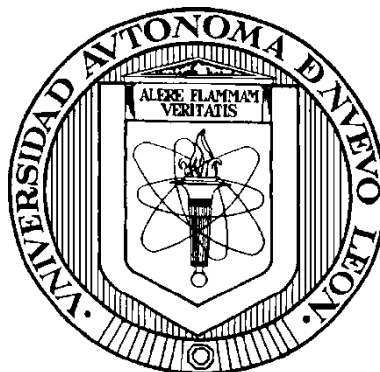


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**Facultad de Medicina**



**OBTENCIÓN DEL PERFIL METABÓLICO POR RMN DEL EFECTO  
NEFROPROTECTOR DE LA LOPERAMIDA CONTRA EL DAÑO POR  
ISQUEMIA-REPERFUSIÓN EN RATAS WISTAR**

**Por**

**Gustavo Rafael Govea Torres**

**Como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias con  
orientación en Química Biomédica**

**AGOSTO 2022**

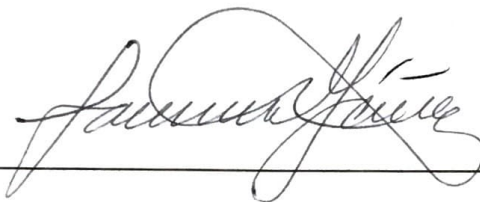
**OBTENCIÓN DEL PERFIL METABÓLICO POR RMN DEL EFECTO  
NEFROPROTECTOR DE LA LOPERAMIDA CONTRA EL DAÑO POR  
ISQUEMIA-REPERFUSIÓN EN RATAS WISTAR**

Aprobación de Tesis:



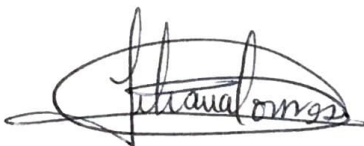
---

**Dra. C. Paula Cordero Pérez**  
**Directora de Tesis**



---

**Dra. C. Alma Leticia Saucedo Yáñez**  
**Co-Directora de Tesis**



---

**Dra. C. Liliana Torres González**  
**Miembro de la comisión**



---

**Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez**

**Subdirector de Estudios de Posgrado**

## **DEDICATORIA**

A mis padres Perla Maribel Torres Cervantes y Gustavo Govea Martínez.

A mis hermanos Omar Espino y Tony Torres que estuvieron al pendiente para brindarme todo su apoyo.

A mis amigos Adolfo Gómez y Roberto Ruiz porque su amistad siempre fue incondicional.

A Andrea Garza que estuvo conmigo en gran parte de este difícil camino y me impulsó a darlo todo en esta etapa de mi vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. C. Paula Cordero Pérez que fungió como mi directora.

A la Dra. C. Alma Leticia Saucedo Yañéz que fungió como mi co-directora.

A la Dra. C. Liliana Torres González por formar parte del comité de tesis.

Al QCB Miguel de la Rosa y al QCB Daniel Garza por su valioso apoyo en mis experimentos.

Al QFB Carlos Jiménez por estar hasta en los momentos más difíciles en el desarrollo del presente trabajo.

A los becarios, profesores y personal de la Unidad de Hígado por su apoyo y hacer muy amena mi estancia en el departamento durante el desarrollo del presente trabajo.

## **RESUMEN**

**Gustavo Rafael Govea Torres**

**Fecha de graduación: 2022**

**Universidad Autónoma de Nuevo León**

**Facultad de medicina**

**Título del estudio:** Obtención del perfil metabólico por RMN del efecto nefroprotector de la loperamida contra el daño por isquemia-reperfusión en ratas Wistar

**Número de páginas:** 109

**Candidato para el grado de Maestro en Ciencias**

**Área de Estudio:** Ciencias de la Salud

**Propósito y Método del Estudio:** El daño por isquemia-reperfusión (IR) se manifiesta cuando se restringe el suministro de sangre a un órgano y es posteriormente reperfundido. Este proceso puede comprometer la viabilidad de un injerto y afectar en la salud del paciente trasplantado. La búsqueda de tratamientos y biomarcadores oportunos de rechazo puede conducir a incrementar la viabilidad del injerto en un trasplante al disminuir la lesión por IR y a reducir el consecuente riesgo.

Se utilizaron ratas Wistar macho adultas, las cuales se sometieron a IR renal bilateral de 30, 60 y 45 minutos de isquemia con 15 horas de reperfusión (n=6). Se evaluaron 2 grupos pretratados con loperamida (LP) con una dosis de 10 mg/kg/24 horas durante 3 días y posteriormente se sometieron a IR con 45

minutos (LP+IR45) y 60 minutos (LP+IR60) de isquemia, y 15 horas de reperfusión (n=6). Se obtuvieron muestras de suero y tejido renal. Se determinaron marcadores bioquímicos asociados al daño renal y hepático, marcadores proinflamatorios, marcadores de estrés oxidativo, marcadores moleculares asociados al daño por IR, histopatología y la obtención del perfil metabólico por RMN.

**Contribuciones y Conclusiones:** Se demostró la actividad nefroprotectora de la LP solo a los 45 minutos de isquemia. A los tiempos de IR evaluados no se logró evidenciar la participación de los mediadores de inflamación, de autofagia, ni de estrés oxidativo ya que solo los antioxidantes totales permitieron diferenciar al grupo CS de los de IR. El perfil metabólico por RMN identificó 26 metabolitos séricos en los grupos sometidos a daño, con y sin tratamiento. De los cuales 14 pudieron ser cuantificados. Los metabolitos que permitieron diferenciar al CS de los grupos IR fueron: alantoína, glutamina, N,N-dimetilglicina y piruvato. Sólo la alantoína permitió diferenciar al grupo IR vs LP+IR45. Los metabolitos que permitieron diferenciar CS del grupo LP+IR60 fueron: alanina, valina, lactato y citrato, estos han sido descritos como marcadores de daño renal lo que sugiere que la LP no protegió contra el daño por IR a los 60 minutos de isquemia.

FIRMA DEL ASESOR: \_\_\_\_\_



## TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. Introducción.....	1
1.1. Isquemia-reperfusión.....	1
1.2. IR renal.....	5
1.3. Estrategias terapéuticas contra la IR.....	9
1.4. Autofagia y daño por IR.....	10
1.5. RMN y perfilado metabólico.....	12
1.6. Planteamiento del problema.....	20
1.7. Justificación.....	21
1.8. Objetivos.....	22
1.8.1. Objetivo general.....	22
1.8.2. Objetivos específicos.....	22
2. Materiales y métodos.....	23
2.1. Clasificación del estudio.....	23
2.2. Diseño del estudio.....	23
2.3. Población del estudio.....	25
2.4. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.....	26
2.4.1. Criterios de inclusión.....	26
2.4.2. Criterios de exclusión.....	26
2.4.3. Criterios de eliminación.....	27
2.5. Cálculo del tamaño de la muestra.....	27

2.6. Materiales y equipo.....	28
2.6.1. Material quirúrgico.....	28
2.6.2. Anestésicos.....	28
2.6.3. Consumibles.....	29
2.6.4. Reactivos.....	29
2.6.5. Instrumentos.....	30
2.7. Desarrollo experimental.....	31
2.7.1. Inducción de daño renal por IR	31
2.7.2. Toma de muestras.....	33
2.7.3. Determinación de marcadores bioquímicos.....	34
2.7.4. Determinación de marcadores proinflamatorios....	34
2.7.5. Determinación de marcadores de estrés oxidativo.....	35
2.7.6. Expresión de genes relacionados al daño por IR renal por RT qPCR.....	36
2.7.7. Análisis histológico.....	40
2.7.8. Cuantificación de proteínas en homogenizados de tejido.....	41
2.7.9 Identificación de metabolitos séricos por RMN.....	42
2.7.10. Cuantificación de metabolitos.....	44
2.7.11 Análisis estadístico.....	45
3. Resultados.....	46



3.1 Estandarización del modelo de IR renal.....	46
3.2 Marcadores bioquímicos, estrés oxidativo, proinflamatorios, expresión de genes e histología.....	50
3.2.1 Marcadores bioquímicos.....	50
3.2.2 Marcadores de estrés oxidativo.....	54
3.2.3 Marcadores proinflamatorios.....	57
3.2.4 Marcadores moleculares.....	59
3.2.5 Análisis histológico.....	63
3.3 Perfil metabólico.....	65
4. Discusión.....	76
5. Conclusiones.....	89
6. Perspectivas.....	90
Referencias.....	91
Anexo 1.....	108

## Lista de tablas

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
I	Primers utilizados en la RT-qPCR.	38
II	Elaboración de la mezcla para la reacción de RT-qPCR.	39
III	Programación de la PCR.	40
IV	Escala de Kobuchi para la evaluación histológica del daño renal.	41
V	Condiciones de adquisición de los espectros de RMN <sup>1</sup> H.	43
VI	Lista de metabolitos cuantificados en las muestras de suero de los diversos grupos de estudio.	70

## Lista de figuras

Figura		Página
1	Actividad de la enzima xantina en su forma a) deshidrogenasa y b) oxidasa.	3
2	Trasplantes de riñón realizados en el período de 2007-2021.	8
3	Número de trasplantes de riñón según el tipo de donante, período 2007-2021.	9
4	Vía simplificada de la autofagia.	11
5	Esquema del momento magnético y los niveles de energía para un núcleo con un número cuántico de espín de $\frac{1}{2}$	14
6	Espectros de $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz, 10% D <sub>2</sub> O) obtenidos a partir de una muestra de suero humano A) NOESY presat, B) CPMG presat.	17
7	Estrategia general del desarrollo y evaluación de los diferentes grupos de investigación.	23
8	Concentraciones séricas A) Creatinina, B) BUN, en los diversos grupos de estudio.	47
9	Imágenes representativas de los parámetros evaluados para el estudio histológico en los diferentes grupos. Las imágenes fueron observadas en un aumento de 40x.	48
10	Hallazgos histológicos A) Necrosis tubular aguda, B) Cilindros proteicos, C) Congestión medular, en los diferentes grupos de estudio.	49
11	Marcadores bioquímicos de daño renal en grupos con 45 minutos de isquemia.	51
12	Marcadores bioquímicos de daño renal en grupos con 60 minutos de isquemia.	52
13	Marcadores bioquímicos de daño hepático en los grupos con 45 minutos de isquemia.	53
14	Marcadores bioquímicos de daño hepático en grupos con 60 minutos de isquemia.	54
15	Concentraciones séricas de antioxidantes totales.	55

16	Determinación indirecta de la actividad de SOD.	56
17	Niveles de MDA en homogeneizados de tejido renal en los diferentes grupos de estudio.	57
18	Citocinas proinflamatorias en los grupos con 45 minutos de isquemia.	58
19	Citocinas proinflamatorias en los grupos con 60 minutos de isquemia.	58
20	Expresión de genes relacionados con el proceso de autofagia en los diferentes grupos de estudio	60
21	Expresión de genes relacionados al proceso inflamatorio en los grupos de estudio.	61
22	Expresión de GPX en los diferentes grupos de estudio.	62
23	Imágenes representativas de los diferentes grupos de estudio donde se destaca la presencia de NTA.	63
24	Evaluación histológica en los grupos con 45 minutos de isquemia.	64
25	Evaluación histológica en los grupos con 60 minutos de isquemia.	65
26	Recopilación de los 30 espectros obtenidos de las muestras de suero de los diversos grupos de estudio.	66
27	Identificación de los 26 metabolitos en el programa Chenomx de una rata del grupo IR60.	67
28	Espectros <sup>1</sup> H-RMN representativos de cada grupo experimental.	68
29	Ejemplo de integración de las señales de algunos metabolitos cuantificados.	69
30	Señal del grupo metilo del lactato con deconvolución	71
31	Metabolitos cuantificados en los grupos con 45 minutos de isquemia	73
32	Metabolitos cuantificados en los grupos con 60 minutos de isquemia	75

## Lista de abreviaturas

<b>Abreviatura</b>	<b>Definición</b>
ALT	Alanina aminotransferasa
AST	Aspartato aminotransferasa
BUN	Nitrógeno de la urea
CENATRA	Centro Nacional de Trasplantes
CM	Congestión medular
CP	Cilindros proteicos
CPMG	Carr purcell meiboon gill
ERC	Enfermedad renal crónica
FA	Fosfatasa alcalina
g	Gramos
h	Horas
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IR	Isquemia-Reperfusión
LDH	Lactato deshidrogenasa
MDA	Malondialdehído
MHz	Megahertz
Min	Minutos
NTA	Necrosis tubular aguda
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMNc	Resonancia magnética nuclear cuantitativa
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
s	Segundos
SOD	Superóxido dismutasa
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa



# CAPÍTULO I

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Isquemia-reperfusión

La isquemia es un término para referirse a la interrupción del flujo sanguíneo y la consecuente disminución en el aporte de oxígeno y nutrientes a los tejidos. Mientras que la reperfusión consiste en restaurar la circulación sanguínea al tejido sometido previamente a la isquemia. Tanto la isquemia como la reperfusión tienen una contribución al daño en el tejido afectado, sin embargo, la reperfusión tiene un efecto paradójicamente importante en el daño que exagera la lesión ocasionada por la isquemia. Por lo tanto, la isquemia-reperfusión (IR) tiene un efecto importante en el daño y disfunción celular (Kalogeris, Baines, Krenz, & Korthuis, 2012).

