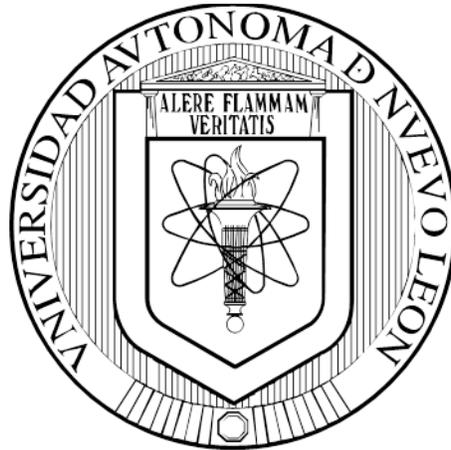


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA Y ANTIOXIDANTE  
DE LOS ANÁLOGOS DE AMINOÁCIDOS ESENCIALES CONTRA EL DAÑO  
POR ISQUEMIA/REPERFUSIÓN RENAL EN RATAS WISTAR”**

**POR**

**CONCEPCIÓN SÁNCHEZ MARTÍNEZ**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO  
DE DOCTOR EN MEDICINA**

**OCTUBRE, 2019**

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA Y ANTIOXIDANTE DE  
LOS ANÁLOGOS DE AMINOÁCIDOS ESENCIALES CONTRA EL DAÑO POR  
ISQUEMIA/REPERFUSIÓN RENAL EN RATAS WISTAR”**

**Aprobación de la tesis:**

---

**Dr. C. Paula Cordero Pérez  
Director de la tesis**

---

**Dr. C. Liliana Torres González  
Co-director**

---

**Dr. PhD. Linda Elsa Muñoz Espinosa  
Comisión de Tesis**

---

**Dr. med. Homero Zapata Chavira  
Comisión de Tesis**

---

**Dr. med. Homero Nañez Terreros  
Comisión de Tesis**

---

**Dr. med. Felipe Arturo Morales  
Subdirector de Estudios de Posgrado**

## DEDICATORIA

A Dios, por ser el inspirador y el que me dio fuerza para continuar en este proceso de obtener uno de los anhelos más deseados.

A mi Mami, Elena Martínez, que durante este proceso se nos adelanto en el camino que todos seguiremos; tu amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, me dio la fortaleza para llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy. Ha sido el orgullo y el privilegio de ser tu hija. Te quiero mucho. Hasta el cielo va esta dedicatoria.

A mi familia, que somos como una sola persona: mi hijo Adrian, mi hermana Elena, mi cuñado Juan Francisco, mis sobrinos Paco y Fernada, por estar siempre presentes, acompañandome y por el apoyo moral, que me brindaron a lo largo de esta etapa.

A mi directora de tesis, la Dra. Paula Cordero, por su paciencia, su gran dedicación y ser una excelente guía en este duro pero satisfactorio camino. Gracias por compartir sus conocimientos. La Virgen la cuide y la proteja siempre.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco infinitamente a cada una de las personas que me han ayudado y dado herramientas y fortaleza para poder sacar esta investigación adelante, en especial a la Dra. Liliana Torres, mi co-directora de tesis, cuya habilidad y conocimientos me dejaron una gran enseñanza.

Agradezco a la comisión doctoral: Dra. Linda Muñoz, Dr. Homero Zapata y Dr. Homero Nañez, gracias por su apoyo incondicional.

Agradezco a la Dra Diana Moreno por su gran apoyo en la investigación y redacción del artículo para publicación.

Agradezco con profundo cariño a todo el personal de Unidad de Hígado, todos brindando apoyo en las buenas y en las malas. No hay palabras para tanto y tanto. Gracias totales.

Agradezco a mis grandes compañeros y amigos del Servicio de Nefrología, por haberme orientado en todos los momentos que necesité sus consejos. Así mismo, deseo expresar mi reconocimiento a mi Alma Mater, de la que estoy orgullosa de trabajar y poder colaborar, poner un granito de arena a todo lo que realiza día a día: Facultad de Medicina / Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	1
Capítulo I	
I. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 La Enfermedad Renal Crónica. Definición y clasificación.....	3
1.1.1 Etiología.....	4
1.1.2 Incidencia y prevalencia.....	5
1.1.3 Tratamiento actual.....	6
1.2 Análogos de $\alpha$ -cetoácidos de aminoácidos esenciales.....	7
1.2.1 Transaminación reversibles cetoanálogos.....	8
1.2.2 Composición de los suplementos de $\alpha$ -cetoácidos/AAE.....	9
1.3 Mecanismos de implementación de daño renal. Progresión de la ERC.	10
1.3.1 Modelos experimentales de lesión renal aguda y crónica.....	11
1.4 Mecanismo de daño por isquemia/reperfusión (I/R).....	16
1.4.1 Modelos en animales.....	18
1.5 Uso de biomarcadores para evaluar enfermedad renal.....	18
Capítulo II	
2. HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN.....	20
2.1 Hipótesis.....	20
2.2 Justificación.....	20
Capítulo III	
3. OBJETIVOS.....	21
3.1 Objetivo general.....	21
3.2 Objetivos específicos.....	21
Capítulo IV	
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	23

	Página
4.1 Animales de experimentación.....	23
4.2 Diseño experimental.....	23
4.3 Inducción de isquemia/reperfusión.....	25
4.4 Muestras de sangre y tejido.....	26
4.4.1 Determinación de citocinas proinflamatorias.....	26
4.4.2 Marcadores bioquímicos.....	27
4.4.3 Marcadores de daño renal.....	27
4.4.4 Marcadores de estrés oxidativo.....	27
4.5 Análisis estadístico.....	28
Capítulo V	
5. RESULTADOS.....	29
5.1 Evaluación de toxicidad.....	29
5.2 Efecto de los AAE en la inducción de daño por I/R.....	30
5.2.1 Análisis bioquímico.....	30
5.2.2 Marcadores de daño renal.....	31
5.2.3 Citocinas proinflamatorias.....	32
5.2.4 Marcadores de estrés oxidativo.....	33
5.2.5 Análisis histológico.....	34
Capítulo VI	
6. DISCUSIÓN.....	36
Capítulo VII	
7. CONCLUSIONES.....	39
Capítulo VIII	
8. PERSPECTIVAS.....	40
Capítulo IX	
9. BIBLIOGRAFÍA.....	41

## INDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Clasificación de la enfermedad renal crónica KDIGO 2012.....	5
2	Niveles de nefroprotección.....	7
3	Ejemplos de cetanoálogos comerciales .....	10
4	Evaluación de la toxicidad de los $\alpha$ -cetanoálogos .....	29

## INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Transaminación reversible $\alpha$ -cetoanálogos de un aminoácido a otro aminoácido. ....	9
2	Grupos de evaluación de toxicidad. ....	24
3	Grupos de evaluación de daño por isquemia/reperfusión....	25
4	Parámetros bioquímicos en el daño por isquemia/reperfusión en los grupos 6 a 11. ....	31
5	Marcadores de daño renal en el daño por isquemia/reperfusión en los grupos 6 a 11. ....	32
6	Niveles de citocinas proinflamatorias en el daño por isquemia/reperfusión en los grupos 6 a 11. ....	33
7	Marcadores de estrés oxidativo en el daño por isquemia/reperfusión en los grupos 6 a 11. ....	34
8	Hallazgos histológicos en los diversos grupos de estudios con y sin daño por isquemia-reperfusión. A: Sham (solución salina + laparotomía). B: I/R. C: ALO 50 + I/R. D: AAE 400 + I/R. E: AAE 800 + I/R. F: AAE 1200 + I/R. (Aumento a 40 x). ....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AAE</b>	$\alpha$ -cetoácidos de aminoácidos esenciales
<b>ADP</b>	adenosin difosfato
<b>Alb</b>	albúmina
<b>ALO</b>	alopurinol
<b>ALT</b>	alanino aminotransferasa
<b>AOxT</b>	actividad antioxidante total
<b>ARA 2</b>	Bloqueadores de los receptores de angiotensina 2
<b>AST</b>	aspartato aminotransferasa
<b>ATP</b>	adenosin trifosfato
<b>BCC</b>	bloqueadores del canal del calcio
<b>BUN</b>	nitrógeno de la urea
<b>CA</b>	cetoácidos
<b>Cis C</b>	cistatina C
<b>Creat</b>	creatinina
<b>DBP</b>	dieta baja en proteínas
<b>DM</b>	diabetes mellitus
<b>ERC</b>	enfermedad renal crónica
<b>ERCT</b>	enfermedad renal crónica terminal
<b>EROS</b>	especies reactivas de oxígeno
<b>FA</b>	fosfatasa alcalina
<b>FNT-<math>\alpha</math></b>	factor de necrosis tumoral alfa
<b>G-CSF</b>	factor estimulante de colonias de granulocitos
<b>HMGB1</b>	high mobility group box-1 protein
<b>IECAs</b>	Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina
<b>IFG</b>	índice de filtrado glomerular

<b>IFN 8</b>	interferon ocho
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	interleucina uno beta
<b>IL-6</b>	interleucina seis
<b>IL-10</b>	interleucina diez
<b>IL-18</b>	interleucina dieciocho
<b>1/sCr</b>	inversa de la creatinina sérica
<b>I/R</b>	isquemia/reperfusión
<b>KDIGO</b>	Kidney Disease Improving Global Outcomes
<b>KDOQI</b>	Kidney Disease Outcomes Quality Initiative
<b>KEEP</b>	Kidney Early Evaluation Program
<b>KIM-1</b>	kidney injury molecule 1
<b>LDH</b>	lactato deshidrogenasa
<b>LDL</b>	lipoproteínas de baja densidad
<b>MCP-1</b>	monocyte chemoattractant protein-1
<b>MDA</b>	malondialdehído
<b>MBG</b>	membrana basal glomerular
<b>NAD<sup>+</sup></b>	nicotinamida adenina dinucleótido (oxidado)
<b>NADH</b>	nicotinamida adenina dinucleótido (reducido)
<b>NGAL</b>	neutrophil gelatinase-associated lipocalin
<b>NHANES</b>	National Health and Nutrition Examination Survey
<b>NKF</b>	National Kidney Foundation
<b>PA</b>	Presión arterial
<b>PT</b>	Proteínas totales

## RESUMEN

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González"

Unidad de Hígado / Departamento de Medicina Interna

Servicio de Nefrología / Departamento de Medicina Interna

Servicio de Trasplantes / Departamento de Cirugía General

Presenta: Dra. Concepción Sánchez Martínez

Título del estudio: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA Y ANTIOXIDANTE DE LOS ANÁLOGOS DE AMINOÁCIDOS ESENCIALES CONTRA EL DAÑO POR ISQUEMIA/REPERFUSIÓN RENAL EN RATAS WISTAR.

**Introducción:** La enfermedad renal crónica (ERC) representa un reto en salud debido a la falta de tratamiento específico. Los  $\alpha$ -cetoácidos de aminoácidos esenciales (AAE) son ampliamente utilizados en el tratamiento en los pacientes con ERC avanzada por detener los síntomas de uremia, pero se desconoce si pudieran tener un efecto en el estrés oxidativo e inflamación que está presente en la ERC. El daño por isquemia/reperfusión (I/R) se caracteriza por un proceso inflamatorio intenso, además de la liberación de especies reactivas de oxígeno.

**Objetivo:** evaluar el efecto de los AAE sobre el daño I/R renal en un modelo animal con ratas Wistar.

**Material y Métodos:** Las ratas fueron divididas en 11 grupos (n=6 en cada grupo): 2 recibieron solución fisiológica con y sin laparotomía, uno con I/R, 6 recibieron AAE (400, 800 y 1200 mg/kg c/24h) 3 con y 3 sin I/R, 2 alopurinol (ALO) 50 mg/Kg/24 h

con y sin I/R. Se evaluaron marcadores bioquímicos como creatinina (Creat), nitrógeno de la urea (BUN), entre otros, así como citocinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6 y FNT- $\alpha$ ), marcadores de daño renal (Cistatina C, KIM-1 y NGAL) y marcadores de estrés oxidativo tales como malondialdehído (MDA) y actividad antioxidante total (AOxT).