Pese al efecto que tiene la etapa de reperfusión en el daño por IR, la duración del tiempo de isquemia es muy importante como se ha podido comprobar en el caso del hígado donde se ha evidenciado que la duración de la isquemia es directamente proporcional a los niveles plasmáticos de alanina aminotransferasa (ALT) y al grado de necrosis en modelos de IR hepáticos en ratones (Olthof et al., 2017). De igual manera, la duración del tiempo de isquemia es relevante en otros órganos como en el riñón donde se ha observado que la necrosis tubular aguda (NTA) es notable principalmente

cuando los tiempos de isquemia sobrepasan los 30 minutos(Iglesias, Núñez, Fernández, Salgueiro, & Febles, 2011).

Durante la IR ocurren muchos procesos que modifican el entorno homeostático celular, como la disminución del pH, debido en gran parte por el metabolismo anaeróbico a consecuencia de la isquemia(Prathapasinghe, Siow, Xu, & Karmin, 2008). Por otro lado, hay modificaciones moleculares como en la enzima xantina deshidrogenasa que sufre un cambio conformacional para dar lugar a la xantina oxidasa que tiene un papel muy importante en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés); esto ocurre a consecuencia de que la xantina oxidasa utiliza oxígeno para catalizar las reacciones metabólicas, en las cuales también participa en su forma deshidrogenasa, al dar lugar a la formación de xantina y ácido úrico a partir de hipoxantina(Granger, 2017). La depleción (disminución) del adenosín trifosfato (ATP) induce la generación de ROS porque va de la mano con la actividad de la xantina oxidasa. Esto se debe a la depleción del ATP que genera un aporte importante de hipoxantina, que posteriormente llegará a un punto en donde se acumule por la falta de oxígeno después de un tiempo prolongado de isquemia. Una vez lograda la etapa de reperfusión, esto provocará que grandes cantidades de oxígeno entren al ambiente celular reactivando a la xantina oxidasa y tendrá como consecuencia la producción de ROS en grandes cantidades como el superóxido, ácido hipocloroso, peróxido de hidrógeno, etc., que causan daño a nivel de organelos, enzimas, material genético y



membranas celulares dando como resultado la producción de malondialdehído (MDA) por la peroxidación de los lípidos de membrana (Su et al., 2020). Para contrarrestar el grave efecto de ROS, participan diversas líneas de defensa antioxidante del organismo como las enzimas superóxido dismutasa (SOD) que convierte el superóxido a peróxido de hidrógeno, y las peroxidasa que convierten el peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno. En la Figura 1 se muestra un esquema de la actividad enzimática asociada a la enzima xantina (Bugger & Pfeil, 2020; Dobashi, Ghosh, Orak, Singh, & Singh, 2000).

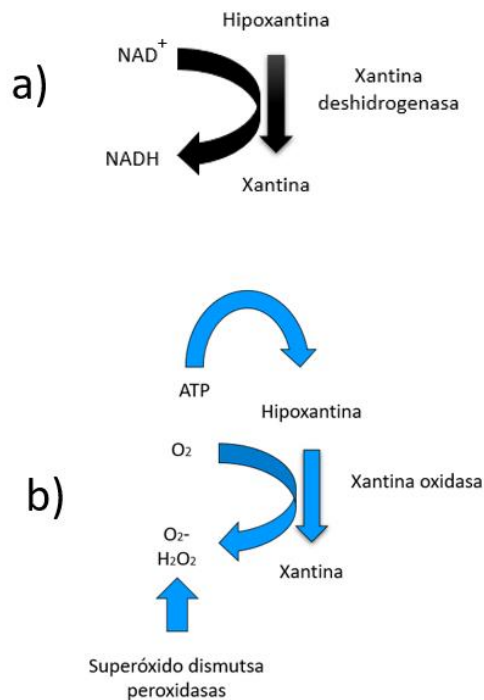


Figura 1. Actividad de la enzima xantina en su forma a) deshidrogenasa y b) oxidasa.

La presencia de ROS también tiene un rol importante en el desarrollo de un ambiente proinflamatorio al promover la formación del inflamasoma NLRP3 que posteriormente activa la caspasa-1 y que a su vez escinde el precursor pro-IL-1 $\beta$  para formar la interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). Durante la reperfusión, el flujo sanguíneo hacia el tejido previamente sometido a la isquemia se recupera lentamente debido a un proceso denominado "fenómeno de no reflujo" que se relaciona con la inflamación en las células endoteliales y por una oclusión intravascular por la presencia de leucocitos y plaquetas. La interrupción del flujo sanguíneo acondiciona a las células endoteliales para la activación por citocinas proinflamatorias y para permitir, posteriormente, la adhesión y migración de los leucocitos. La inflamación es un proceso necesario que tiene como objetivo la reparación y regeneración de las células dañadas, así como la liberación de quimiocinas para la proliferación celular y la angiogénesis. Desafortunadamente, durante la IR se liberan ROS y otras sustancias como proteasas, que vuelven perjudiciales los efectos en la inflamación presentados durante la IR. Debido al desequilibrio en los procesos inflamatorios, esto provoca que los efectos de dichos procesos sean excesivos como ha sido reportado por Slegtenhorst, et al(Slegtenhorst, Dor, Rodriguez, Voskuil, & Tullius, 2014).

Los neutrófilos, monocitos, macrófagos, entre otras células del sistema inmune, contribuyen al desarrollo del entorno proinflamatorio. Además, se activan rutas como la del factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) que induce la

producción de citocinas proinflamatorias como la interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). En cuanto a la participación del complemento, se cree que la vía clásica, la vía alternativa así como la lectina participan en el proceso de IR, uno de los componentes fundamentales de la conocida respuesta inmunitaria defensiva ante un agente hostil(Farrar, Asgari, Schwaeble, & Sacks, 2012). En el riñón las células tubulares epiteliales participan activamente en el comienzo de la respuesta inflamatoria, dado que en estas células se sintetiza C3 que contribuye a la lesión mediada por el complemento(Thurman, 2007).

## **1.2 La isquemia-reperfusión renal**

En la IR renal hay una contribución hacia el desarrollo de la insuficiencia renal aguda debido a los procesos multifactoriales involucrados en la lesión por IR como la generación de las ROS y las citocinas proinflamatorias que conlleva al daño celular en el riñón. Este problema se manifiesta en varias situaciones médicas y quirúrgicas, que dan lugar al desarrollo de la NTA(Chatterjee, 2007).

La necesidad de un trasplante se convierte muchas veces en el único recurso para reemplazar el órgano o tejido que ya no es capaz de desempeñar sus funciones. En el caso del riñón que es un órgano fundamental para la homeostasis del organismo, dichas funciones son vitales. El trasplante renal es una situación donde se requiere especial atención por el desarrollo y la

subsecuente lesión por IR debido a que se trata de un proceso inherente al trasplante. Este efecto influye directamente en la función retardada del injerto caracterizada por oliguria o por la necesidad de diálisis durante los primeros 7 días después del trasplante, y a su vez esto puede comprometer la vida del receptor(Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, 2004; Claudio Ponticelli, 2014). Desafortunadamente, uno de los factores asociados que conllevan a la necesidad de un trasplante renal que tiene un gran impacto a nivel mundial como es el desarrollo de la enfermedad renal crónica (ERC). La ERC es definida como una anomalía en la función o estructura del riñón que provoca una tasa de filtración glomerular menor a  $60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$  o una albuminuria menor o igual a 30 mg por 24 horas persistente durante >3 meses. La ERC puede evolucionar en la mayoría de los casos hacia una etapa terminal donde el único tratamiento para los pacientes es la diálisis o el trasplante de riñón(Chen, Knicely, & Grams, 2019; Walther, Podoll, & Finkel, 2014). A nivel mundial las principales causas del desarrollo de la ERC son la diabetes mellitus y la hipertensión lo que aporta una mayor relevancia a este problema por la prevalencia de dichas enfermedades(Chen et al., 2019). La diabetes ha tenido un incremento de 108 millones de personas con la enfermedad en 1980 a 422 millones en el 2014, mientras que la hipertensión arterial afecta más del 30% de la población mundial adulta(“Día Mundial de la Hipertensión 2020 - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud,” n.d.; “Diabetes,” n.d.).

El informe del Observatorio Global sobre Donación y Trasplantes del 2019 indicó que se realizaron alrededor de 109 mil trasplantes de riñón a nivel mundial. En países como Estados Unidos hay una enorme brecha entre los órganos disponibles y la demanda de ellos, por lo que en este país la lista de espera para agosto de 2017 era de 116,000 personas, sin embargo en 2016 se registraron 41,335 trasplantes realizados (“Transplantation - World Kidney Day,” n.d.). En México, la lista de receptores en espera de un trasplante de riñón en el primer semestre del 2021 corresponde a 16,801. De hecho, el trasplante renal encabeza la lista con el mayor número de receptores en espera de un trasplante de órgano, seguido de 5,812 receptores en espera de un trasplante de córnea. Desafortunadamente, son pocos los trasplantes de riñón que se realizan al año, además es muy desalentadora la drástica baja en los trasplantes en los últimos años, ya que en el año 2019 se realizaron 2986 trasplantes de riñón mientras que en el 2020 únicamente se realizaron 914 trasplantes (lo cual puede deberse a los problemas asociados a la pandemia de COVID-19), y, para el 2021 se realizaron 1971 trasplantes. En la Figura 2, se muestra un gráfico histórico del número de trasplantes renales en nuestro país. Por otra parte, pese al decremento en los trasplantes renales, el número de donadores vivos se ha mantenido por encima del número de donadores cadavéricos en la última década, como se muestra en la Figura 3 (“Estadísticas | Centro Nacional de Trasplantes | Gobierno | gob.mx,” n.d.). Siendo la IR la principal causa de rechazo al injerto postrasplante, la búsqueda de estrategias

quirúrgicas o farmacologías han sido de interés por varios grupos de investigación a nivel mundial para tratar de disminuir esta lesión(Chatterjee, 2007; C. Ponticelli, 2014).

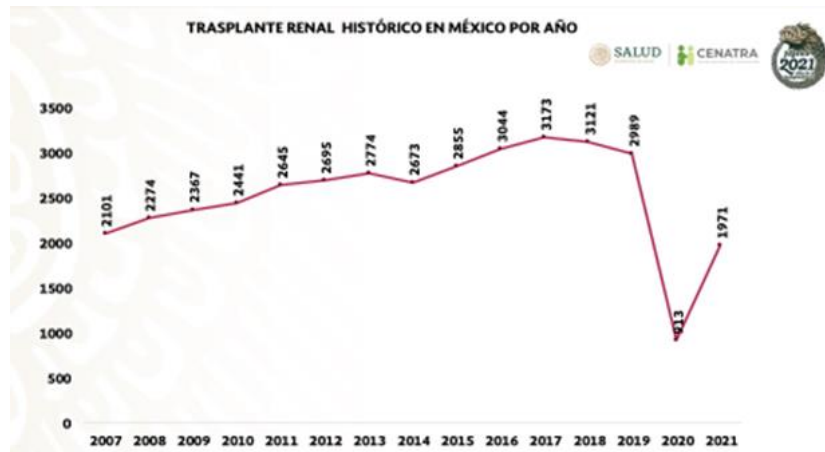


Figura 2. Trasplantes de riñón realizados en el período de 2007-2021(“Estadísticas | Centro Nacional de Trasplantes | Gobierno | gob.mx,” n.d.).

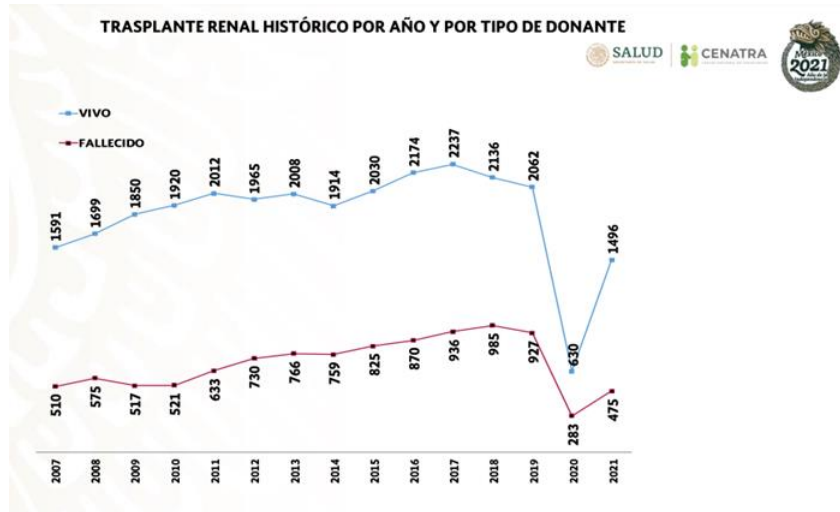


Figura 3. Número de trasplantes de riñón según el tipo de donante, período 2007-2021(“Estadísticas | Centro Nacional de Trasplantes | Gobierno | gob.mx,” n.d.).