**Resultados:** los 3 grupos con AAE+I/R mostraron una reducción del nivel de Creat y BUN, así como de los marcadores de daño renal, citocinas proinflamatorias y MDA en relación dosis dependiente, de igual forma que ALO; así mismo, se mantuvo AOxT en los grupos al compararse con el grupo I/R.

**Conclusiones:** se describe por primera vez el efecto nefroprotector de los AAE contra el daño I/R renal, causando una disminución dosis dependiente de los marcadores bioquímicos, de daño renal, de citocinas proinflamatorias y de MDA, además de evitar el consumo de los antioxidantes totales.

Dra. C. Paula Cordero Pérez

Director de Tesis

# CAPITULO I

## 1. Introducción

### *1.1 Enfermedad Renal Crónica. Definición y clasificación.*

La Enfermedad Renal Crónica (ERC) se define como la pérdida progresiva e irreversible de la función renal. Esto ocurre cuando el índice de Filtrado Glomerular (IFG) es menor a 60 mL/min. En el año 2000, la Fundación Nacional del Riñón (National Kidney Foundation – NKF -) y la junta consultiva de Iniciativa de Calidad y pronóstico de la Enfermedad Renal Crónica (K/DOQI) aprobó las guías de práctica clínica para definir la ERC y clasificar las fases de la progresión de esta, las cuales fueron publicadas en el año 2002. Se define entonces a la ERC como la presencia de daño renal por periodo mayor de tres meses o al IFG menor de 60 mL/min, con o sin evidencia de daño renal; a su vez, daño renal se define como cualquier alteración estructural o funcional del riñón con o sin descenso del IFG, manifestado por: anomalías patológicas o presencia de marcadores de daño renal (anomalías en la composición de la sangre u orina, o alteración de los estudios de imagen).<sup>1</sup> Posteriormente, en el año 2012, el grupo denominado Enfermedad Renal: mejorando los resultados mundiales (Kidney Disease: Improving Global Outcomes – KDIGO), propuso clarificar más los conceptos, además de reclasificar y, en lugar de cinco estadios, se subdivide al estadio 3 en a y b (G3a, G3b) quedando finalmente seis divisiones, y adicionalmente se toma en cuenta el nivel de albuminuria (ver Tabla 1 ) lo cual define el pronóstico y avance de la enfermedad renal.<sup>2</sup>

### 1.1.1. Etiología

- 1) La etiología de la ERC se puede dividir de acuerdo con las estructuras afectadas: Enfermedad glomerular: La principal causa es la Diabetes Mellitus (DM), ya sea tipo 1 o 2, glomerulonefritis primarias (ej. membranosa, focal y segmentaria, membranoproliferativa), enfermedades autoinmunes (ejem. Lupus eritematoso sistémico), infecciones sistémicas (ejem. Endocarditis bacteriana, infección por virus de la hepatitis C o B), neoplasias, exposición a químicos o fármacos, historia familiar.
- 2) Enfermedades vasculares: Hipertensión arterial. Estenosis de arterias renales, enfermedades de pequeños, medianos y grandes vasos.
- 3) Enfermedad túbulo-intersticial: Infecciones del tracto urinario (pielonefritis), litiasis, obstrucción, uso de medicamentos (anti-inflamatorios no esteroideos, antibióticos), drogas.
- 4) Enfermedad quística: Enfermedad renal poliquística, enfermedad de Von Hippel Lindau, esclerosis tuberosa.

**Tabla 1. Clasificación de la ERC KDIGO 2012**

Rango	Descripción	IFG ml/min/ 1.73 m <sup>2</sup>	A1 < 30 mg/gr	A2 30-300 mg/gr	A3 >300 mg/gr
<b>G1</b>	Normal o aumentado	>90	+	++	+++
<b>G2</b>	Descenso leve	60 – 89	+	++	+++
<b>G3a</b>	Descenso leve a moderado	45 – 59	++	+++	++++
<b>G3b</b>	Descenso moderado a severo	30 – 44	+++	++++	++++
<b>G4</b>	Descenso severo	15 – 29	++++	++++	++++
<b>G5</b>	Insuficiencia renal	<15	++++	++++	++++
+ Riesgo bajo ++ Riesgo moderadamente elevado +++ Riesgo elevado ++++ Riesgo muy elevado					

### 1.1.2. Incidencia y prevalencia

La ERC representa un problema de salud pública a nivel mundial, con un crecimiento exponencial en las últimas tres décadas; si a esto agregamos el subdiagnóstico debido a la ausencia de síntomas, el problema es mucho más grave. En los Estados Unidos, la tercera encuesta Nacional de Salud y Nutrición (NHANES III: 1988- 1994) se estimó que el 11 % de la población presentaba algún grado de ERC; el 3 % de la población (5.6 millones de personas) tenían una concentración sérica de creatinina elevada (1.4 a 1.6 mg/ dl) y de estos, el 70 % son hipertensos. Este estudio reportó la prevalencia de la proteinuria (aumento del índice albúmina / creatinina) en torno al 11.7 %. Esta alta prevalencia refleja la tasa de excreción de albúmina aumentada en los mayores de 70 años (la prevalencia estimada del 30%) y en individuos con DM (> 50 %).<sup>3</sup>

En México, la ERC genera un alto costo social y económico: en un estudio realizado en una población urbana, se demostró que la prevalencia de ERC con un IFG menor de 15 ml/min era de 1142 por millón de habitantes (ppmh), y aquellos con IFG menor de 60 ml/min era de 80788 ppmh; tomando en cuenta estos datos, la prevalencia es similar a la reportada en otros países, aunque solo 1 de cada 4 pacientes tiene acceso a la terapia de reemplazo renal.<sup>4</sup>

El Programa de Evaluación Renal Temprana (The National Kidney Foundation Kidney Early Evaluation Program –KEEP–), es un programa gratuito de tamizaje para detectar individuos con alto riesgo de ERC, provee educación e información sobre la enfermedad e implementa las medidas necesarias para detener o retrasar la enfermedad y sus complicaciones; en México, desde el 2008, existe como un programa piloto en la Ciudad de México y en Jalisco. Los datos iniciales reportan una prevalencia de ERC del 22% en la Ciudad de México y del 33% en Jalisco; es mayor en individuos diabéticos (38%) y en diabéticos con hipertensión (42%). Hay un retraso en el diagnóstico a pesar de tener contacto con médico un año antes.<sup>5</sup> Algunos otros registros aislados reportan un aumento continuo de pacientes con enfermedad renal crónica terminal (ERCT), siendo de 92 ppmh en 1999 a 372 ppmh en el año 2007, siendo la segunda cifra más alta del mundo; la causa más frecuente de ERCT es la DM con el 55 % de todos los casos nuevos, y la segunda la hipertensión arterial.<sup>6</sup>

### *1.1.3. Tratamiento actual*

No existe un tratamiento específico para revertir o detener la enfermedad renal. Las medidas actualmente disponibles retrasan la historia natural de progresión. Estos

reciben el nombre de terapias de nefroprotección (Tabla 2), las cuales se dividen en nivel 1, que se debe de aplicar a todos los pacientes y el nivel 2 que se aplica en pacientes que así lo requieran.<sup>7</sup>

**Tabla 2. Niveles de nefroprotección.**

<b>Nefroprotección</b>	
<b>Nivel 1</b>	<b>Nivel 2</b>
Control de la presión arterial	Restricción de sal. Uso de diuréticos
Administrar IECAs o ARA 2	BCC no dihidropiridínicos
Evitar BCC dihidropiridínicos (solo se agrega si es necesario para control de PA)	Controlar síndrome metabólico <ul style="list-style-type: none"> <li>- Obesidad</li> <li>- Evitar uso de edulcorantes</li> <li>- Disminuir nivel de colesterol LDL</li> </ul>
Ingesta de proteínas 0.7 gr/kg/día (en un estado de nutrición adecuado)	Uso de bloqueadores de aldosterona
	Uso de alopurinol
	Control de fósforo sérico
	Suspender tabaquismo
	Terapia con álcalis (bicarbonato)
	Uso de $\beta$ -bloqueadores
	Evitar el uso de warfarina
IECAs: Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, ARA 2: bloqueadores de los receptores de angiotensina 2, BCC: bloqueadores de los canales de calcio, PA: presión arterial, LDL colesterol de baja densidad.	

### 1.2. Análogos de $\alpha$ -cetoácidos de aminoácidos esenciales

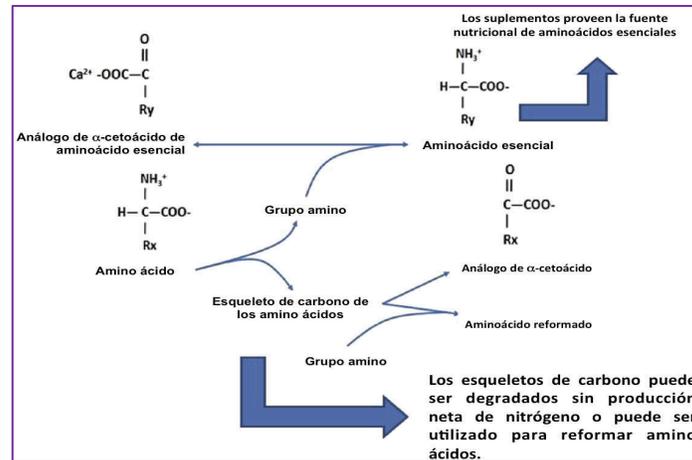
Los análogos  $\alpha$ -cetoácidos de aminoácidos esenciales (AAE) son utilizados como tratamiento conservador en los pacientes con ERC avanzada con la intención de reducir la producción de metabolitos de la degradación de nitrógeno, disminuyendo

la uremia y retrasando la disminución del IFG, lo cual pospone el inicio de la terapia sustitutiva<sup>8</sup>. Los efectos de los AAE junto a una dieta baja en proteínas, fueron descritos por primera vez en los 70s<sup>9</sup> y su uso continua hasta la fecha. Los efectos descritos incluyen: 1) reducen la producción de metabolitos de degradación de nitrógeno;<sup>10</sup> 2) reducen la uremia y retrasan la disminución de la tasa de filtración glomerular;<sup>11</sup> 3) incrementan la síntesis de proteínas y disminuyen degradación de estas;<sup>12</sup> 4) reducen la carga de potasio, fósforo y posiblemente sodio mientras que proporcionan calcio;<sup>13</sup> 5) previenen el gasto energético por proteínas;<sup>12</sup> y son utilizados como suplemento alimenticio. Se sabe que, comparados con los aminoácidos esenciales, los  $\alpha$ -cetoácidos no ejercen ningún efecto estimulante en la hiperfiltración del riñón. Se recomienda una dieta con 0.3 a 0.7 g de proteína por kilogramo por día con análogos de AAE en los pacientes con ERC<sup>14</sup>.

#### *1.2.1. Transaminación reversible cetoanálogos de un aminoácido a otro aminoácido*

Los análogos de AAE tienen los beneficios clínicos previamente descritos a causa de suplir al organismo de los elementos estructurales de las proteínas sin cargarlo de nitrógeno adicional. Esto ocurre debido a que los análogos de AAE (aminoácidos desaminados) participan en los mismos procesos metabólicos de transaminación que los AAE. En la transaminación el primer paso involucra remover el grupo amino unido al carbono alfa y remplazarlo por un grupo ceto o hidroxilo, sintetizando constantemente, así los  $\alpha$ -cetoácidos y los hidroxilácidos (bloques estructurales de

las proteínas) (Figura 1). Por lo que, una administración exógena de los  $\alpha$ -cetoácidos permite la síntesis “ex novo” de aminoácidos.<sup>14</sup>



**Figura 1. Transaminación reversible  $\alpha$ -cetoanálogos de un aminoácido a otro aminoácido** (modificado de Shah AP, Kalantar-Zadeh K, Kopple JD. Is there a role for ketoacid supplements in the management of CKD? Am J Kidney Dis. 2015 May;65(5):659-73)

### 1.2.2. Composición de los suplementos de $\alpha$ -cetoácidos/AAE

Muchos suplementos generalmente contienen 4 análogos de  $\alpha$ -cetoácidos (valina, leucina, isoleucina y fenilalanina), un análogo de hidroxiaácido metionina y 4 AAE (triptófano, histidina, treonina y lisina); y dado que los análogos de  $\alpha$ -cetoácidos son ácidos fuertes, estos son generalmente proporcionados como sales de calcio.<sup>13</sup> La tabla 3 muestra el contenido típico de los suplementos comercialmente disponibles.