### 1.3 Estrategias terapéuticas contra la lesión por IR

En la búsqueda de estrategias para atenuar las lesiones ocasionadas por IR, existen técnicas como el preconditionamiento isquémico, que consiste en breves periodos alternados de isquemia y reperfusión, que hacen que un órgano sea tolerante a la posterior isquemia prolongada. Existe evidencia reportada en estudios en animales donde se determinó que 15 minutos de isquemia caliente y 10 minutos de reperfusión en el riñón son tiempos adecuados para el preconditionamiento isquémico(Torras et al., 2002). También existe el preconditionamiento isquémico remoto que se realiza mediante la inducción de una isquemia breve de una extremidad que también

puede reducir el impacto del daño por IR, el cual ya fue evaluado en un modelo murino(Warlé et al., 2013). Sin embargo, actualmente diversos grupos de investigación exploran otras estrategias como el estudio de fármacos con potencial actividad protectora contra el daño por IR, aunque son pocos los estudios que se encuentran en la etapa clínica de desarrollo(Salvadori, Rosso, & Bertoni, 2017). Dentro de las estrategias farmacológicas, se encuentran los fármacos inductores de la autofagia(Decuypere et al., 2015).

#### **1.4 Autofagia y daño por IR**

La autofagia (“comerse a sí mismo”), término acuñado por Duve y Wattiaux en 1966, es un proceso catabólico presente en todos los organismos eucariotes(De Duve, 1966). Este proceso consiste en una serie de pasos definidos donde se secuestran componentes citoplasmáticos como organelos y proteínas los cuales serán degradados al interior de unas estructuras membranosas conocidas como autolisosomas. El proceso comienza con la nucleación de una membrana que se va a alargar y posteriormente va a envolver una porción del citoplasma que contendrá algún componente a degradar, cuando esta membrana se cierra, forma una vesícula de doble membrana conocida como autofagosoma la cual en un paso posterior se va a fusionar con un lisosoma del citoplasma para formar una estructura conocida como autolisosoma, que conlleva a que el material secuestrado inicialmente en el autofagosoma sea expuesto a las hidrolasas lisosomales lo que conlleva a la descomposición del material en constituyentes como aminoácidos y ácidos



grasos(B. Levine & Kroemer, 2008; Mizushima, Levine, Cuervo, & Klionsky, 2008). La autofagia tiene un papel muy importante en mantener la homeostasis celular y la adaptación a varias situaciones de estrés, incluida la limitación de nutrientes, estrés oxidativo, ROS, hipoxia o acumulación de agregados de proteínas u orgánulos dañados(Gottlieb & Mentzer, 2010; Vakifahmetoglu-norberg, Xia, Vakifahmetoglu-norberg, Xia, & Yuan, 2015). En la Figura 4 se muestra un esquema general de los procesos celulares llevados a cabo en el proceso de autofagia.

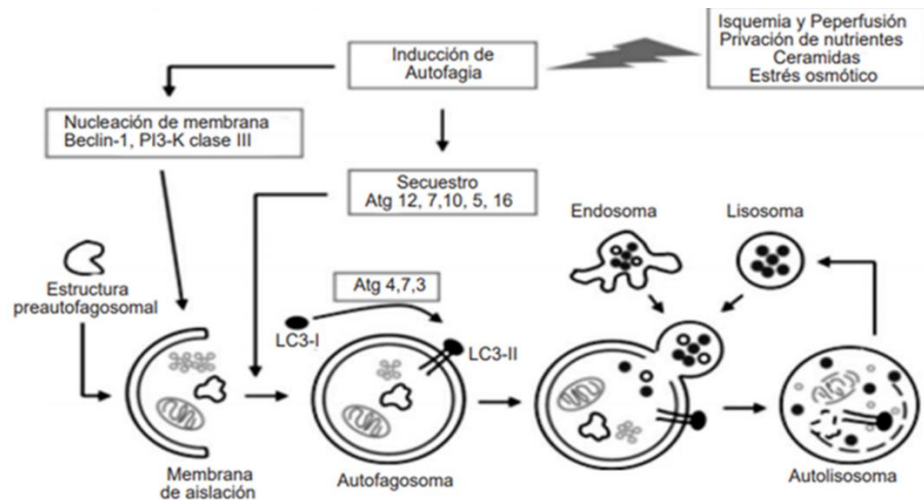


Figura 4. Vía simplificada de la autofagia(Aránguiz Urroz et al., 2006).

La autofagia presenta una contribución en la protección contra el daño por IR, debido a que compensa deficiencias que ocurren dentro de la célula, como la reducción de la actividad del proteosoma por el proceso de isquemia, el cual es contrarrestado por la inducción de la autofagia al mantener la proteólisis en un nivel apropiado. Además de compensar la crisis energética con la generación de ATP, mediante el reciclado de ácidos grasos libres y de los

aminoácidos producidos durante la autofagia(Ma, Wang, Chen, & Cao, 2015). Por otro lado, dado que las mitocondrias tienen un papel importante en la señalización proinflamatoria y debido a que éstas son dañadas en la IR, la mitofagia (autofagia de las mitocondrias) elimina las mitocondrias disfuncionales o dañadas, amortiguando la inflamación(Green, Galluzzi, & Kroemer, 2011). Se han descritos fármacos inductores de la autofagia como la rapamicina, carbamazepina, loperamida (LP), entre otros(Shen et al., 2018; Zhang et al., 2017).

La LP es un agonista de los receptores opioides, en el plexo mientérico disminuye el tono de los músculos lisos longitudinales y circulares de la pared intestinal. Dicho fármaco, tiene una actividad adicional como un inductor de la autofagia y ha demostrado tener una actividad cardioprotectora en un modelo de hipoxia-reperfusión *in vitro* logrando la protección de los cardiomiocitos contra la apoptosis inducida por hipoxia/desoxigenación y la producción de ROS(Shen et al., 2018). Nuestro grupo de trabajo ha logrado demostrar que la LP presenta un efecto nefroprotector con el daño por IR, y es por ello en el presente trabajo se plantea analizar con mayor profundidad el efecto nefroprotector de este fármaco.

## 1.5 RMN y perfilado metabólico

La metabolómica es la disciplina que se encarga de identificar y cuantificar los metabolitos endógenos y exógenos que permiten conocer el estado energético, oxidativo, reproductivo y anabólico de un organismo. Dichos metabolitos se pueden determinar en diferentes muestras biológicas como orina, suero, saliva, etc mediante métodos de estadística multivariable. Los metabolitos son componentes cruciales del sistema biológico y son altamente informativos sobre el estado funcional de dichos sistemas, debido a la cercanía a los puntos finales funcionales y a los fenotipos del organismo. La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), junto a la espectrometría de masas, son las principales plataformas analíticas para llevar a cabo los estudios metabolómicos.(Smolinska, Blanchet, Buydens, & Wijmenga, 2012).

La espectroscopía de RMN ha sido ampliamente utilizada para la elucidación estructural de compuestos químicos, ya que de forma simultánea proporciona información cualitativa y cuantitativa de las moléculas(Simmler, Napolitano, McAlpine, Chen, & Pauli, 2014). El fenómeno de RMN consiste en determinar la absorción de la radiación electromagnética (en la región de las radiofrecuencias) por parte de los núcleos cuando se exponen a un campo magnético intenso ( $B_0$ ). En el caso de átomos como el  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , tiene un número cuántico de espín de  $\frac{1}{2}$ , que, cuando se someten a un campo magnético, hace que los momentos magnéticos de los núcleos se orienten en

dos direcciones posibles respecto  $B_0$ , de tal modo que algunos se orientan a favor del campo magnético ( $+\frac{1}{2}$ ) que corresponde al estado de menor energía, y otros núcleos se orientarán en contra de  $B_0$ , es decir, en el estado de mayor energía ( $-\frac{1}{2}$ ) como se muestra en la figura 5a. De forma general, los núcleos se orientarán de forma que predomine el estado de menor energía. Para llevar a cabo el proceso de la absorción de la radiación, se deben irradiar los núcleos de tal manera que la frecuencia de la radiación corresponda a la diferencia de energía entre los estados de menor energía y mayor energía de los núcleos, con la finalidad de llevar a los núcleos del estado de menor energía al de mayor energía (figura 5b). Una vez que se deja de aplicar la radiación, los núcleos al regresar a su estado de menor energía tendrán un movimiento de precesión a una frecuencia que es característica de cada núcleo y generarán una señal conocida como señal de resonancia, (Skoog, Holler, & Crouch, 2008).

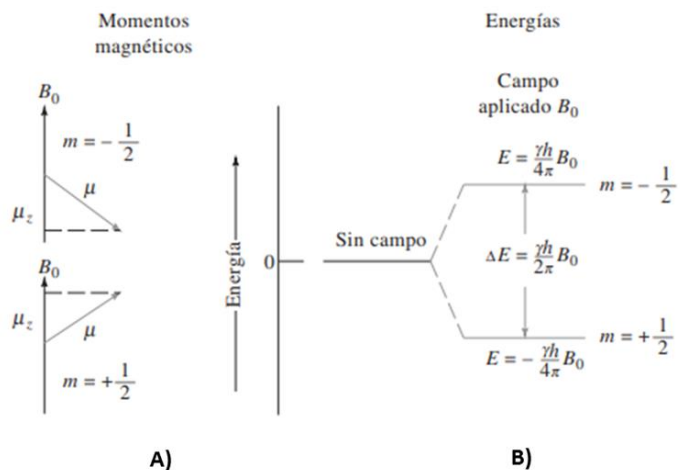


Figura 5. Esquema del momento magnético y los niveles de energía para un núcleo con un número cuántico de espín de  $\frac{1}{2}$ . (Skoog et al., 2008)

La RMN cuantitativa (RMNc), la rama analítica de la RMN se destaca por tener ventajas frente a otras técnicas analíticas como una preparación simple de la muestra a analizar, la posibilidad de recuperar la muestra que fue analizada, y que la cuantificación se puede hacer utilizando como estándar interno un compuesto inerte, estable y con un grado alto de pureza cuya naturaleza química sea inclusive distinta al analito a cuantificar. También es importante destacar que con este tipo de análisis basados en RMNc es posible realizar la cuantificación simultánea de varios analitos (Zul, García, Lucio, Waksman, & Saucedo, 2022).

Los espectros de  $^1\text{H}$  son los más utilizados en los estudios de metabolómica basados en RMN, esto se debe a sus propiedades intrínsecas, y a que los átomos de hidrógeno se encuentran en casi todos los compuestos orgánicos en general y por lo tanto en casi todos los metabolitos conocidos (Wishart, 2008).

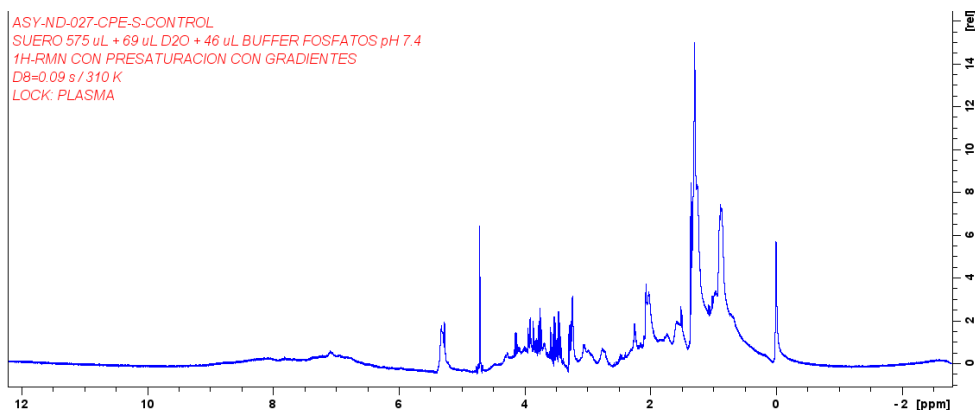
Existen secuencias de pulsos que han sido ampliamente utilizadas para los estudios de metabolómica. Por lo que deben considerarse aspectos importantes a tratar con la obtención de un espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de biofluidos, ya que cuando se desea obtener solo las señales de los metabolitos, es necesario realizar la supresión de la señal del agua, y adicionalmente la supresión o "eliminación" de las señales de las macromoléculas tales como proteínas y lípidos (que podemos encontrar en abundancia en muestras derivadas de la sangre como el suero o el plasma) (Le Guennec, Tayyari, &

Edison, 2017). La secuencia NOESY presat es la principal opción para cubrir la necesidad de suprimir la señal de agua en los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN, ya que, en comparación a otras frecuencias de pulsos desarrolladas con la misma finalidad, mediante el experimento NOESY presat se puede realizar dicha acción sin perder la intensidad de las señales que se encuentren cercanas a la región del agua. La secuencia de pulsos en el NOESY presat consiste en una secuencia que inicia con una saturación de un período largo y potencia baja que permite seleccionar la frecuencia de resonancia del disolvente, en este caso  $\text{H}_2\text{O}$ . Después se aplican dos pulsos de  $90^\circ$  para la inversión del estado de equilibrio, luego un período de mezcla, y finalmente un último pulso de  $90^\circ$  (Mckay, 2011). Sin embargo, dado que en este experimento son detectados todos los átomos de hidrógeno presentes en la muestra, cuando la muestra analizada contiene un alto contenido de macromoléculas, en el espectro se observan distorsiones importantes en la línea base que dificultan la identificación de las señales de los metabolitos (Figura 6 A).

Es por esto, que, en el caso de muestras biológicas que además de un alto contenido de agua son ricas en macromoléculas, es necesario aplicar una secuencia de pulsos con un filtro del tiempo de relajación ( $T_2$ ) para eliminar las señales de las macromoléculas, este es el caso de la secuencia de Carr Purcell Meiboon Gill (CPMG). La secuencia CPMG consiste en un pulso de  $90^\circ$  y posteriormente un tren de pulsos de  $180^\circ$  separadas por un tiempo eco, esto permitirá eliminar aquellas señales de las macromoléculas debidas a las

diferencias en los tiempos de relajación con respecto a las moléculas de bajo peso molecular, de tal manera que únicamente se conservaran las señales de moléculas de bajo peso molecular como los metabolitos (Figura 6 B)(Hnilicová, Bittšanský, & Dobrota, 2014; Le Guennec et al., 2017).

A)



B)

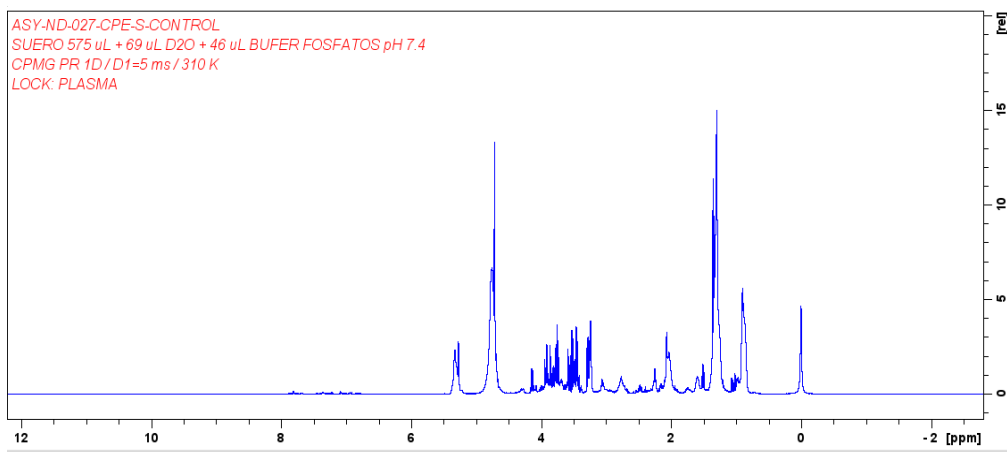


Figura 6. Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz, 10%  $\text{D}_2\text{O}$ ) obtenidos a partir de una muestra de suero humano A) NOESY presat, B) CPMG presat. Al aplicar la

secuencia de pulsos CPMG, se observa cómo se eliminan las señales anchas de las macromoléculas, quedando sólo las señales de los metabolitos que nos interesa estudiar.

La metabolómica puede aportar información valiosa para el estudio de patologías complejas, debido a que los metabolitos proporcionan información de los procesos que ocurren en la célula a nivel genómico, transcriptómico y proteómico. Una ventaja en los estudios de metabolómica consiste en el análisis preciso de decenas a centenares de metabolitos de forma simultánea, lo que permite observar cambios para una respuesta en particular y poder dar un seguimiento a través del tiempo. Actualmente, la práctica clínica contempla una cantidad limitada de metabolitos que en ocasiones requieren complementarse con estudios más específicos como los histopatológicos y moleculares para el diagnóstico de trastornos complejos (Zul et al., 2022), por lo que la aplicación de los estudios metabolómicos se vislumbran con mucho potencial.

Por ejemplo, en el caso de la lesión renal, la estimación del daño se hace con base en marcadores como la elevación de la creatinina sérica, dado que se puede contrastar con un valor base (valor normal), esto permite que se valide dicho marcador como un factor predictivo en la lesión renal al elevarse por encima de dicho valor. Por otra parte, no resulta simple evaluar la lesión renal en pacientes trasplantados dado que los marcadores de daño renal presentan fluctuaciones rápidas y frecuentes en los meses posteriores al trasplante y



como consecuencia de la IR, cambios de líquidos posoperatorios, medicamentos inmunosupresores, entre otras alteraciones. Sumado a lo anterior, aún son pocos los estudios realizados sobre la evaluación de casos de lesión renal relacionada a trasplantes lo que también dificulta la evaluación de biomarcadores potenciales con poder clínico predictivo(Cooper & Wiseman, 2013).

En relación con los estudios de metabolómica realizados en modelos de IR renal, Jouret y *cols* obtuvieron el perfil metabolómico en un modelo de IR renal en ratones analizando tanto en muestras de suero y de orina, observando variaciones significativas entre los grupos para los niveles de taurina, di y trimetilamina, creatinina y lactato a las 6 y 24 horas de reperfusión(Jouret et al., 2016). Mientras que Malagrino y *cols* obtuvieron el perfil metabolómico de IR renal en un modelo porcino donde se identificaron ocho metabolitos séricos que aumentan durante la isquemia y que durante la reperfusión recuperan sus valores basales. En este mismo estudio, se identificaron 13 metabolitos urinarios que cambian durante la reperfusión temprana de tal manera que esto permite diferenciar entre los periodos de pre y post IR, como aminoácidos y derivados, ácidos grasos, carbohidratos, aminas, ácidos tricarbónicos, guanidina, piridina, alcaloides y alfa-cetoácidos que están asociados a procesos patológicos propios de la IR como el cambio de la vía energética y el estrés oxidativo(Malagrino et al., 2016). Además, nuestro equipo de trabajo ha reportado los perfiles metabolómicos de las distintas etapas de la enfermedad

renal crónica en un modelo murino utilizando ácido fólico como inductor de daño, donde se identificaron metabolitos como citrato, creatinina, lactato, succinato, glicina, valina, taurina, entre otros, que se alteraban a consecuencia del daño renal(Perales-Quintana et al., 2019).

Por otra parte, también se puede obtener lo que se le conoce como perfil metabólico, que tiene un enfoque acotado a diferencia de la metabolómica, pero que también permite evaluar los cambios en las concentraciones de los metabolitos. El estudio metabólico se realiza teniendo en cuenta un grupo limitado de metabolitos. Este análisis forma parte importante de los estudios de metabolómica dado que permiten validar y ampliar los resultados obtenidos mediante la metabolómica(Beckonert et al., 2007; Zul et al., 2022). Un estudio metabólico sería el reportado por Ran y cols donde evaluaron el efecto de partículas finas ambientales PM2.5 sobre la microbiota pulmonar e intestinal en ratones, y obtuvieron el perfil metabólico de muestras de suero, de tal manera, que observaron alteraciones principalmente en los metabolitos glutamato, glutamina, formiato, piruvato y lactato(Ran et al., 2021). Dados estos antecedentes, en este proyecto de tesis proponemos ahondar en el estudio del efecto nefroprotector de la LP contra el daño por IR mediante un estudio de perfilado metabólico que conduzca a identificar y cuantificar los metabolitos séricos en un modelo animal en ratas Wistar.

## **1.6 Planteamiento del problema**

El trasplante renal está indicado en la mayoría de las enfermedades que evolucionan a ERC, entre las principales causas se reportan la diabetes y la hipertensión. En México hay una cifra alarmante de receptores de riñón en lista de espera, además de una casi nula cultura de donación altruista que hace más difícil cubrir esta necesidad. Debido a la escasa disponibilidad de dicho órgano, es importante asegurar su viabilidad después de un procedimiento de trasplante, mediante estrategias farmacológicas y/o no farmacológicas que protejan el órgano contra la lesión por IR que se presenta durante el proceso del trasplante de cualquier órgano sólido, y que provoca una de las principales causas de rechazo del injerto. En esta investigación se plantea una estrategia farmacológica con LP para disminuir la lesión por IR en un modelo de daño renal, así como establecer el perfil metabólico que nos permita diferenciar un órgano con o sin lesión por IR como estrategia terapéutica futura para prevenir el rechazo del órgano a causa de esta lesión propia del proceso de trasplante.

## **1.7 Justificación**

En la actualidad existen múltiples propuestas terapéuticas que han presentado efectividad frente al daño por IR. Pese a todas estas propuestas, son pocas las que se encuentran en la etapa clínica de desarrollo y ninguna de ellas ha sido aprobada para su uso en pacientes como terapia contra el daño

por IR durante el trasplante (Salvadori et al., 2017). Por este motivo, es importante continuar con la búsqueda de alternativas que contrarresten dicho problema y que potencialmente puedan ser aplicadas en pacientes, así como establecer una posible estrategia diagnóstica oportuna del daño por IR a través de las diferencias en el perfil metabólico durante la lesión por IR y su modificación con el tratamiento previo con LP. La búsqueda de tratamientos y biomarcadores oportunos de rechazo puede conducir a incrementar la viabilidad del injerto en un trasplante al disminuir la lesión por IR y a reducir el consecuente riesgo que, inclusive, compromete la vida del sujeto trasplantado.

## **1.8 Objetivos**

### **1.8.1 Objetivo general**

Evaluar el perfil metabólico sérico inducido por la administración de Loperamida como potencial nefroprotector contra el daño por IR en ratas Wistar.

### **1.8.2 Objetivos específicos**

1. Establecer un modelo de IR renal en ratas Wistar mediante marcadores bioquímicos e histológicos.
2. Evaluar el efecto de la loperamida sobre el modelo de IR renal mediante marcadores bioquímicos, inmunológicos, de estrés oxidativo, moleculares e histológicos.
3. Establecer el perfil metabólico sérico por RMN de los diferentes grupos de estudio.

## CAPÍTULO II

### 2 Materiales y métodos

#### 2.1 Clasificación del estudio

Estudio experimental, prospectivo, comparativo.

#### 2.2 Diseño del estudio

El presente estudio fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León (Número de registro **QA22-00001**).

La estrategia general del presente trabajo se muestra en la figura 7.

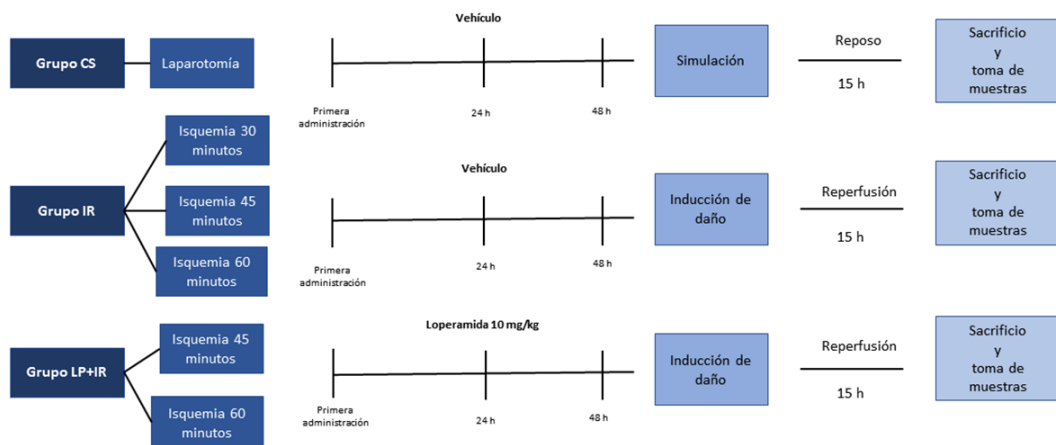


Figura 7. Estrategia general del desarrollo y evaluación de los diferentes grupos de investigación desde el tipo de grupo, administración del vehículo/fármaco y el proceso de IR.

Se utilizaron un total de 36 ratas Wistar macho divididas en 6 grupos, con un peso de entre 250 y 300 g. Las ratas fueron mantenidas en condiciones estándar de laboratorio, con acceso a agua y alimento *ad libitum*, y periodos de luz y oscuridad de 12 horas.

Al grupo 1, control sano (CS), sham, se le administró solución salina fisiológica vía orogástrica durante 3 días, periodo tras el cual se sometieron a una laparotomía durante 60 minutos sin realizar isquemia renal y 15 h de observación.

Al grupo 2 de daño IR se le administró solución salina fisiológica vía orogástrica durante 3 días, periodo tras el cual se sometieron a una inducción de isquemia renal bilateral de 30 minutos seguido de 15 horas de perfusión.

Al grupo 3 de daño IR se le administró solución salina fisiológica vía orogástrica durante 3 días, periodo tras el cual se sometieron a una inducción de isquemia renal bilateral de 45 minutos seguido de 15 horas de perfusión.

Al grupo 4 de daño IR se le administró solución salina fisiológica vía orogástrica durante 3 días, periodo tras el cual se sometieron a una inducción de isquemia renal bilateral de 60 minutos seguido de 15 horas de perfusión.

Al grupo 5 para evaluar la actividad nefroprotectora se les administró LP a una dosis de 10 mg/kg por 3 días, posteriormente se sometieron a una isquemia renal bilateral de 45 minutos y posteriormente, a un período de 15 horas de perfusión.

Al grupo 6 para evaluar la actividad nefroprotectora se les administró LP a una dosis de 10 mg/kg por 3 días, posteriormente se sometieron a una isquemia renal bilateral de 60 minutos y, posteriormente a un período de 15 horas de reperfusión.

Después del periodo de reperfusión, se realizó la extracción sanguínea. La sangre fue transferida a tubos rojos con agente coagulante. Las muestras se centrifugaron por 12 min a 3500 rpm y se recuperó el suero. Una vez que el corazón dejó de latir, se extirparon ambos riñones, se cortaron en fragmentos, una parte de los riñones fue conservado en formol al 10% en amortiguador de fosfatos para su posterior análisis histológico, y otra parte del tejido se almacenó a -80° C hasta su análisis.