**Tabla 3. Ejemplos de cetanoálogos comerciales**

No. Comp	Preparación 1		Preparación 2		Preparación 3		Preparación 4	
	Nombre del componente	mg/pil	Nombre del componente	mg/pil	Nombre del componente	mg/pil	Nombre del componente	g/sobre
1	Ca- cetoisoleucina	67	Cetoisoleucina	76	Ca- cetoisoleucina	67	Cetonoálogo leucina	0.429
2	Ca-cetoleucina	101	Cetoleucina	97	Ca-cetoleucina	101	Cetonoálogo DL- isoleucina	0.285
3	Ca-cetofenilalanina	68	-	-	Ca-fenilpiruvato	68	Cetonoálogo fenilalanina	0.310
4	Ca-cetovalina	86	Cetovalina	68	Ca-cetovalina	86	Cetonoálogo valina	0.408
5	Ca- hidroximetionina	59	Hidrometionina	26	Ca- hidroximetionina	59	Hidroxianoálogo metionina	0.236
6	L-acetato de lisina	105	L-lisina	129	L-acetato de lisina	105	Monoacetato L-lisina	0.420
7	L-treonina	53	L-treonina	75	L-treonina	53	L-treonina	0.212
8	L-triptofano	23	-	-	-	-	L- triptófano	0.101
9	L-histidina	38	L-histidina	26	L-histidina	38	L-histidina	0.152
10	L-tirosina	30	L-tirosina	152	L-tirosina	30	L-tirosina	0.120
11	-	-	L-ornitina	118	-	-	-	-
12	Calcio	50	Calcio	3.4	-	-	Calcio	0.4

mg: miligramos, pil: píldora, g: gramos, Ca: calcio

A pesar de los beneficios descritos del uso de los análogos  $\alpha$ -cetoácidos en varios estudios, el uso de estos en los pacientes con daño renal no está claro cual es su mecanismo de acción, además de su efecto en estadios tempranos de la ERC, por lo que más investigación al respecto es necesaria; aunado a ello tampoco se conoce el efecto sobre la lesión por isquemia-reperusión.

### *1.3. Mecanismos de implementación de daño renal. Progresión de la ERC*

La progresión es más común en pacientes con función renal alterada, a partir de la etapa 3a de la ERC. La disminución de la función renal se ha descrito en la mayoría de los pacientes como la constante de la inversa de la creatinina sérica (1/sCr) contra el tiempo con una trama lineal. Puede haber aceleración de la pérdida de la función renal debido a eventos espontáneos o secundarios, como infecciones, deshidratación, obstrucción o cambios en el control de la presión arterial.

La tasa de progresión de la ERC varía en función de la nefropatía subyacente, por ejemplo, la tasa de progresión de la nefropatía diabética no tratada tiene una pérdida anual de IFG de alrededor de 10 mL/ min.<sup>15</sup>

Las diferentes estructuras del riñón se pueden ver afectadas por diferentes mecanismos, que van a terminar en un proceso de cicatrización irreversible; los mecanismos de daño están basados en múltiples estudios experimentales simulando situaciones en los humanos, para poder comprender y dar un mejor abordaje a la enfermedad renal. Por ejemplo, la pérdida de nefronas por pérdida de masa (como ocurre en una nefrectomía unilateral) producirá cambios hemodinámicos a nivel del glomérulo, intentando compensar; entre estos factores se encuentran: la angiotensina (a la cual se le han descritos factores profibróticos), endotelinas tipo A y B, péptido natriurético auricular, eicosanoides, bradiquininas, urotensina II y citocinas como el factor de crecimiento transformante  $\beta$  y factores de crecimiento tipo insulina. Posteriormente iniciara un proceso de adaptación que terminara en un daño crónico permanente e irreversible.<sup>16</sup>

La comprensión y la cicatrización progresiva en la ERC provienen del estudio de una serie de modelos experimentales. La mayoría tienen algunas similitudes con nefropatías clínicas, pero ninguna es totalmente representativa.

### *1.3.1. Modelos experimentales de lesión renal aguda y crónica*

*Ablación renal.* Este modelo experimental, utilizado ampliamente en los últimos 25 años, se basa en una reducción de la masa renal funcional siendo la nefrectomía 5/6 la mas utilizada. Los cambios adaptativos que se llevaran a cabo en el riñón

remanente en proporción a la cantidad de tejido resecaado se caracterizan por la hipertrofia y la hiperfunción. Los primeros cambios hemodinámicos adaptativos glomerulares (hiperperfusión glomerular, hiperfiltración e hipertensión) han sido implicados en la patogenia de la esclerosis glomerular. Histológicamente, el modelo de riñón remanente se desarrolla en dos fases: una fase inicial de la adaptación renal tubular con hipertrofia glomerular y proximal, y una fase tardía de la glomeruloesclerosis progresiva y cicatrización tubulointersticial en un lapso de 60 a 180 días. Este modelo se centra en la hipertensión sistémica grave, que, a falta de la autorregulación eficaz de los glomérulos remanente, es libremente comunicada al lecho capilar glomerular<sup>17</sup>.

Modelo de nefritis tóxica sérica. Se induce en ratas mediante una única inyección de un anticuerpo anti-membrana basal glomerular (anti-MBG) que lleva a una inicial glomerulonefritis necrotizante o media luna mediada por monocitos, caracterizada por proteinuria y función renal alterada. En algunas ratas, la glomerulonefritis es progresiva y conduce a insuficiencia renal terminal. La progresión es independiente de la respuesta inmune inicial. El elemento de la cicatrización tubulointersticial en este modelo es leve y la hipertensión sistémica es rara. En ausencia de hipertensión arterial sistémica y la cicatrización tubulointersticial severa, la progresión de la ERC en este modelo es variable. Este modelo guarda similitudes con la glomerulonefritis aguda necrotizante y de media luna en el hombre, así como a la glomerulonefritis mesangiocapilar. El resultado final de esta nefropatía es impredecible<sup>17</sup>.

Nefritis de Heymann. Se trata de un modelo experimental de nefropatía membranosa inducido en ratas mediante una única inyección de un anti- antígeno

del borde en cepillo del túbulo proximal. El anticuerpo produce una reacción cruzada con sitios antigénicos [glicoproteína (gp) 330] en los podocitos del glomérulo que conducen a la formación de complejos inmunes in situ. El resultado final es una nefropatía membranosa caracterizada por proteinuria intensa asociada con glomeruloesclerosis y fibrosis intersticial leve. La ausencia de hipertensión arterial sistémica puede explicar el carácter no progresivo de esta nefropatía experimental. Este modelo ha demostrado su utilidad en el estudio de aspectos inmunológicos de la nefropatía membranosa y para estudiar el comportamiento de los podocitos en el curso de la nefrosis experimental y para probar la eficacia de antiproteinúricos<sup>17</sup>.

Glomerulonefritis Anti-Thy-1. Se induce en ratas mediante una única inyección de un anticuerpo contra el antígeno de membrana de células mesangiales Thy1. Se caracteriza por una aguda mesangiólisis dependiente del complemento seguido de una glomerulonefritis mesangioproliferativa que conduce a la glomeruloesclerosis. La migración y proliferación de células mesangiales residuales, así como de precursores hematopoyéticos hacia los penachos glomerulares dañados, contribuye en pocas semanas de la lesión a la repoblación de los glomérulos dañados; por lo tanto, en un plazo de 28 días, los cambios proliferativos y esclerosantes se resuelven. Este modelo no se asocia con hipertensión arterial sistémica o con importantes cambios tubulointersticiales<sup>18</sup>.

Nefritis por aminonucleósido puromicina. La inyección única de esta sustancia conduce a lesiones glomerulares epiteliales y al síndrome nefrótico. La administración de puromicina a ratas da lugar a proteinuria severa y a lesiones histológicas similares a los de la nefropatía de cambios mínimos en el hombre. El

modelo no se asocia con hipertensión arterial sistémica o intraglomerular. La inyección repetida subcutánea, intravenosa o intraperitoneal de aminonucleósido puromicina conduce a una insuficiencia renal progresiva, glomeruloesclerosis y fibrosis túbulo-intersticial<sup>17</sup>.

Nefrosis por Adriamicina. Este modelo experimental de síndrome nefrótico es inducido por una inyección intravenosa única de adriamicina. La gravedad de la glomeruloesclerosis subsiguiente depende de la dosis inyectada. En la variante leve con una sola dosis (5 mg / kg de peso corporal), la nefropatía por adriamicina se caracteriza por proteinuria intensa y sostenida que se presenta posteriormente algunos días después de la inyección. Los cambios histológicos son mínimos y similares a los descritos en el modelo de puromicina. El modelo de dosis única no se asocia con hipertensión arterial sistémica, a pesar de un aumento de la presión capilar intraglomerular (PGC). Por el contrario, la inyección de adriamicina de 7.5 mg/kg de peso corporal, o la inyección repetida de adriamicina, lleva a la hipertensión sistémica, la fibrosis túbulo-intersticial y glomeruloesclerosis progresiva. El modelo de adriamicina, así como el modelo de puromicina descritos anteriormente, han sido valiosos para determinar la participación del síndrome nefrótico (proteinuria intensa y la hiperlipidemia) a la progresión de la glomeruloesclerosis. Ellos han puesto de relieve el papel fundamental que desempeñan los podocitos en el desarrollo de glomeruloesclerosis y proteinuria<sup>17</sup>.

Disfunción podocitaria. Se ha estudiado el papel central a los podocitos en la patogénesis y la progresión de la proteinuria y la glomeruloesclerosis experimental. Se ha observado relación entre el agotamiento de los podocitos (podocitopenia) y

la severidad de la proteinuria, así como la progresión de la glomeruloesclerosis. Los avances en biología celular y molecular han identificado una serie de proteínas de superficie celular y marcadores asociados a los podocitos e involucrados en el mantenimiento de su integridad y la función, como la nefrina, podocina, actinina 4 y proteína asociada CD2 (CD2AP). Las mutaciones relacionadas con el agotamiento de estas proteínas en ratones se han asociado con el síndrome nefrótico<sup>17</sup>.

*Nefropatía Diabética.* La diabetes mellitus puede ser inducida en animales de experimentación mediante una única inyección de agentes capaces de destruir células pancreáticas, como estreptozotocina y alloxan. La inducida por estreptozotocina ha sido ampliamente estudiada. Tras la inducción de la diabetes, la nefropatía se desarrolla en tres etapas. La primera se caracteriza por hipertrofia renal, así como hiperperfusión glomerular, hiperfiltración e hipertensión. Tres meses después se produce expansión progresiva mesangial y proteinuria asociada. La etapa final se produce después de 12 a 18 meses, cuando se presenta esclerosis glomerular. Sin embargo, estas lesiones no son representativas de la hialinosis nodular encontrada en la nefropatía avanzada. La función renal se mantiene en la diabetes inducida por estreptozotocina, y los animales son normotensos. Los ratones transgénicos que sobreexpresan el receptor humano de productos de glucosilación avanzada desarrollan una forma severa de nefropatía diabética experimental cuando se cruza con otra cepa de ratón transgénico que desarrolla la diabetes dependiente de insulina después del nacimiento. Este modelo de ratón transgénico doble reproduce las lesiones renales diabéticas en los seres humanos<sup>17</sup>.

Hipertensión arterial sistémica. La hipertensión puede ser inducida en ratas mediante la administración de mineralocorticoides, por la carga de sal, así como mediante la inducción de estenosis unilateral de la arteria renal. Cuando la hipertensión sistémica se le permite llegar a los capilares glomerulares través de la autorregulación defectuosa, como en las ratas espontáneamente hipertensas y ratas Dahl sensibles a la sal, se aumenta la presión capilar glomerular y ocurre la glomeruloesclerosis<sup>17</sup>.

Daño por isquemia-reperfusión renal. Como esta investigación se centra en este mecanismo de daño, se analizará profundamente en el siguiente punto.

#### *1.4. Mecanismo de daño por isquemia/ reperfusión (I/R)*

El daño por I/R es un fenómeno que ocurre cuando se corta el suministro de sangre a un órgano por un periodo largo de tiempo y después es súbitamente reperfundido con sangre oxigenada. Además de su relación con la función retrasada del injerto, está asociado clínicamente a rechazo del trasplante, rechazo crónico y disfunción crónica del tejido, afectando a órganos como el corazón, riñón, intestino, cerebro y pulmón en procedimientos como la cirugía torácica, cirugía vascular periférica, cirugía vascular mayor y trasplante de órganos sólidos.<sup>19</sup>

Este proceso está caracterizado por la liberación de especies reactivas de oxígeno (EROS) debido a la modificación en la ruta metabólica de la degradación del ATP y ADP. El primer paso en dicha vía metabólica es la degradación del nucleósido de adenosina a hipoxantina. Esta hipoxantina es oxidada a xantina utilizando a la enzima xantina oxidasa. En condiciones normales, la xantina oxidasa existe como

una forma reductora de  $\text{NAD}^+$ , conocida como xantina deshidrogenasa (Forma D). Esta enzima cataliza la formación de xantina utilizando como sustrato el  $\text{NAD}^+$ , convirtiéndolo a NADH y la hipoxantina a xantina. Se ha demostrado que la hipoxia provoca un cambio conformacional en la enzima, transformando la forma D en la forma O (xantina oxidasa), la cual utiliza el oxígeno en lugar del  $\text{NAD}^+$  como sustrato para la conversión de hipoxantina a xantina.<sup>20</sup> Sin embargo, debido a la ausencia de oxígeno a causa de la isquemia, la xantina oxidasa es incapaz de realizar su función, por lo que la hipoxantina se acumula en el interior de la célula, aumentando sus valores hasta 10 veces tras 2 horas de isquemia.<sup>21</sup> Al ocurrir la reperfusión, grandes cantidades de oxígeno entran en el microambiente celular, reactivando a la xantina oxidasa rápidamente. Tal fenómeno produce en grandes cantidades radicales superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), ácido hipocloroso (HClO) y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ),<sup>22</sup> los cuales son causa del gran daño tisular provocado por la reperfusión, de igual forma que la intensa actividad inflamatoria provocada por la respuesta celular al estímulo del tejido dañado.

Aunado a lo anterior, la depleción de ATP provoca alteraciones en la función mitocondrial. Tales alteraciones provocan la translocación de la proteína proapoptótica Bax en la membrana mitocondrial, induciendo la liberación del citocromo c y provocando la apoptosis mediante la vía de las caspasas.<sup>23</sup>

Se ha demostrado el papel de las células mediadoras de la inflamación en las lesiones por I/R, y se ha encontrado que el bloqueo de las P-selectinas por ligandos solubles específicos disminuye significativamente la gravedad de la lesión por I/R.<sup>24</sup> Dichos resultados llevaron a la conclusión de que el neutrófilo juega un papel

principal en el daño por I/R, sin embargo, estudios recientes han indicado que su migración al tejido renal no juega un papel principal, a diferencia del papel jugado por los linfocitos T helper, en especial por el fenotipo Th1.<sup>25</sup>

#### *1.4.1. Modelos en animales*

Numerosos estudios se han realizado utilizando modelos de I/R, en especial, aquellos en los que se evalúa la actividad nefroprotectora de medicamentos.

Las dos modalidades más utilizadas son la isquemia bilateral y la heminefrectomía seguida por la isquemia del riñón restante. Sin embargo, la isquemia bilateral es preferida debido a su similitud con el proceso patológico en los seres humanos.<sup>26</sup> El modelo de isquemia bilateral se caracteriza por la oclusión del hilio renal mediante clamps vasculares por un periodo de tiempo que va desde los 30 minutos hasta más de una hora,<sup>26</sup> seguido de un periodo de reperfusión, que generalmente es de 24 horas. El modelo ha sido ampliamente utilizado en la evaluación de medicamentos con actividad nefroprotectora, como el alopurinol (ALO).<sup>27-30</sup>

#### *1.5. Uso de biomarcadores para evaluar enfermedad renal*

En el daño renal agudo, donde el daño tubular corresponde a la mayoría de los casos, el cual es asociado a la isquemia tubular, han sido bien identificados marcadores que proporcionan el diagnóstico. La combinación de biomarcadores como el KIM-1 (molécula 1 de lesión renal: kidney injury molecule-1) y NGAL (lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos: neutrophil gelatinase associated lipocalin) utilizado en el fracaso renal agudo, se han estado utilizando en combinación con otras pruebas para valorar su eficacia en daño renal crónico,

incluyendo a cistatina C (cis C) y el factor de crecimiento fibroblástico (FGF 23).<sup>31</sup> La cis C, ha demostrado superioridad con respecto a creatinina en la evaluación de la función renal en el daño agudo, más sin embargo, desde hace varios años, se ha incluido como marcador endógeno para diferentes ecuaciones de cálculo de IFG, logrando estimación más exacta de la función renal que otras ecuaciones no han logrado, como MDRD y Cockcroft Gault, sobre todo en poblaciones especiales como en pacientes desnutridos, con variaciones asociadas a la edad, en hepatopatías y otras enfermedades.<sup>32</sup>

## CAPITULO II

### 2. HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN

#### 2.1 Hipótesis

- H1. Los análogos de aminoácidos esenciales disminuyen la inflamación y el estrés oxidativo en el daño por isquemia/reperfusión.
- H0. Los análogos de aminoácidos esenciales no disminuyen la inflamación y el estrés oxidativo en el daño por isquemia/reperfusión.

#### 2.2 Justificación

Debido a la falta de tratamiento actuales para la ERC mas efectivos, el uso de análogos de aminoácidos esenciales con probada actividad farmacológica podría brindar nuevas aplicaciones en estrategias de nefroprotección, mejorando el avance y pronóstico de la enfermedad renal crónica si se utiliza desde etapas tempranas de daño. La demostración de la actividad nefroprotectora es el primer paso para la posterior aplicación de estos fármacos, por lo cual es importante el desarrollar nuevos tratamientos para mejorar la sobrevida y disminuir las comorbilidades del enfermo renal y la vida de paciente. Esto brindara en un país como el nuestro, ofrecer alternativas de tratamiento que eviten la progresión a ERCT.

## CAPITULO III

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de análogos de aminoácidos esenciales sobre la respuesta inflamatoria y el estrés oxidativo en un modelo de daño renal por isquemia/reperfusión en ratas Wistar.

#### 3.2 Objetivos específicos.

- Determinar que la administración de análogos de aminoácidos esenciales no sea hepatotóxicos, ni nefrotóxicos en ratas Wistar mediante diversos marcadores de función hepática y renal.
- Evaluar el efecto de análogos de aminoácidos esenciales previo a la inducción del daño renal por isquemia/reperfusión mediante la determinación de marcadores bioquímicos y de daño renal en los grupos experimentales.
- Evaluar la respuesta anti-inflamatoria desarrollada por el uso de análogos de aminoácidos esenciales previo a la inducción del daño renal por isquemia/reperfusión a través de la determinación de citocinas pro-inflamatorias en los grupos experimentales.

- Evaluar el efecto en el estrés oxidativo por el uso de análogos de aminoácidos esenciales previo a la inducción del daño renal por isquemia/reperfusión mediante la determinación de la actividad antioxidante total y malondialdehído en los grupos experimentales.
- Determinar el daño a la arquitectura del tejido renal mediante la evaluación histológica en los grupos experimentales.

## CAPITULO IV

### 4. MATERIALES Y MÉTODOS

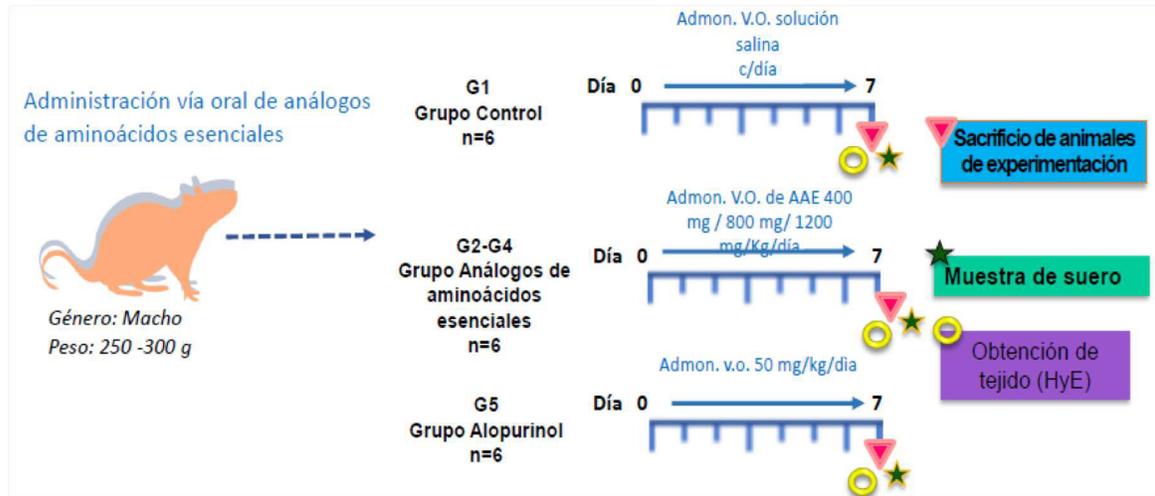
#### 4.1. Animales

Se utilizaron 66 ratas Wistar (peso: 250 - 300 g) proporcionadas por el Bioterio del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Todos los animales se mantuvieron en jaulas de polipropileno en condiciones estándar de temperatura, con periodos de luz/oscuridad de 12 h, con agua y alimento *ad libitum*. Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo con las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999<sup>33</sup> y aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio con el número de registro (HI17-00001).

#### 4.2. Diseño experimental.

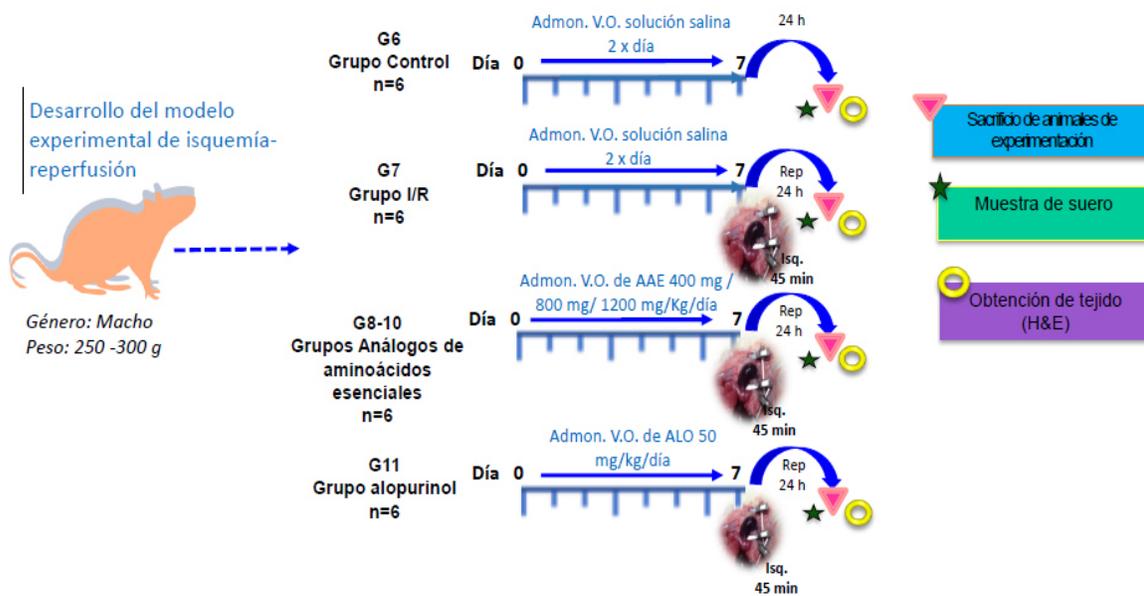
Los animales fueron divididos aleatoriamente en 11 grupos, 6 ratas por grupo. Los primeros 5 grupos se emplearon para la evaluación de toxicidad (figura 2). El grupo 1 (Sham) recibió solución salina (Solución CS PISA<sup>®</sup>, cloruro de sodio 0.9%) 1 mL/Kg, vía intragástrica (v.ig.) por 7 días; el grupo 2 recibió una dosis de alopurinol (ALO) [Zyloprim<sup>®</sup> tabletas de 100 mg, Aspen Port Elizabeth Pty, Ltd, Reg. No. 86270 SSA IV] de 50 mg/Kg, v.ig. (25 mg/Kg/12 h) por 7 días; el grupo 3 recibió una dosis de AAE (Cetolan<sup>®</sup> alfa cetoanálogos de aminoácidos, polvo para solución. Sobre de 7.00 g. Laboratorios Columbia<sup>®</sup> Reg. No. 122M2016 SSA IV) de 400 mg/kg, v.ig. (200 mg/Kg/12 h) por 7 días; el grupo 4 recibió una dosis de AAE 800 mg/Kg v.ig.