Se evaluaron los marcadores bioquímicos en suero de rata, se determinó la concentración de las citocinas proinflamatorias, marcadores asociados al estrés oxidativo, la expresión relativa de genes asociados a daño en homogenizados de tejido renal, el perfil metabólico por RMN en muestras de suero, y el análisis histológico del tejido renal.

### **2.3 Población del estudio**

Las ratas Wistar empleadas para el desarrollo del estudio fueron proporcionadas por el bioterio del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León y posteriormente se

llevaron al Laboratorio de Investigación de la Unidad de Hígado del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” para el desarrollo experimental.

## **2.4 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación**

### **2.4.1 Criterios de inclusión**

- Ratas Wistar macho sanas
- Peso entre 250 y 320 gramos

### **2.4.2 Criterios de exclusión**

- Edad mayor a 6 meses

### **2.4.3 Criterios de eliminación**

- Muerte durante el procedimiento
- Desarrollo de enfermedades infecciosas
- Presencia de algún defecto morfológico renal.



## 2.5 Cálculo del tamaño de muestra

Asumiendo varianzas iguales, fue utilizada la Ecuación 1, para el cálculo del tamaño de muestra para una diferencia de medias (Velasco Rodríguez, 2003).

### Ecuación 1

Cálculo del tamaño de muestra para una diferencia de medias

$$n = \frac{K(\sigma_1^2 + \sigma_2^2)}{(\mu_1 - \mu_2)^2}$$

- $\sigma_1$  = Desviación estándar de la población 1
- $\sigma_2$  = Desviación estándar de la población 2
- $\mu_1$  = Media del grupo 1
- $\mu_2$  = Media del grupo 2
- $K = (z\alpha + z\beta)^2$

Empleando una significancia a una cola del 0.5% y un poder del 95%, se obtiene un valor K de 17.8. Con estos datos, se resuelve un tamaño de muestra de 3 ratas por grupo.

Sin embargo, para la realización de este estudio se empleó una n=6 ratas por grupo, debido a las especificaciones solicitadas por la mayoría de las revistas internacionales.

De acuerdo con el resultado, se utilizaron grupos de 6 animales y recalcularemos el poder de los resultados obtenidos a posteriori, adecuando el

tamaño de los grupos de animales a un nivel de confianza del 95% y una potencia de 80%.

## **2.6 Materiales y equipo**

### **2.6.1 Material quirúrgico**

- Clamps vasculares
- Camas para cirugía
- Pinzas hemostáticas
- Pinzas Adson
- Pinzas Alice
- Hojas para Bisturí
- Tijeras
- Portaagujas

### **2.6.2 Anestésicos**

- Ketamina 1000 mg/10mL (PiSA)
- Xilazina 10% (PiSA)

### **2.6.3 Consumibles**

- Jeringas
- Gasas
- Guantes
- Servilletas
- Torundas
- Hisopos
- Sutura de seda 3-0
- Puntillas para micropipeta
- Portaobjetos
- Cubreobjetos

### **2.6.4 Reactivos**

- Buffer salino de fosfatos (PBS)
- GoTaq qPCR Master Mix, 2X
- GoScript RT Mix for 1-Step RT-qPCR
- CXR Reference Dye, 30  $\mu$ M
- Agua libre de Nucleasas
- Tween 20

- Albúmina Sérica Bovina (BSA)
- ABTS
- TriReagent
- Etanol 75%
- Isopropanol
- Agua DEPC
- RNaseZap

### **2.6.5 Instrumentos**

- ILab Aries (Instrumentation Laboratory, Werfen Group, USA)
- Lector espectrofotométrico de placas de ELISA (Multiskan Go)
- Micropipetas
- Pipetas multicanal
- $\mu$ Drop Plate
- Microcentrífuga Refrigerada
- Agitador Vortex
- Termociclador (StepOnePlus™ System).
- Cabina de Seguridad Serie 1300 de Clase II, Tipo A2
- Espectrómetro Agilent 600 MHz (UAM-Xochimilco)

## **2.7 Desarrollo experimental**

### **2.7.1 Inducción de daño renal por IR.**

La cepa de modelo animal más empleada para establecer los mecanismos de la lesión por IR renal y la efectividad de productos naturales y/o fármacos en la investigación biomédica es la rata Wistar albino (Bayrak et al., 2008; Iheagwam, Ogunlana, Ogunlana, Isewon, & Oyelade, 2019; YOKOZAWA, FUJII, KOSUNA, & NONAKA, 2002). Las ratas son relativamente económicas de criar y mantener; se pueden reproducir rápidamente y por ende permiten estudiar la fisiología de la lesión por IR renal y han sido reportadas en diversos estudios por su accesibilidad económica en comparación a otros modelos (Denayer, Stöhrn, & Van Roy, 2014; Kyriakopoulos et al., 2018; A. P. Singh, Singh, & Bedi, 2017).

Los animales del grupo 1 (CS) se anestesiaron con (10 mg/kg, intraperitoneal) de xilacina y (100 mg/kg, intraperitoneal) de ketamina por vía intraperitoneal, para someter a una laparotomía (previa comprobación de anestesia mediante pinzado de pata posterior y/o pellizcamiento de la cola), se colocaron sobre mesa quirúrgica, se rasuró el abdomen y se limpió la piel con microdacyn 60 y clorhexidina. Se realizó una incisión en el abdomen, se localizó el riñón derecho, se disecó sin realizar el pinzamiento del pedículo renal; entonces se localizó el riñón izquierdo, se disecó sin llegar a realizar el

pinzamiento del pedículo renal, se mantuvieron a los animales en observación durante 60 min, registrando condiciones generales y condiciones de herida. Tras este tiempo se comprobó hemostasia y se cerró la pared abdominal con sutura (5-0) continua en dos planos. Posteriormente se colocó al animal en recuperación en una caja con aserrín estéril con aporte de oxígeno y calor radiante durante 15 h. Los animales con disposición de agua y alimento, se les administró tramadol como analgésico (50 mg/L) *ad libitum*. Tras este tiempo se procedió a obtener las muestras previa anestesia con xilacina (5 mg/Kg) y ketamina (50 mg/kg intraperitoneal) para realizar la exanguinación por punción de la arteria abdominal para obtener un volumen máximo de 5 mL, posterior a este procedimiento se realizó la eutanasia de acuerdo a las recomendaciones de la NOM-062-ZOO-1999 pág. 40-41 (9.4.2.2.2) con pentobarbital sódico a dosis de 120-210 mg/kg intravenosa diluyendo con solución salina a 1000 µL comprobando la muerte con la interrupción de signos vitales.

Los animales de los grupos 2-6 fueron anestesiados con xilacina (10 mg/Kg, intraperitoneal) y ketamina (100 mg/kg, intraperitoneal) para someter las ratas a isquemia renal bilateral (previa comprobación de anestesia mediante pinzado de pata posterior y/o pellizcamiento de la cola), se colocaron sobre mesa quirúrgica. Se rasuró el abdomen y se limpió la piel con microdacyn 60 y clorhexidina. Se realizó una incisión en el abdomen, se localizó el riñón derecho, se disecaron y pinzaron ambos pedículos renales por 30, 45 o 60 minutos (dependiendo del grupo); entonces se localizó el riñón izquierdo, se

disecó y se pinzó el pedículo renal. Tras finalizar el tiempo de isquemia se cerró la pared abdominal con sutura (5-0) continua en dos planos. Posteriormente se colocaron los animales en recuperación en una caja con aserrín estéril con aporte de oxígeno y calor radiante durante 15 h. Los animales se alojaron en parejas dentro de jaulas grandes, con disposición de agua y alimento, se administró tramadol de forma continua por vía oral. Tras este tiempo se procedió a obtener las muestras como se describió previamente para el grupo CS.

### **2.7.2 Toma de muestras**

Los animales fueron anestesiados con xilacina y ketamina para realizar exanguinación y obtención de tejido renal (previa comprobación de anestesia mediante pinzado de pata posterior y/o pellizcamiento de la cola) se colocaron sobre mesa quirúrgica. Se rasuró el abdomen y se limpió la piel con alcohol 70%. Bajo efecto anestésico, se realizó exanguinación por punción de la arteria abdominal para obtener un volumen máximo de 5 mL.

La sangre colectada de cada animal se dejó coagular aproximadamente 30 minutos, después se centrifugó a 3,500 r.p.m. durante 15 min y se separó el suero para determinación de citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6), creatinina sérica, nitrógeno de la urea (BUN, por sus siglas en inglés), ALT, aspartato aminotransferasa (AST), lactato deshidrogenasa (LDH), glucosa,

fosfatasa alcalina (FA) y ácido úrico. Por otro lado, se retiraron los riñones y se midió el ancho y el largo de cada riñón, se pesaron y después se dividieron longitudinalmente, colocando una porción en un criotubo e inmediatamente en congelación a -80 °C (para determinación de marcadores de estrés oxidativo como MDA y actividad antioxidante mediante la actividad de SOD y antioxidantes totales, e inflamación mediante citocinas proinflamatorias). Otra porción de tejido fue conservada a -80 °C se utilizó para evaluar la expresión de genes relacionados al daño producido por IR mediante PCR en tiempo real y otra porción en formaldehído con buffer de fosfatos a pH 7.4 para su fijación durante 24h y su posterior tinción con H&E. Se evaluó el daño histológico posterior a la IR, por graduación de daño utilizando la escala de Kobuchi et al., 2009 (Kobuchi et al., 2009).

### **2.7.3 Determinación de marcadores bioquímicos**

Las muestras de suero fueron analizadas en un equipo ILab Aries (Instrumentation Laboratory, Werfen, Milan, Italia). Se evaluaron los parámetros de creatinina sérica, BUN, ALT, AST, LDH, glucosa, FA y ácido úrico mediante espectrofotometría UV-Visible.

### **2.7.4 Determinación de marcadores proinflamatorios**

La medición de citocinas proinflamatorias IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  en tejido de riñón, se realizaron mediante un método de ELISA-sandwich (R&D system). Se



utilizó avidina conjugada con peroxidasa (complejo estreptavidina-HRP) para producir un cromógeno de concentración proporcional a la de la citocina a evaluar, que fue medido mediante espectrofotometría. Como sustrato se utilizó tetrametilbencidina, para producir un color verde que fue leído a una longitud de onda de 405 nm.

### **2.7.5 Determinación tisular de marcadores de estrés oxidativo**

La determinación de MDA se realizó en homogenizado de tejido mediante el método del ácido tricloroacético (método TCA), el cual se basa en la reacción del MDA (el producto final de la peroxidación de los lípidos) con ácido tiobarbitúrico en un medio ácido y caliente, usando el kit de ensayo de TBARS de Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA). El producto de dicha reacción se determinó espectrofotométricamente a una longitud de 535 nm, siendo su concentración proporcional a la concentración de MDA en la muestra.

La actividad de la SOD se determinó indirectamente utilizando el kit comercial de Sigma-Aldrich SOD Assay Kit, que consiste en el método de WST-1, el cual es un reactivo que al interaccionar con el superóxido provoca una reducción del WST-1 a WST-1 formazan (cromógeno), posteriormente se determinó la absorbancia a 450 nm, la absorbancia es directamente

proporcional al porcentaje de inhibición de la reacción por la presencia de la SOD.

Se determinaron los antioxidantes totales como enzimas, proteínas, vitaminas, etc., en las muestras de suero. Se utilizó el kit comercial de Cayman Chemical company Antioxidant Assay Kit, que determina la oxidación del ABTS cuando está en presencia de metamioglobina. La capacidad de los antioxidantes para evitar dicha oxidación se monitoreó mediante la absorbancia del ABTS reducido a 405 nm, el aumento de la absorbancia es inversamente proporcional a la concentración de antioxidantes totales.

#### **2.7.6 Expresión de genes relacionados al daño por IR renal por RT-qPCR**

##### **Extracción de RNA**

A partir de tejido congelado, se añadió 1 mL de reactivo TriReagent por cada 100 mg de tejido previamente pesado, comenzando por añadir 200  $\mu$ L (ya que el tejido flota) homogenizando en baño de hielo con un homogenizador de ajuste flojo (no Polytron), hasta ver una solución heterogénea con partículas finas, posteriormente se añadió los 800  $\mu$ L restantes. El volumen del tejido no excedió el 10% del volumen del reactivo TriReagent. Se centrifugó el lisado por 10 min a 12,000  $\times$  g a 4 °C y se transfirió el sobrenadante transparente a un tubo nuevo. Se dejó reposar las

muestras durante 5 min a temperatura ambiente, para garantizar la disociación completa de los complejos de nucleoproteína, se agregó 0.2 mL de cloroformo, se taparon las muestras y agitaron vigorosamente por 15 segundos, enseguida, se dejaron reposar 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugó la mezcla a 12,000 × g por 15 min a 4 °C para transferir la fase acuosa a un tubo nuevo. Se agregaron 0.5 mL de 2-propanol al tubo de la fase acuosa y mezclaron vigorosamente durante 15 s y se dejaron reposar las muestras con tapa cerrada por 7 min a temperatura ambiente. Se volvió a centrifugar a 12,000 × g por 10 min a 4 °C y se retiró el sobrenadante por decantación y el remanente con puntilla para evitar perder la pastilla de RNA. Se lavó el sedimento de RNA agregando 1 mL de etanol al 75% con dos ciclos de agitación y centrifugación a 12,000 × g por 5 min a 4 °C. Se dejó secar el sedimento de RNA 10 min mediante secado al aire colocando el tubo boca abajo en una sanita estéril y se aseguró de que no quede remanente de etanol en las paredes del tubo, y finalmente se agregaron 100 µL de agua DEPC para resuspender el RNA, y posteriormente se cuantificó el RNA extraído en cada muestra.

Nota: Para facilitar la disolución, se mezcló pipeteando repetidamente con una micropipeta a 55-60 °C (no se debe exceder esas temperaturas) por 10 min.

- Calidad

La preparación final de RNA debe estar libre de DNA y proteínas. Para ello se obtuvo una relación A260 / A280 de  $\geq 1.7$ .

## RT-qPCR

Se determinó mediante RT-qPCR, la expresión de los genes de GPX, IL-1 $\beta$  y el factor de transcripción nuclear kappa b (NF-kB), Beclin-1, LC3, y como control interno se usó el gen de  $\beta$ -actina, con sus correspondientes primers (Tabla I). A partir de una muestra que contiene alrededor de 100 ng/ $\mu$ L de RNA, se elaboró una mezcla con dicha muestra y con los reactivos correspondientes para llevar a cabo la reacción de RT-qPCR, de acuerdo con lo descrito en la tabla II.

Tabla I. Primers utilizados en la RT-qPCR

Gen	Primers	
	Forward	Reverse
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	5' AGGCTTCCTTGTGCAAGTGT 3'	5' AGGCATTCTCCTCACTGTCCG 3'
<b>NF-k<math>\beta</math></b>	5' CCTCATCTTTCCCTCAGAGCC 3'	5' CGCACTTGTAACGGAAACGC 3'
<b><math>\beta</math>-actina</b>	5' CCCTGGCTCCTAGCACCAT 3'	5' GATAGAGCCACCAATCCACACA 3'
<b>Glutación peroxidasa</b>	5' CATTGAGAATGTCGCGTCCC 3'	5' TTGCCATTCTCCTGATGTCCG 3'
<b>LC3</b>	5' ATCATCGAGCGCTACAAGGGTGA 3'	5' GGATGATCTTGACCAACTCGCTCAT 3'
<b>Beclin-1</b>	5' -TTGGCCAATAAGATGGGTCTGAA-3'	5' -TGTCAGGGACTCCAGATACGAGTG-3'

Tabla II. Elaboración de la mezcla para la reacción de RT-qPCR. Considerando un volumen final de 10  $\mu$ L por reacción.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final
GO TAQ	2X	1X
GO SCRIPT	50X	1X
FORWARD PRIMER 20X	5 $\mu$ M	200 nM
REVERSE PRIMER 20X	5 $\mu$ M	200 nM
CXR	30 $\mu$ M	33 nM
MUESTRA	100 ng	Variable
AGUA		3 $\mu$ L

La PCR consistió en un ciclo de transcripción reversa, 1 ciclo de la inactivación de la retrotranscriptasa y activación de la ADN polimerasa y 35-40 ciclos de amplificación, usando SYBR Green como fluoróforo el cual presenta una longitud de onda de excitación de 493 nm y una longitud de onda de emisión de 530 nm. La programación fue realizada de acuerdo con las condiciones de la tabla III.

Tabla III. Programación de la PCR

Paso	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Transcripción reversa	1	37°C	15 minutos
Inactivación de la retrotranscriptasa y activación de la ADN polimerasa	1	95°C	10 minutos
Desnaturalización	35-40	95°C	15 segundos
Alineamiento		60°C	1 minuto
Extensión		72°C	30 segundos

### 2.7.7 Análisis histológico

Se evaluó el daño renal mediante un análisis histológico a partir del tejido renal previamente conservado en formaldehído. Se realizaron los cortes de los riñones recolectados y posteriormente se realizó una tinción de H&E y los cortes histológicos ya una vez teñidos, se observaron en un microscopio óptico. Se utilizó la escala de Kobuchi donde se evalúa el daño renal considerando los hallazgos de NTA, cilindros proteicos (CP) observando los cortes en un aumento de 40x, y congestión medular (CM) en un rango de aumentos de 4 a 40x(Kobuchi et al., 2009) (Tabla IV).

Tabla IV. Escala de Kobuchi para la evaluación histológica del daño renal.

Característica	Escala de daño
Necrosis tubular  Cilindros proteicos	Ausente (0)
	Asilados (1)
	0%-25% (2)
	25%-50% (3)
	50%-100% (4)
Congestión medular	Ausente (0)
	40 x (1)
	20 x (2)
	10 x (3)
	4 x (4)

### 2.7.8 Cuantificación de proteínas en homogenizados de tejido

Se cuantificaron las proteínas en los homogenizados de tejido utilizados en la determinación de marcadores de estrés oxidativo y citocinas proinflamatorias, con la finalidad de normalizar los resultados obtenidos en dichas determinaciones. Se empleó el método de Bradford, y se utilizó BSA para elaborar la curva de calibración. El reactivo de Bradford contiene un colorante que al unirse a proteínas forma un color azul, permitiendo medir su absorbancia a 595 nm (Kruger, 1994).

### **2.7.9 Identificación de metabolitos séricos por RMN**

Los espectros de RMN fueron obtenidos en colaboración del Dr. C. Ernesto Sánchez Mendoza de la Universidad Autónoma Metropolitana (Ciudad de México, México) Unidad Xochimilco División de Ciencias Biológicas y de la Salud Departamento de Sistemas Biológicos.

Se analizaron los sueros de todos los grupos experimentales. Se tomó una alícuota de 200  $\mu$ L de suero y se mezclaron con 200  $\mu$ L de buffer de fosfatos 0.2 M a pH 7.4 con 20% de agua deuterada.

Se obtuvieron los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  en un espectrómetro Agilent de 600 MHz. Los espectros fueron obtenidos mediante la secuencia CPMG Presat, con la finalidad de suprimir las señales de las macromoléculas que solapan todas las señales de los metabolitos presentes en el espectro (Le Guennec et al., 2017). En la tabla V se muestran las condiciones de adquisición de los espectros.



Tabla V. Condiciones de adquisición de los espectros de RMN  $^1\text{H}$ .

Parámetro	Valor
Origen	Varían
Instrumento	Vnmrs
Disolvente	D <sub>2</sub> O 10%
Temperatura	25.0 °C
Secuencia del Pulso	CPMG2
Experimento	1D
Sonda	OneProbe
Número de Scans	256
Ganancia Recibida	40
Retardo de la Relajación	5.0000
Ancho del Pulso	18.0000
Frecuencia de Presaturación	4.64170
Tiempo de Adquisición	1.3041
Frecuencia del Espectrómetro	599.80
Ancho del Espectro	6613.8
Frecuencia más Baja	-607.8
Núcleo	$^1\text{H}$
Tamaño Adquirido	8625
Tamaño del Espectro	65536
Resolución Digital	0.10

Los espectros fueron procesados a partir del FID en el programa MestReNova 14.2. Se realizó la corrección de fase y de línea base de cada espectro obtenido. Posteriormente, se exportaron los archivos en formato JCAMP para su posterior análisis.

Se empleó el programa Chenomx suite 8.0 para procesamiento adicional de los archivos JCAMP de cada espectro obtenido. En el módulo de procesamiento (Chenomx Processor), se realizó la calibración del desplazamiento químico de las señales a partir de la señal del formiato (8.447 ppm). Posteriormente, en el módulo de perfilado (Chenomx Profiler), se

identificaron los metabolitos al contrastar los desplazamientos químicos registrados en la base de datos del programa con las señales de los espectros obtenidos.

### 2.7.10 Cuantificación de metabolitos

Se tomaron en cuenta aquellos metabolitos identificados previamente que presentaron una señal que fuera posible cuantificar (señales con poco o nulo solapamiento y con una buena relación señal/ruido), y fueron integrados de forma manual con el software TopSpin 3.6.

Se determinó la concentración de los metabolitos mediante el uso de muestras independientes preparadas con sacarosa 1.72 mM, se comprobó la concentración de sacarosa de los estándares al comparar dichas muestras con un estándar certificado de sacarosa 2 mM (Bruker BioSpin AG, Switzerland) en el programa TopSpin 3.6. Con la Ecuación 2 se realizó el cálculo de la concentración de cada metabolito que cumplía con los criterios para la cuantificación.

Ecuación 2

$$C_m = C_{ref} \frac{A_m n_{ref}}{A_{ref} n_m}$$

➤  $C_m$  = Concentración del metabolito problema

- *Cref= Concentración del metabolito de referencia*
- *Am= Integral del metabolito problema*
- *Aref= Integral del metabolito de referencia*
- *nm= Número de protones que integran para la señal del metabolito*
- *nref= Número de protones que integran para la señal del metabolito de referencia*

### **2.7.11 Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados mediante el Software GraphPad Prism 7.0. Se determinó la distribución de los datos mediante una prueba de Shapiro-Wilk, y posteriormente y dependiendo de la distribución de los datos, se usó una prueba estadística de ANOVA de una vía o Kruskal-Wallis con *post hoc* de Tukey y Dunn respectivamente, con el objetivo de determinar la existencia de diferencias significativas entre los grupos. Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  desviación estándar, así como mediana con rango intercuartil, dependiendo, según sea el caso. Se consideró un valor de  $P < 0.05$  como estadísticamente significativa.

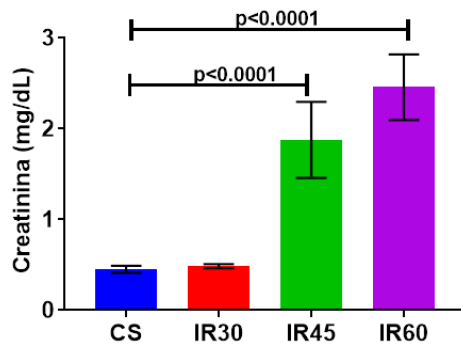
## CAPÍTULO III

### 3. Resultados

#### 3.1 Estandarización del modelo de IR renal.

Se realizó la estandarización del modelo de daño renal al evaluar los marcadores de daño renal con mayor aceptación como el BUN y la creatinina sérica. Se determinaron las concentraciones de los marcadores de daño renal en los grupos control de daño a IR30, IR45 e IR60. Así mismo, se determinaron los mismos marcadores para el grupo CS, con la finalidad de comparar las concentraciones de dichos marcadores en un grupo con ausencia de daño renal contra los grupos control de daño renal (Figura 8). Se observó que a partir de 45 minutos de isquemia es cuando se hace evidente la lesión renal. Por otro lado, cabe destacar que, a 60 minutos de isquemia, el daño se vuelve tan pronunciado que la concentración sérica de creatinina es incluso significativamente mayor al compararlo con el grupo IR45. Dado que el grupo de IR30 no mostró elevar de manera significativa los marcadores evaluados, en este punto se decidió descartar dicho grupo en los estudios posteriores.

A)



B)

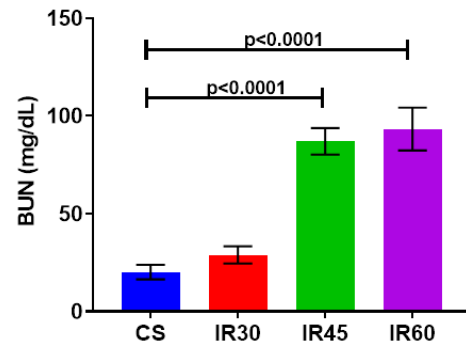
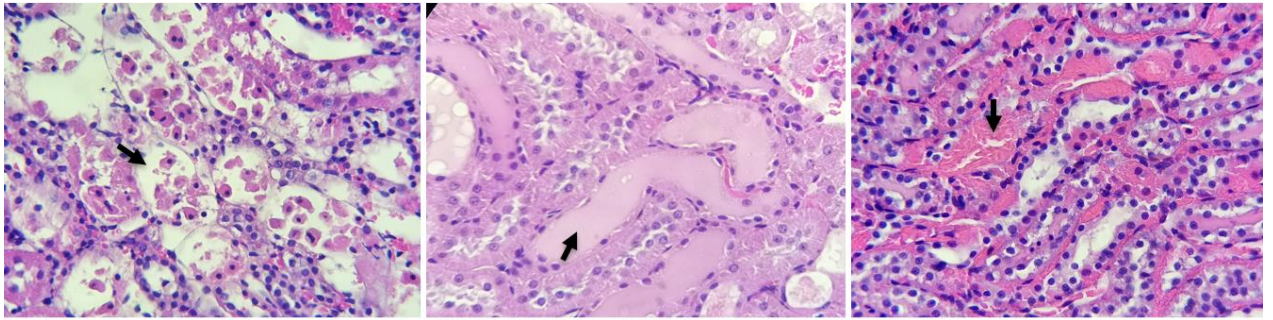


Figura 8. Concentraciones séricas A) Creatinina, B) BUN, en los diversos grupos de estudio. Los valores se expresan como media  $\pm$  DE. CS (grupo control sano), IR30 (grupo control de daño con isquemia de 30 minutos), IR45 (grupo control de daño con isquemia de 45 minutos), IR60 (grupo control de daño con isquemia de 60 minutos), todos los grupos control de daño fueron sometidos a 15 horas de reperfusión.