(400 mg/Kg/12 h) por 7 días; el grupo 5 recibió una dosis de AAE 1200 mg/Kg v.ig. (600 mg/Kg/12 h) por 7 días.



**Figura 2.** Grupos de evaluación de toxicidad.

Los grupos 6 al 11 se emplearon para evaluar la nefroprotección. El grupo 6 recibió solución salina 1 mL/Kg, v.ig. por 7 días, y posteriormente se realizó laparotomía (grupo sham); el grupo 7 recibió solución salina 1 mL/Kg, v.ig. por 7 días, tiempo tras el cual se realizó I/R; el grupo 8 recibió una dosis de ALO de 50 mg/Kg, v.ig. (25 mg/Kg/12 h) por 7 días tiempo tras el cual se realizó I/R (control de nefroprotección); el grupo 9 recibió una dosis de AAE de 400 mg/Kg, v.ig. (200 mg/Kg/12 h) por 7 días tiempo tras el cual se realizó I/R; el grupo 10 recibió una dosis de AAE de 800 mg/kg, v.ig. (400 mg/Kg/12 h) por 7 días tiempo tras el cual se realizó I/R; el grupo 11 recibió una dosis de AAE de 1200 mg/kg, v.ig. (600 mg/Kg/12 h) por 7 días tiempo tras el cual se realizó I/R. (Figura 3).



**Figura 3.** Grupos de evaluación del daño isquemia/reperfusión.

#### 4.3. Inducción de Isquemia/reperfusión.

Las ratas fueron anestesiadas con xilacina (8 mg/Kg, intraperitoneal) (Sedaject, Vedilab S.A. de C.V. Reg. SAGARPA Q-0088-122) y ketamina (90 mg/kg, intraperitoneal) (Anesket, PiSA Agropecuaria, S.A. de C.V. Reg. SAGARPA Q7833-028). Fue realizada una pequeña incisión en la línea media del abdomen, a través de la cual se realizó una oclusión del pedículo renal con clamps microvasculares no traumáticos, se verificó la oclusión adecuada por cambio cianótico de ambos riñones. Después de 45 min se removieron los clamps microvasculares para la reperfusión, la cual fue confirmada por la restauración del flujo sanguíneo. La incisión abdominal fue cerrada con sutura 4.0. Todos los experimentos fueron realizados en condiciones asépticas. Los animales se monitorearon durante 24 h y estuvieron con agua y alimento *ad libitum*. Las ratas del grupo 6 fueron sometidas

al mismo procedimiento quirúrgico sin la colocación de los clamps microvasculares. Todos los animales fueron sacrificados 24 h post-reperfusión o post-7 días, colectándose la muestra de sangre o tejido renal para evaluación.

#### *4.4. Muestras de sangre y tejido.*

La sangre colectada de cada animal se dejó coagular y se centrifugó a 3,500 r.p.m. durante 15 min y se separó el suero para determinación de citocinas proinflamatorias, marcadores bioquímicos y marcadores de daño renal. Por otro lado, se retiraron los riñones y se dividieron longitudinalmente, colocando una parte en un criotubo e inmediatamente en hielo seco, para determinación de marcadores de estrés oxidativo. Otra parte del tejido fue fijado con formaldehído con buffer de fosfato a pH de 7.4 por 24 h. Posteriormente se realizaron cortes fijados en parafina para evaluar las alteraciones histológicas a través de la tinción de Hematoxilina & Eosina (H&E).

##### *4.4.1. Determinación de citocinas proinflamatorias*

Las concentraciones séricas de las citocinas proinflamatorias interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 beta (IL-1  $\beta$ ) y factor de necrosis tumoral alfa (FNT $\alpha$ ) fueron realizadas mediante un método de ELISA-sandwich utilizando kits comerciales (Rat IL-6 ELISA development kit, Rat IL-1 $\beta$  ELISA development kit, Rat TNF- $\alpha$  ELISA development kit, respectivamente, PeproTech, E.U.). Se utilizó avidina-peroxidasa y 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico (ABTS) para producir un cromógeno de concentración proporcional a la de la citocina evaluada y fue medido mediante espectrofotometría a 405 nm.

#### *4.4.2. Marcadores bioquímicos.*

La concentración sérica de proteínas totales (PT), albúmina (Alb), nitrógeno de la urea (BUN), creatinina (Creat), ácido úrico (AU), aspartato aminotransferasa (AST), alanino aminotransferasa (ALT), lactato deshidrogenasa (LDH), fosfatasa alcalina (FA) se determinaron por espectrofotometría mediante un instrumento auto-analizador ILAB-Aries (Instrumentation Laboratory, Milan, Italy) utilizando kits diagnósticos (Instrumentation Laboratory, Milan, Italy).

#### *4.4.3. Marcadores de daño renal.*

Las muestras de suero fueron analizadas para determinar los niveles de cistatina C, lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (neutrophil gelatinase associated lipocalin: NGAL) y molécula 1 de lesión renal (kidney injury molecule-1: KIM-1) utilizando kits comerciales de ELISA-sandwich (“Quantikine ELISA, Mouse/Rat Cystatin C Immunoassay” R&D Systems, MI, E.U., “Lipocalin-2 (NGAL) Rat ELISA Kit” abcam 119602, Cambridge, MA, E.U., “KIM-1 (TIM-1), Rat ELISA Kit” abcam 119597, Cambridge, MA, E.U., respectivamente). Estos fueron medidos por espectrofotometría a 450 nm.

#### *4.4.4. Marcadores de estrés oxidativo.*

La determinación de malondialdehído (MDA) se realizó mediante el método del ácido tricloroacético (método TCA), el cual se basa en la reacción del MDA con ácido tiobarbitúrico en un medio ácido y caliente a través del kit comercial “TBARS Assay Kit” de Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, E.U.). El producto de dicha reacción se midió espectrofotométricamente a 540 nm y fue proporcional a la

concentración de MDA en la muestra. La actividad de antioxidantes totales (AOxT) fue determinada con el Kit comercial “Antioxidant Assay Kit” de Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, E.U.). Este estado de antioxidante total en el homogenizado de tejido renal, involucro los antioxidantes enzimáticos, así como no enzimáticos y fue medido por espectrofotometría a 405 nm.

#### *4.5. Análisis estadístico*

Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  desviación estándar. Se estableció la homogeneidad de la varianza en primera instancia y las variables que cumplieron con distribución normal se analizaron mediante una prueba t de student para muestras independientes; los datos de grupos múltiples se analizaron con análisis de varianza (ANOVA) con prueba de comparación de grupos múltiple utilizando la prueba de Dunnet con el programa GraphPad Prism (v. 8.0.0; GraphPad, San Diego, CA, USA). Un valor de  $p < 0.05$  fue considerado como significativo.

## CAPITULO V

### 5. RESULTADOS

#### 5.1. Evaluación de toxicidad.

Los AAE no mostraron toxicidad hepática ni renal a diferentes dosis. Solo BUN, Crea, AU, NGAL, IL-1 $\beta$  y MDA mostraron diferencia significativa en alguno de los grupos de estudio vs Grupo 1(Tabla 4).

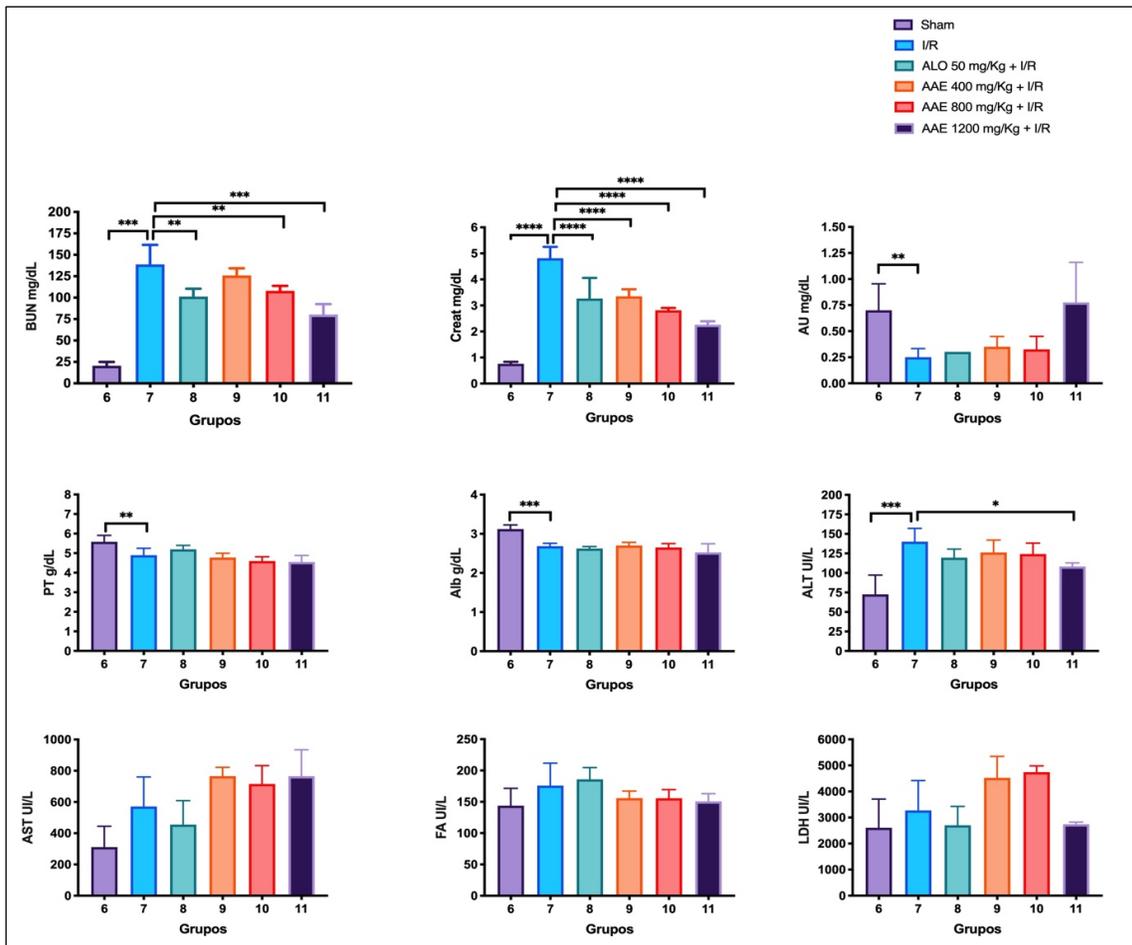
**Tabla 4. Evaluación de la toxicidad de los  $\alpha$ -cetoanálogos**

Medición	Sham	ALO 50 mg/kg	AAE 400 mg/Kg	AAE 800 mg mg/Kg	AAE 1200 mg/Kg
<b>Marcadores bioquímicos de función renal</b>					
BUN mg/dL	19.75 $\pm$ 1.25	23.35 $\pm$ 1.03*	16.5 $\pm$ 1.25	18.75 $\pm$ 0.75	19.75 $\pm$ 0.75
Creat mg/dL	0.67 $\pm$ 0.05	0.57 $\pm$ 0.02	0.56 $\pm$ 0.02	0.52 $\pm$ 0.04	0.47 $\pm$ 0.03*
AU mg/dL	0.62 $\pm$ 0.02	0.62 $\pm$ 0.08	0.67 $\pm$ 0.06	0.8 $\pm$ 0.04*	0.45 $\pm$ 0.02
<b>Marcadores bioquímicos de función hepática</b>					
PT g/dL	5.60 $\pm$ 0.07	5.95 $\pm$ 0.13	5.52 $\pm$ 0.14	5.70 $\pm$ 0.07	5.55 $\pm$ 0.01
Alb g/dL	3.27 $\pm$ 0.04	3.12 $\pm$ 0.02	3.30 $\pm$ 0.04	3.22 $\pm$ 0.04	3.27 $\pm$ 0.07
ALT UI/L	77.75 $\pm$ 6.62	56.25 $\pm$ 9.50	54.25 $\pm$ 8.27	49.75 $\pm$ 5.61	56.25 $\pm$ 9.50
AST UI/L	148.50 $\pm$ 18.34	109.00 $\pm$ 5.40	193.30 $\pm$ 32.59	157.00 $\pm$ 7.45	121.00 $\pm$ 7.42
FA UI/L	186.80 $\pm$ 35.49	169.00 $\pm$ 11.43	123.80 $\pm$ 16.14	143.00 $\pm$ 18.38	177.80 $\pm$ 32.54
LDH UI/L	2320.00 $\pm$ 580.50	1757.00 $\pm$ 197.30	2094.00 $\pm$ 217.60	2775.00 $\pm$ 505.40	1755.00 $\pm$ 364.60
<b>Marcadores bioquímicos de daño renal</b>					
Cis C ng/mL	381.30 $\pm$ 37.85	350.80 $\pm$ 24.38	287.00 $\pm$ 19.07	346.80 $\pm$ 23.04	395.50 $\pm$ 26.54
KIM-1 pg/mL	24.96 $\pm$ 9.85	38.98 $\pm$ 2.91	26.28 $\pm$ 6.40	53.53 $\pm$ 21.07	29.23 $\pm$ 8.06
NGAL pg/mL	113.30 $\pm$ 15.44	169.50 $\pm$ 13.09*	159.00 $\pm$ 11.90	104.00 $\pm$ 5.47	170.00 $\pm$ 14.03*
<b>Marcadores inflamatorios</b>					
IL - 1 $\beta$ ng/mL	0.35 $\pm$ 0.19	0.41 $\pm$ 0.09	0.82 $\pm$ 0.06*	0.46 $\pm$ 0.06	0.93 $\pm$ 0.13*
IL- 6 ng/mL	1.25 $\pm$ 0.25	1.36 $\pm$ 0.31	1.33 $\pm$ 0.15	1.92 $\pm$ 0.38	0.92 $\pm$ 0.29
FNT - $\alpha$ ng/mL	1.05 $\pm$ 0.28	0.79 $\pm$ 0.14	0.93 $\pm$ 0.25	1.14 $\pm$ 0.23	0.82 $\pm$ 0.20
<b>Marcadores de estrés oxidativo</b>					
MDA uM	0.75 $\pm$ 0.30	3.50 $\pm$ 0.34***	1.46 $\pm$ 0.25	1.96 $\pm$ 0.39*	1.97 $\pm$ 0.27*
AOxT mM	2.59 $\pm$ 0.10	2.63 $\pm$ 0.13	2.78 $\pm$ 0.06	2.72 $\pm$ 0.08	2.58 $\pm$ 0.11
<small>ALO: alopurinol; AAE: <math>\alpha</math>-cetoanálogos de aminoácidos esenciales; BUN: nitrógeno de la urea; Crea: creatinina; AU: ácido úrico; PT: proteínas totales; Alb: albúmina; ALT: alanino amino transferasa; AST: aspartato amino transferasa; FA: fosfatasa alcalina; LDH: lactato deshidrogenasa; ; Cis C: cistatina C; KIM-1: molécula -1 de lesión renal; NGAL: lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos; IL-1<math>\beta</math>:interleucina 1 beta; IL-6: interleucina 6; FNT-<math>\alpha</math>: factor de necrosis tumoral alfa; MDA: malondialdehido; AOxT: antioxidantes totales. Los valores expresan como media <math>\pm</math> desviación estándar. Grupo sham vs grupos de estudio, * <math>p &lt; 0.05</math>, ** <math>p &lt; 0.01</math>, *** <math>p &lt; 0.001</math>, **** <math>p &lt; 0.0001</math></small>					

## 5.2. Efecto de los AAE en la inducción de daño por I/R.

### 5.2.1. Análisis bioquímico.

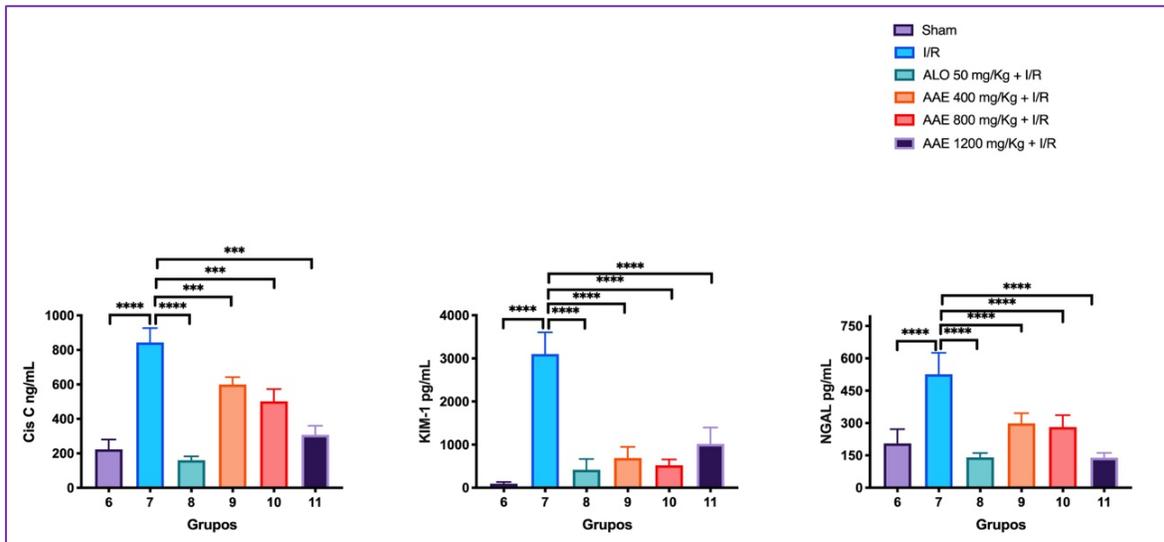
En el grupo 6 vs grupo 7 los niveles de Creat ( $0.75 \pm 0.03$  vs  $4.81 \pm 0.17$  mg/dL), BUN ( $20.60 \pm 1.96$  vs  $138.80 \pm 9.28$  mg/dL) y ALT ( $72.60 \pm 11.03$  vs  $140.00 \pm 6.98$  mg/dL) fueron incrementados significativamente, mientras que las PT ( $5.58 \pm 0.14$  vs  $4.90 \pm 0.14$  g/dL), alb ( $3.12 \pm 0.04$  vs  $2.68 \pm 0.03$  g/dL) y AU ( $0.70 \pm 0.11$  vs  $0.25 \pm 0.03$  mg/dL) disminuyeron significativamente. Los grupos 8,10 y 11 mostraron disminución significativa de creat y de BUN vs grupo 7, mientras que el grupo 9 mostró también disminución de ambos, pero solo fue significativo para creat. Del resto de los parámetros solo la ALT fue significativamente disminuida en el grupo 11 vs grupo 7 (Figura 4).



**Figura 4.** Parámetros bioquímicos en el daño por isquemia/reperfusión en los grupos 6 a 11.

### 5.2.2. Marcadores de daño renal

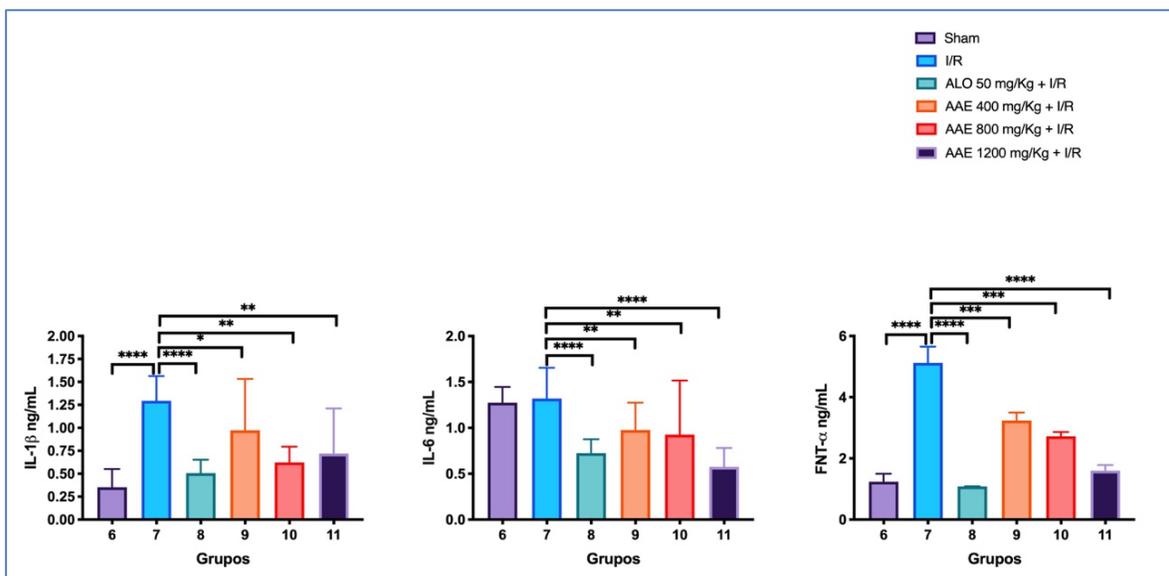
Los marcadores de daño renal (cis C, KIM-1 y NGAL) se incrementaron en el grupo 7 vs grupo 6 de forma significativa. Mientras que el tratamiento con ALO y AAE en los grupos 8 al 11 lograron disminuir significativamente estos marcadores (Figura 5).



**Figura 5.** Marcadores de daño renal en el daño por isquemia/reperfusión grupos 6 a 11.

### 5.2.3. Citocinas proinflamatorias.

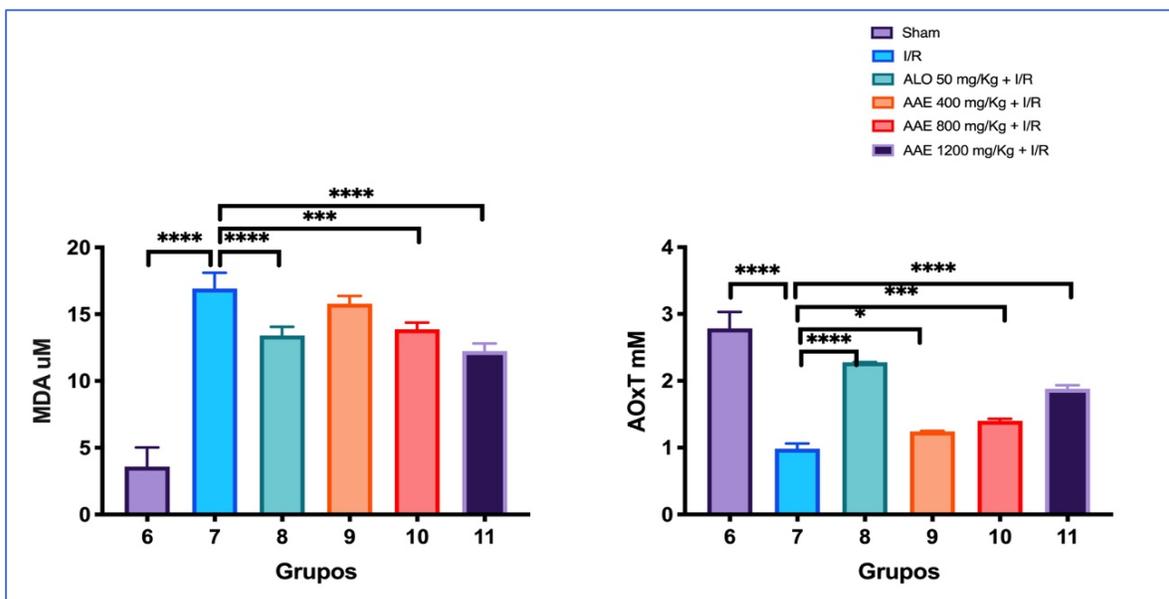
En el grupo 6 vs grupo 7, se observó incremento significativo de los niveles séricos de las citocinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  ( $0.35\pm 0.09$  vs  $1.29\pm 0.12$  ng/mL) y FNT $\alpha$  ( $1.23\pm 0.13$  vs  $5.12\pm 0.23$  ng/mL) ( $p < 0.0001$ , respectivamente), IL-6 mostro incremento, pero sin ser significativo. El grupo 8 vs grupo 7 mostro disminución de los niveles de todas las citocinas en forma significativa ( $p < 0.0001$ ); este mismo efecto fue observado en los grupos 9, 10 y 11 (Figura 6).