Otro indicativo para evaluar el daño renal consiste en determinar el daño histológico. Por lo tanto, se evaluaron las condiciones histológicas del tejido renal en los mismos grupos anteriormente evaluados, a excepción del grupo IR30. Para ello se evaluó la presencia y el grado de NTA, cilindros proteicos y congestión medular (Figura 9). Los resultados obtenidos, demuestran una vez más cómo es evidente el daño en los grupos IR45 e IR60 al compararlos con el grupo CS, al presentarse una alteración morfológica de las estructuras del tejido renal como la NTA y la presencia de cilindros proteicos. Por otro lado, en el grupo CS hay una ausencia de dichas alteraciones morfológicas (Figura 10 A, B y C).



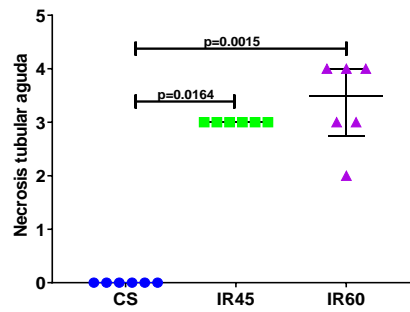
**Necrosis tubular aguda**

**Cilindros proteicos**

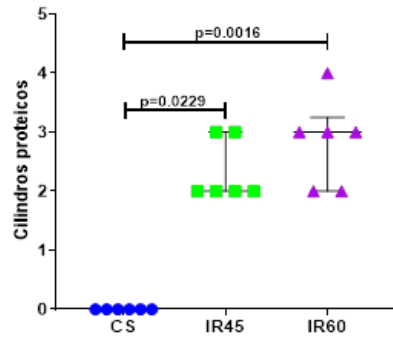
**Congestión vascular medular**

Figura 9. Imágenes representativas de los parámetros evaluados para el estudio histológico en los diferentes grupos. Las imágenes fueron observadas en un aumento de 40x.

A)



B)



C)

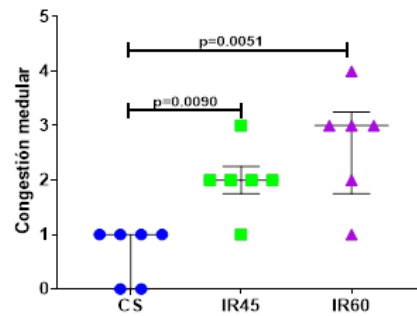


Figura 10. Hallazgos histológicos A) Necrosis tubular aguda, B) Cilindros proteicos, C) Congestión medular, en los diferentes grupos de estudio.. Los valores se expresan como mediana  $\pm$  rango intercuartil. CS (grupo control sano), IR30 (grupo control de daño con isquemia de 30 minutos), IR45 (grupo

control de daño con isquemia de 45 minutos), IR60 (grupo control de daño con isquemia de 60 minutos), todos los grupos control de daño fueron sometidos a 15 horas de reperfusión.

## **3.2 Marcadores bioquímicos, estrés oxidativo, proinflamatorios, expresión de genes e histología**

### **3.2.1 Marcadores bioquímicos**

Al determinar las concentraciones séricas de los marcadores bioquímicos asociados al daño renal, en los grupos pretratados con LP (LP+IR60 y LP+IR45), sólo fue evidente una disminución significativa en el grupo de LP+IR45 de creatinina y BUN al comparar con el grupo IR45 (Figura 11 A y B). Por otro lado, en el grupo LP+IR60 demostró mediante estos marcadores que no se tuvo efecto importante del fármaco para preservar la función renal al no observarse una mejora significativa en los marcadores de creatinina y BUN (Figura 12 A y B). En el caso de las concentraciones de glucosa, hubo una disminución significativa en el grupo de IR60 contra CS, mientras que en el grupo LP+IR60 disminuye significativamente aún más al comparar con el grupo IR60 (Figura 12 C). En los grupos con 45 minutos de isquemia, sólo fue evidente una disminución significativa de las concentraciones de glucosa en el grupo LP+IR45 contra CS (Figura 11 C). En ningún grupo se encontraron alteraciones significativas para las concentraciones séricas de ácido úrico (Figura 11 D y 12 D).



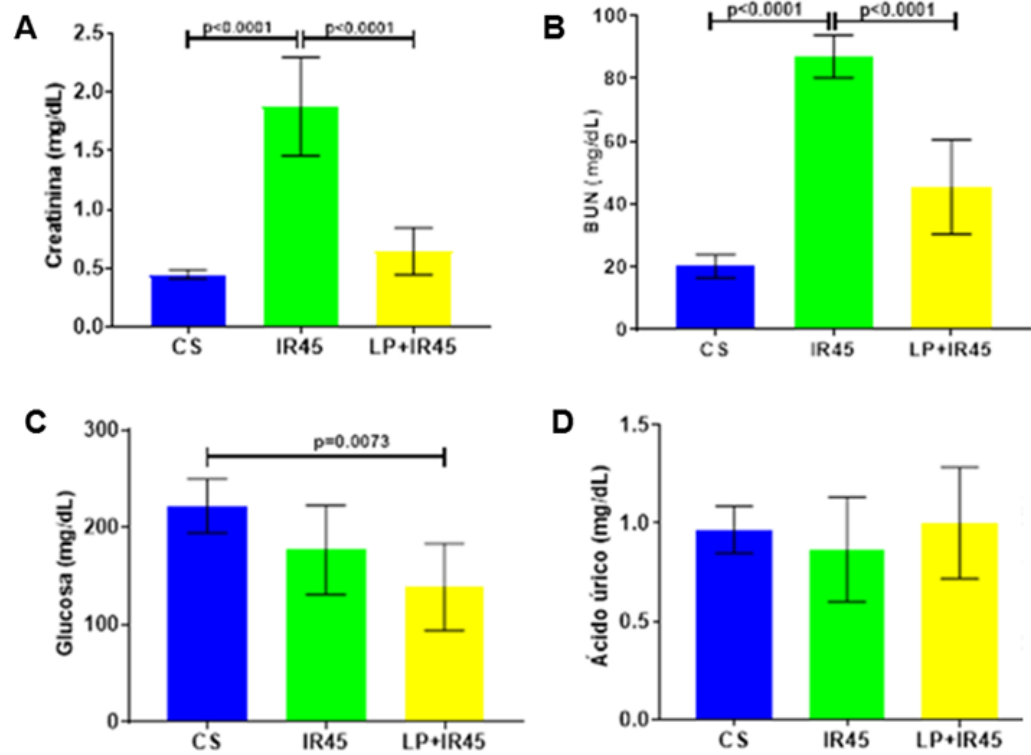


Figura 11. Marcadores bioquímicos de daño renal en grupos con 45 minutos de isquemia. Concentraciones séricas de A) creatinina, B) BUN, C) glucosa, D) ácido úrico. Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar. CS (grupo control sano), IR45 (grupo control de daño con isquemia de 45 minutos), LP+IR45 (grupo pretratado con loperamida más daño con isquemia de 45 minutos), todos los grupos control de daño y tratamiento fueron sometidos a 15 horas de perfusión.

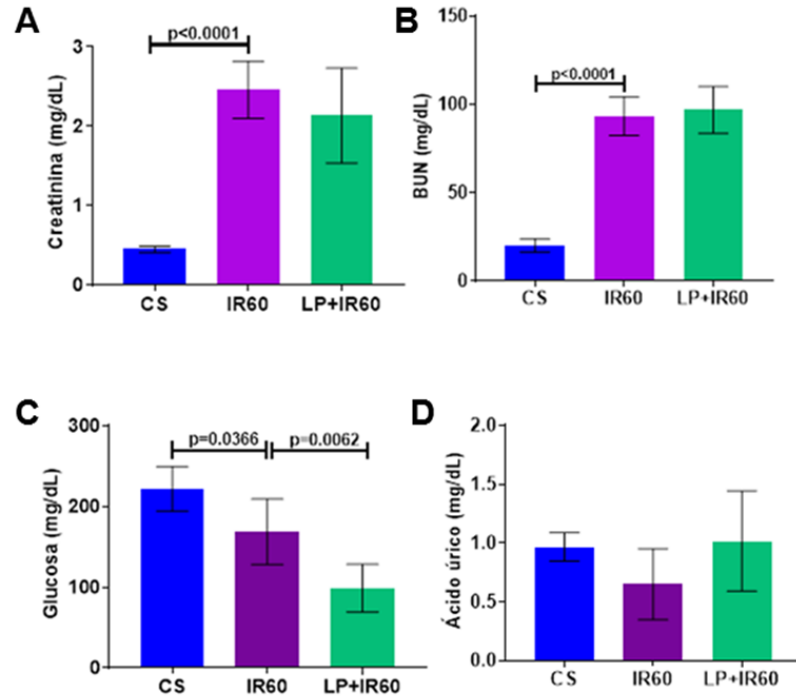


Figura 12. Marcadores bioquímicos de daño renal en grupos con 60 minutos de isquemia. Concentraciones séricas de A) creatinina, B) BUN, C) glucosa, D) ácido úrico. Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar. CS (grupo control sano), IR60 (grupo control de daño con isquemia de 60 minutos), LP+IR60 (grupo pretratado con loperamida más daño con isquemia de 60 minutos), todos los grupos control de daño y tratamiento fueron sometidos a 15 horas de reperfusión.

Adicionalmente, se evaluaron marcadores asociados al daño hepático. Los hallazgos más relevantes demostraron que desde 45 minutos de isquemia hay un aumento significativo en los niveles de AST al comparar el grupo de IR45 contra CS (Figura 13 A). Por otro lado, también fue evidente el aumento significativo en los niveles tanto de AST como de ALT en el grupo de IR60 al

comparar con el grupo CS (Figura 14 A y B). Por último, hay que destacar que en cuanto al grupo LP+IR60 demostró disminuir de manera significativa los niveles de ALT al compararlo con el grupo IR60 (Figura 14 B).

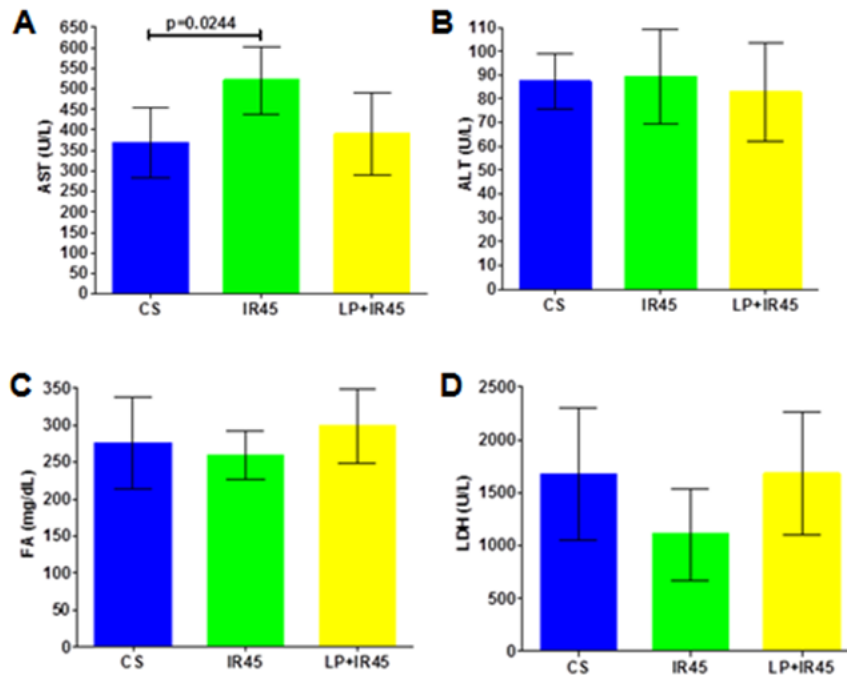


Figura 13. Marcadores bioquímicos de daño hepático en los grupos con 45 minutos de isquemia. Niveles séricos A) AST, B) ALT, C) FA, D) LDH. Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar. CS (grupo control sano), IR45 (grupo control de daño con isquemia de 45 minutos), LP+IR45 (grupo pretratado con loperamida más daño con isquemia de 45 minutos), todos los grupos control de daño y tratamiento fueron sometidos a 15 horas de reperfusión.