**Figura 6.** Niveles de citocinas proinflamatorias en el daño isquemia/reperfusión grupos 6 a 11.

#### 5.2.4. Marcadores de estrés oxidativo

La AOxT fue disminuida significativamente en el grupo 6 vs grupo 7. El tratamiento con ALO 50 mg/Kg en el grupo 8 y con AAE en los grupos 9, 10 y 11 limitó la disminución de la AOxT de forma significativa y en relación dosis-dependiente para AAE vs grupo 7. Por otro lado, el nivel de MDA fue incrementado significativamente en el grupo 7 vs grupo 6. Al contrario el tratamiento con ALO 50 mg/Kg en el grupo 8 y con AAE en los grupos 9, 10 y 11 limitó el incremento del MDA de forma significativa y en relación dosis-dependiente para AAE vs grupo 7 (Figura 7).

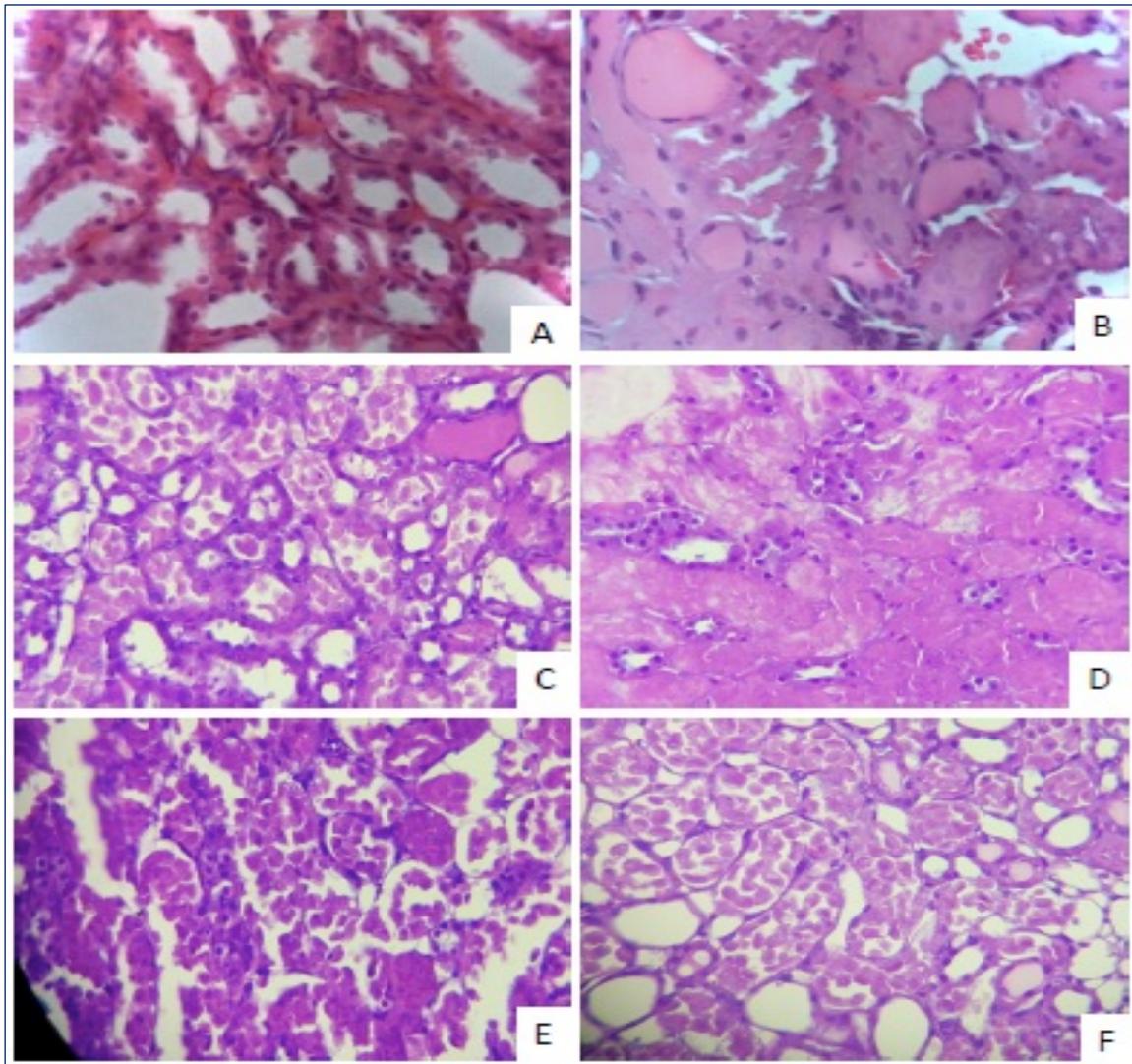


**Figura 7.** Marcadores de estrés oxidativo en el daño isquemia/reperfusión en los grupos 6 a 11.

### 5.2.5. Análisis histológico

El grupo solución salina con laparotomía mostró un parénquima renal, túbulos y glomérulos conservados, mientras que en el grupo con I/R se observó hasta un 90% de necrosis del epitelio tubular en médula y 80% en corteza. En el control de nefroprotección tratado con ALO + I/R se encontró datos de necrosis isquémica en el 50% distal de la corteza y necrosis aguda de túbulos contorneados, con afección medular. En el resto de los grupos tratados con AAE se observó un efecto similar a ALO; el grupo con AAE+I/R a 400 mg/kg se observó necrosis isquémica difusa con alteración en medula y corteza además de necrosis tubular aguda en las zonas preservadas; en AAE+I/R a 800 mg/kg se observó necrosis aguda de túbulos contorneados, con afección medular y yuxtamedular, mientras que la corteza se

encontró con datos de necrosis isquémica en parches y en AAE+IR a 1200 mg/kg se encontró necrosis aguda de túbulos contorneados principalmente proximales, con afección predominantemente medular, la corteza se encontró preservada (Figura 8).



**Figura 8.** Hallazgos histológicos en los diversos grupos de estudios con y sin daño por isquemia-reperfusión. A: Sham (solución salina + laparotomía). B: I/R. C: ALO 50 + I/R. D: AAE 400 + I/R. E: AAE 800 + I/R. F: AAE 1200 + I/R. (Aumento a 40 x)

## CAPITULO VI

### 6. DISCUSIÓN

La ERC actualmente se considera un problema de salud mundial, ya que la cantidad de pacientes aumenta rápidamente<sup>34</sup>. Esta se caracteriza por el desarrollo de glomeruloesclerosis y fibrosis intersticial, en las cuales han sido implicados una serie de factores entre los que se incluyen angiotensina II, factores de crecimiento, citocinas y metabolitos de oxígeno, entre otros.<sup>35</sup>

La restricción de proteínas en la dieta es una terapia importante en la ERC, y los cetoácidos (CA) se han evaluado en pacientes con esta etiología durante las dietas restringidas en proteínas<sup>36</sup>. Un estudio comparó la eficacia de una dieta baja en proteínas suplementada (DBP) con cetoácidos (DBP+CA) y una DBP sola para detener el desarrollo de lesiones renales en la ERC causada por nefrectomía 5/6 en ratas Sprague-Dawley la cual se caracteriza por proteinuria, una función renal disminuida, esclerosis glomerular y fibrosis tubulointersticial. La restricción proteica mejoró estos cambios, y el efecto fue más obvio en el grupo DBP+CA después de la nefrectomía 5/6 reportándose menores niveles séricos de alb, BUN y creat.<sup>37</sup> En el presente estudio se observó que los animales tratados con las diversas dosis de AAE disminuyeron también los niveles de BUN y creat de manera dosis dependiente, sin embargo, la alb, PT y AU no disminuyeron. Estos hallazgos indican que la exposición a los AAE pudiera haber protegido la función de los riñones remanentes de una lesión progresiva, ya que mejoraron la malnutrición proteica en el tejido remanente del riñón.

Por otro lado se ha descrito que en el daño por I/R renal algunos mediadores de daño renal como MCP-1 (proteína quimiotáctica de monocitos 1: monocyte chemoattractant protein 1), KIM-1 y cis C se incrementan conforme el tiempo de reperfusión<sup>38</sup>. En el presente estudio se observó que algunos de estos mediadores de daño como KIM-1, cistatina C y NGAL fueron disminuidos considerablemente en los grupos sometidos a isquemia previamente tratados con AAE. Estos datos respaldan su efecto nefroprotector.

La ERC puede ser exacerbada por el estrés oxidativo que promueve la producción de compuestos de carbonilo reactivos y lipoperóxidos que conducen a la acumulación de glicosilación avanzada y lipoxidación. Además, las EROS reaccionan ávidamente con el óxido nítrico, produciendo especies reactivas de nitrógeno citotóxicas capaces de nitrar proteínas y dañar otras moléculas<sup>39</sup>. Ha sido probado que el estrés oxidativo juega un papel importante en el desarrollo y progresión de esclerosis y fibrosis en el modelo de tejido remanente renal de ERC<sup>39,40</sup>. Se ha demostrado que una dieta baja en proteínas, con o sin cetoácidos, tiene un efecto antioxidante en humanos y animales con ERC<sup>40,41</sup>. Estudios previos en animales encontraron que los AAE combinados con una dieta baja en proteínas, previene la pérdida de peso y normaliza los niveles de albúmina, manteniendo el estado nutricional y mejorando la malnutrición proteica y lesión por estrés oxidativo en el tejido remanente del riñón<sup>40</sup>. Por otro lado, se ha reportado que en ratas sometidas a nefrectomía 5/6, la aplicación de productos proteicos de oxidación avanzada (asociados a deterioro de la función renal), favorecen un mayor estrés oxidativo en el proceso fibrótico<sup>37</sup>. En el presente estudio se indujo daño renal por

I/R en ratas Wistar y se demostró que los AAE modificaron los marcadores de estrés oxidativo ya que se evitó el consumo de la AOX<sub>T</sub> y se logró observar una reducción de la producción de MDA de manera dosis dependiente evidenciándose esto con un menor daño en la corteza renal en las ratas tratadas con AAE+IR en comparación con las ratas sometidas a IR. Además, esos efectos fueron dosis-dependiente.

Los factores que inician el daño celular y desencadenan la respuesta inflamatoria en cascada y la lesión renal no se comprenden completamente después de la lesión por I/R renal; se ha descrito el aumento de proteínas como la proteína de caja-1 de grupo de alta movilidad (HMGB1) que se libera por las células renales (particularmente células vasculares y tubulares) en la circulación venosa después del daño I/R renal. Esta proteína induce un aumento rápido en las citocinas/quimiocinas (incluyendo FNT $\alpha$ , G-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-1 $\alpha$ , IL-6) en la circulación sistémica<sup>42,43</sup>. Por otro lado, otros estudios reportaron una disminución de los niveles de IL-1 $\beta$ , IL-6 y FNT $\alpha$  en pacientes con diálisis peritoneal y tratados con cetoácidos<sup>41</sup>, mientras que en un modelo experimental en ratas con nefrectomía 5/6 tratados con cetoácidos se describe un incremento de IL-1 $\alpha$  e IL-6 pero no se encontraron cambios significativos con FNT- $\alpha$  e IL-18<sup>37</sup>. En el presente estudio, también se encontró una disminución de la IL-1 $\beta$ , IL-6 y FNT- $\alpha$  y de los marcadores de daño renal cis C, KIM y NGAL con el uso de los AAE en las ratas sometidas a I/R y previamente tratadas con AAE de manera dosis dependiente. Estos hallazgos sugieren que los AAE disminuyen la respuesta inflamatoria presente en el daño por I/R.

## CAPITULO VII

### 7. CONCLUSIONES

- Se describe por primera vez el efecto nefroprotector de los AAE contra el daño I/R renal, causando una disminución dosis dependiente de los marcadores bioquímicos, de daño renal, de citocinas proinflamatorias y de MDA, además de evitar el consumo de los antioxidantes totales en un modelo experimental.
- Los cetoanalogos no ocasionaron toxicidad hepática ni renal, incluso a dosis de 1200 mg/kg/día
- Los cetoanalogos proporcionan una nefroprotección dependiente de dosis, demostrado a través de citocinas proinflamatorias y biomarcadores de daño renal
- Los cetoanálogos también modifican los marcadores de estrés oxidativo evitando el consumo de los antioxidantes totales y reduciendo la producción de MDA dependiente de dosis.
- Se logro una disminución del daño en el tejido renal, en relación dosis dependiente.
- Habría que evaluar el si el efecto es mayor restringiendo proteínas.

## CAPITULO VIII

### 8. PERSPECTIVAS

- Establecer el perfil de los mediadores proinflamatorios, de estrés oxidativo y de función renal en un estudio piloto en pacientes con diversos estadios de la enfermedad renal.
- Establecer los mecanismos moleculares por los cuales los análogos de aminoácidos esenciales modulan los mediadores proinflamatorios, de estrés oxidativo y de función renal en un estudio piloto en pacientes con diversos estadios de la enfermedad renal.
- Evaluar el proceso de autofagia modulado por los análogos de aminoácidos esenciales en el proceso de isquemia/reperfusión renal.

## CAPITULO IX

### 9. BIBLIOGRAFÍA

1. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: Evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis.* 2002;39(suppl 1): S1-S266
2. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 clinical practice guidelines for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl.*2013; 3:1-150
3. Coresh J, Astor BC, Greene T, Eknoyan G, Levey AS. Prevalence of chronic kidney disease and decreased kidney function in the adult US population: Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Kidney Dis* 2003; 41:1—12
4. Amato D, Álvarez-Aguilar C, Castañeda-Limones R, Rodríguez E, Ávila-Díaz M, Arreola F, et al. Prevalence of chronic kidney disease in an urban Mexican population. *Kidney Int Suppl.* 2005;97: S11-17
5. Obrador GT, García-García G, Villa AR, Rubilar X, Olvera N, Ferreira E, et al. Prevalence of chronic kidney disease in the Kidney Early Evaluation Program (KEEP) Mexico and comparison with KEEP US. *Kidney International* (2010)77(Suppl 116) S2-S8
6. Guía de Práctica Clínica Prevención, Diagnóstico y Tratamiento de la Enfermedad Renal Crónica Temprana, México; Secretaria de Salud, 2009.
7. Parikh SV, Haddad NJ, Hebert LA. Retarding Progression of Kidney Disease. In: Johnson RJ, Feehally J, Floege J, editors. *Comprehensive Clinical Nephrology*. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Elsevier;2015. p.931-941

8. Cupisti A, Bolasco P. Keto-analogues and essential aminoacids and other supplements in the conservative management of chronic kidney disease. *Panminerva Med.* 2017 Jun;59(2):149-56. doi: 10.23736/S0031-0808.16.03288-2
9. Walser M, Coulter AW, Dighe S, Crantz FR. The Effect of Keto-analogues of Essential Amino Acids in Severe Chronic Uremia. *J Clin Invest.* 1973;52(3):678–690. doi:10.1172/JCI107229
10. Mitch WE, Walser M, Steinman TI, Hill S, Zeger S, Tungsanga K. The effect of a keto acid-amino acid supplement to a restricted diet on the progression of chronic renal failure. *N Engl J Med.* 1984;311(10):623-629.
11. Klahr S, Levey AS, Beck GJ, et al. The effects of dietary protein restriction and blood-pressure control on the progression of chronic renal disease. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *N Engl J Med.* 1994;330(13):877-884.
12. Malvy D, Maingourd C, Pengloan J, Bagros P, Nivet H. Effects of severe protein restriction with ketoanalogues in advanced renal failure. *J Am Coll Nutr.* 1999;18(5):481-486.
13. Mircescu G, Garneata L, Stancu SH, Capusa C. Effects of a supplemented hypoproteic diet in chronic kidney disease. *J Ren Nutr.* 2007;17(3):179-188.
14. Shah AP, Kalantar-Zadeh K, Kopple JD. Is there a role for ketoacid supplements in the management of CKD? *Am J Kidney Dis.* 2015 May;65(5):659-73
15. Nahas ME, Khwaja A. Epidemiology, Natural History, and Pathophysiology of Chronic Kidney Disease. In: Johnson RJ, Feehally J, Floege J, editors. *Comprehensive Clinical Nephrology.* 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Elsevier;2015. p.916-930
16. Taal MW. Adaptation to Nephron Loss and Mechanisms of Progression in Chronic Kidney Disease. In: Skorecki K; Chertow GM; Marsden PA; Taal MW; Yu A, editors. *Brenner & Rector's The Kidney.* 10<sup>th</sup> Edition. Philadelphia: Elsevier, 2016.p.1736-1779

17. Bao YW, Yuan Y, Chen JH, Lin WQ. Kidney disease models: tools to identify mechanisms and potential therapeutic targets. *Zoological Research* 2018 39(2): 72-86. doi: 10.24272/j.issn.205.8137.2017.055
18. Jefferson JA, Johnson RJ. Experimental mesangial proliferative glomerulonephritis (the anti-Thy-1.1 model). *Journal of Nephrology* 1999. Sep-Oct; 12(5):297-307
19. Salvadori M, Rosso G, Bertoni E. Update on ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation: Pathogenesis and treatment. *World Journal of Transplantation* 2015; 5:52.
20. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 1988;255:H1269-H75.
21. Schoenberg M, Fredholm B, Haglund U, et al. Studies on the oxygen radical mechanism involved in the small intestinal reperfusion damage. *Acta Physiologica Scandinavica* 1985; 124:581-9.
22. Welbourn C, Goldman G, Paterson I, Valeri C, Shepro D, Hechtman H. Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. *British Journal of Surgery* 1991; 78:651-5.
23. Dorweiler B, Pruefer D, Andradi TB, et al. Ischemia-reperfusion injury. *European Journal of Trauma and Emergency Surgery* 2007; 33:600-12
24. Takada M, Nadeau KC, Shaw GD, Marquette KA, Tilney NL. The cytokine-adhesion molecule cascade in ischemia/reperfusion injury of the rat kidney. Inhibition by a soluble P-selectin ligand. *Journal of Clinical Investigation* 1997; 99:2682
25. Friedewald JJ, Rabb H. Inflammatory cells in ischemic acute renal failure. *Kidney International* 2004; 66:486-91

26. Wei Q, Dong Z. Mouse model of ischemic acute kidney injury: technical notes and tricks. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 2012;303: F1487-F94
27. Prieto-Moure B, Llori-Carsi JM, Belda-Antoli M, Toledo-Pereyra LH, Cejalvo-Lapeña D. Allopurinol protective effect of renal ischemia by downregulating TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 response. *J Invest Surg.* 2017; 30(3): 143-151. doi: 10.1080/08941939.2016.1230658
28. Kanno M, Nakayama M, Zhu WJ, Hayashi Y, Kazama JJ. Rosuvastatin pretreatment suppresses distant organ injury following unilateral renal ischemia-reperfusion in hypertensive Dahl salt-sensitive rats. *Nephrology (Carlton).* 2017 Sep 22. doi: 10.1111/nep.13169.
29. Ziypak T, Halici Z, Alkan E, Akpinar E, Polat B, Adanur S, et al. Renoprotective effect of aliskiren on renal ischemia/reperfusion injury in rats: electron microscopy and molecular study. *Ren Fail.* 2015 Mar; 37(2):343-54. doi: 10.3109/0886022X.2014.991327.
30. Korkmaz A, Kolankaya D. Protective effect of rutin on the ischemia/reperfusion induced damage in rat kidney. *J Surg Res.* 2010;164(2):309-315. doi: 10.1016/j.jss.2009.03.022
31. Wasung ME, Chawla LS, Madero M. Biomarkers of renal function, which and when? *Clin Chim Acta* 2015Jan 1; 438:350-357
32. Weinert LS, Camargo EG, Soares AA, Silverio SP. Glomerular filtration rate estimation: performance of serum cystatin C-based prediction equations. *Clin Chem Lab Med.* 2011 Nov;49(11):1761-71
33. NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.  
<http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/bioterio.NOM-062.pdf>

34. Collins AJ, Couser WG, Dirks JH, Kopple JD, Reiser T, Riella MC, et al. World Kidney Day: An idea whose time has come. *Kidney Int* 2006;69(5): 781-2. doi: 10.1038/sj.ki.5000250
35. Eddy AA. Molecular insights into renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 1996;7(12): 2495–508.
36. Garneata L, Mircescu G. Effect of low-protein diet supplemented with keto acids on progression of chronic kidney disease. *J Ren Nutr*. 2013 May;23(3):210-2133. doi: 10.1053/j.jrn.2013.01.030
37. Gao X, Wu J, Dong Z, Hua C, Hu H, Mei C. A low-protein diet supplemented with ketoacids plays a more protective role against oxidative stress of rat kidney tissue with 5/6 nephrectomy than a low-protein diet alone. *Br J Nutr*. 2010;103(4),608–16. doi: 10.1017/S0007114509992108
38. Peng H, Mao Y, Fu X , Feng Z, Xu J. Comparison of biomarkers in rat renal ischemia-reperfusion injury. *Int J Clin Exp Med* 2015;8(5):7577-84.
39. Li HY, Hou FF, Zhang X, Chen PY, Liu SX, Feng JX, et al. Advanced Oxidation Protein Products Accelerate Renal Fibrosis in a Remnant Kidney Model. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18(2):528–38, 2007. doi: 10.1681/ASN.2006070781
40. Zhang Y, Huang J, Yang M, Gu L, Ji J, Wang W, et al. Effect of a low-protein diet supplemented with keto-acids on autophagy and inflammation in 5/6 nephrectomized rats. *Biosci Rep*. 2015 Sep 14; 35(5) e00263. doi:10.1042/BSR20150069
41. Chen W, Guo ZY, Wu H, Sun LJ, Cai LL, Xu HY. [Effects of low-protein diet plus alpha-keto acid on micro-inflammation and the relationship between micro-inflammation and nutritional status in patients performing continuous ambulatory peritoneal dialysis: a randomized controlled trial]. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*. 2008;6(5):473-7. Chinese. doi: 10.3736/jcim20080508

42. Rabadi MM, Ghaly T, Goligorsky MS, Ratliff BB. HMGB1 in renal ischemic injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012;303(6): F873-85. doi: 10.1152/ajprenal.00092.2012
43. Chung KY, Park JJ, Kim YS. The role of high-mobility group box-1 in renal ischemia and reperfusion injury and the effect of ethyl pyruvate. *Transplant Proc.* 2008;40(7):2

## **RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO**

Concepción Sánchez Martínez

Candidato para el Grado de Doctorado en Medicina

Tesis: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA Y ANTIOXIDANTE DE LOS ANÁLOGOS DE AMINOÁCIDOS ESENCIALES CONTRA EL DAÑO POR ISQUEMIA/REPERFUSIÓN RENAL EN RATAS WISTAR

Campo de Estudio: Ciencias de la salud.

Biografía:

Datos personales:

Nacida en la Ciudad de Monterrey, Nuevo León, el 19 de Junio de 1973, hija de Rogelio Sánchez Livas<sup>†</sup> y Elena Martínez Hernández<sup>†</sup>

Educación:

Egresada de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L en 1995, obteniendo el título de Médico, Cirujano y Partero.

Egresada de la Especialidad de Medicina Interna del Hospital Universitario U.A.N.L. en el 2001.

Egresada de la sub-especialidad de Nefrología del Hospital Universitario U.A.N.L. en el 2004