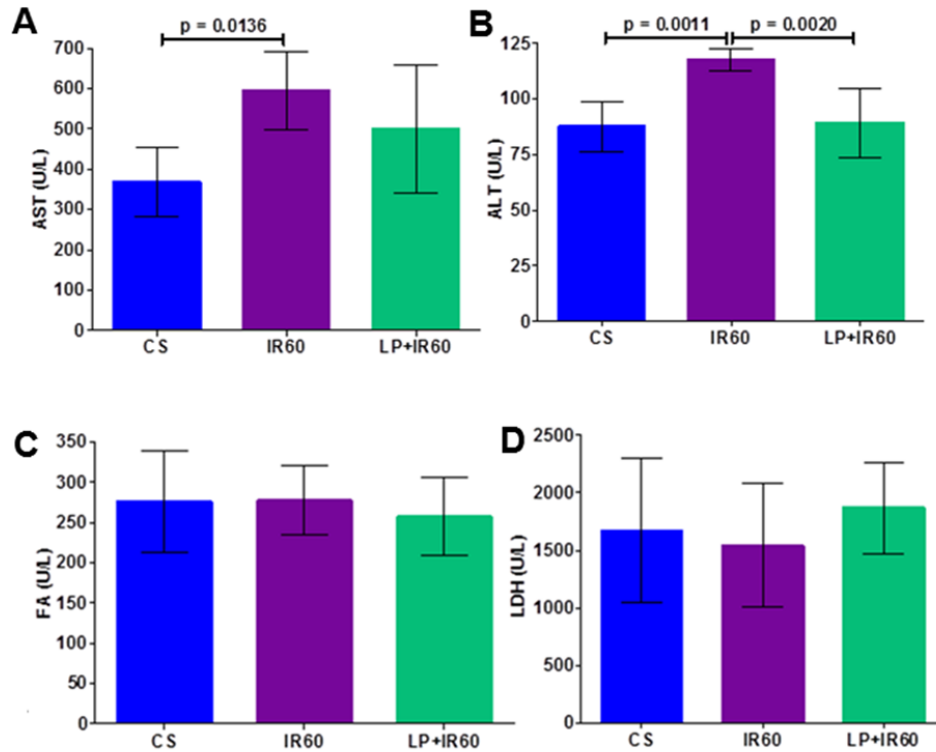


Figura 14. Marcadores bioquímicos de daño hepático en grupos con 60 minutos de isquemia. Niveles séricos A) AST, B) ALT, C) FA, D) LDH. Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar. CS (grupo control sano), IR60 (grupo control de daño con isquemia de 60 minutos), LP+IR60 (grupo pretratado con loperamida más daño con isquemia de 60 minutos), todos los grupos control de daño y tratamiento fueron sometidos a 15 horas de reperusión.

### 3.2.2 Marcadores de estrés oxidativo

Al determinar la concentración de antioxidantes totales (como equivalentes milimolares de Trolox), el único hallazgo significativo fue el que se

observó en el grupo IR60 donde paradójicamente presentaba un aumento de los antioxidantes al comparar con el grupo CS (Figura 15).

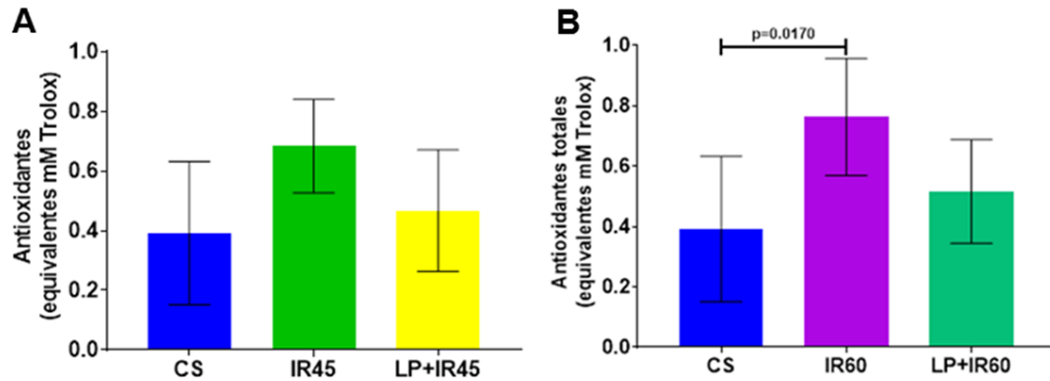


Figura 15. Concentraciones séricas de antioxidantes totales (equivalentes milimolares de Trolox) en **A)** grupos de daño con 45 minutos de ischemia, **B)** grupos de daño con 60 minutos de ischemia. Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar. CS (grupo control sano), IR60 (grupo control de daño con ischemia de 60 minutos), LP+IR60 (grupo pretratado con loperamida más daño con ischemia de 60 minutos), IR45 (grupo control de daño con ischemia de 45 minutos), LP+IR45 (grupo pretratado con loperamida más daño con ischemia de 45 minutos), todos los grupos control de daño y tratamiento fueron sometidos a 15 horas de reperfusión..

También se hizo la determinación indirecta de SOD, del cual no fue posible detectar alguna alteración en la actividad de dicha enzima en ninguno de los grupos de estudio (Figura 16).

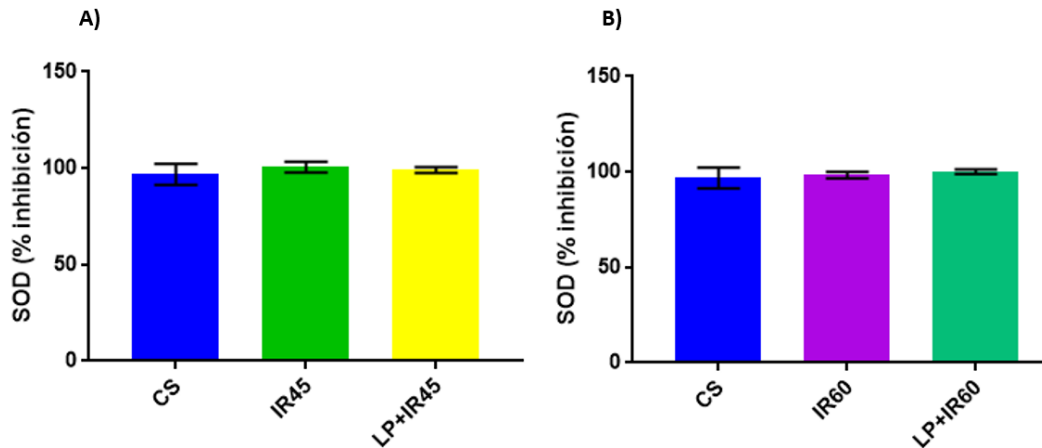


Figura 16. Determinación indirecta de la actividad de SOD. A) grupos con isquemia de 45 minutos, B) grupos con isquemia de 60 minutos. CS (grupo control sano), IR60 (grupo control de daño con isquemia de 60 minutos), LP+IR60 (grupo pretratado con loperamida más daño con isquemia de 60 minutos), IR45 (grupo control de daño con isquemia de 45 minutos), LP+IR45 (grupo pretratado con loperamida más daño con isquemia de 45 minutos), todos los grupos control de daño y tratamiento fueron sometidos a 15 horas de reperusión.

Por último, además de estudiar el daño por estrés oxidativo a través de las defensas antioxidantes del organismo, también se pudo evaluar un marcador asociado al grado de daño a consecuencia del estrés oxidativo. Para este criterio, se determinaron los niveles de MDA presentes en los homogeneizados de tejido renal. Sin embargo, los resultados obtenidos no permitieron diferenciar el grado de daño en ninguno de los grupos de estudio (Figura 17).

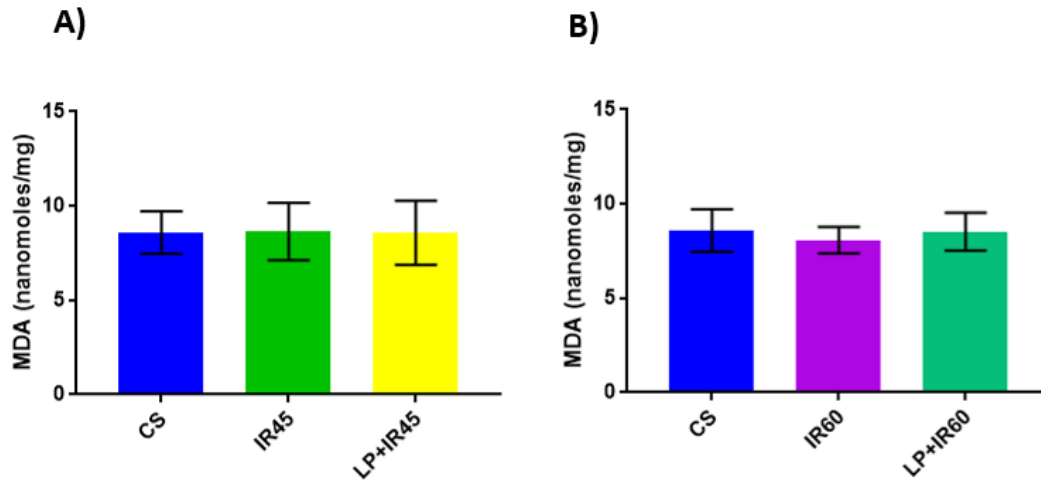


Figura 17. Niveles de MDA en homogeneizados de tejido renal en los diferentes grupos de estudio. A) Grupos con 45 minutos de isquemia, B) Grupos con 60 minutos de isquemia. Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar. CS (grupo control sano), IR60 (grupo control de daño con isquemia de 60 minutos), LP+IR60 (grupo pretratado con loperamida más daño con isquemia de 60 minutos), IR45 (grupo control de daño con isquemia de 45 minutos), LP+IR45 (grupo pretratado con loperamida más daño con isquemia de 45 minutos), todos los grupos control de daño y tratamiento fueron sometidos a 15 horas de perfusión.

### 3.2.3 Marcadores proinflamatorios

En la determinación de las citocinas proinflamatorias, no se observaron alteraciones significativas entre los grupos control de daño (IR45 e IR60) al compararlos con el grupo CS. Solo se observó que el grupo LP+IR45 presentó los niveles más bajos de TNF- $\alpha$  e incluso que el grupo CS (Figura 8 4C). Por el

contrario, en el grupo LP+IR60 mostró un aumento significativo en la IL-1 $\beta$  con respecto al grupo CS (Figura 19 A).

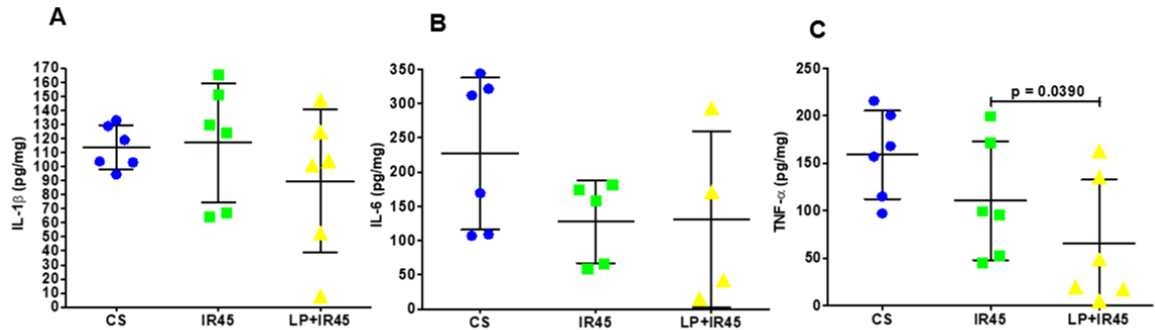


Figura 18. Citocinas proinflamatorias en los grupos con 45 minutos de isquemia. A) IL-1 $\beta$ , B) IL-6, C) TNF- $\alpha$ . Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar. CS (grupo control sano), IR45 (grupo control de daño con isquemia de 45 minutos), LP+IR45 (grupo pretratado con loperamida más daño con isquemia de 45 minutos), todos los grupos control de daño y tratamiento fueron sometidos a 15 horas de reperfusión.

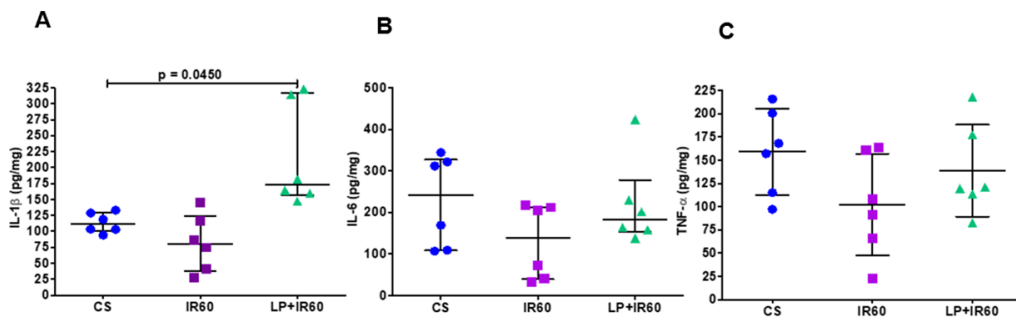


Figura 19. Citocinas proinflamatorias en los grupos con 60 minutos de isquemia. A) IL-1 $\beta$ , B) IL-6, C) TNF- $\alpha$ . Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar. CS (grupo control sano), IR60 (grupo control de daño con isquemia de 60 minutos), LP+IR60 (grupo pretratado con loperamida más daño con isquemia de 60 minutos), todos los grupos control de daño y tratamiento fueron sometidos a 15 horas de reperfusión.



isquemia de 60 minutos), todos los grupos control de daño y tratamiento fueron sometidos a 15 horas de reperfusión.

### **3.2.4 Marcadores moleculares**

Con el propósito de complementar los resultados anteriores, se realizó un análisis molecular para evaluar lo que ocurre a nivel de transcripción de genes. Para cumplir con este propósito, se evaluaron genes relacionados a la inducción del proceso de autofagia en todos los grupos de estudio. Se evaluaron los genes más representativos del proceso de autofagia como Beclin-1 y LC3. Sin embargo, no fue apreciable alguna sobre o subexpresión significativa entre los grupos de estudio (Figura 20).

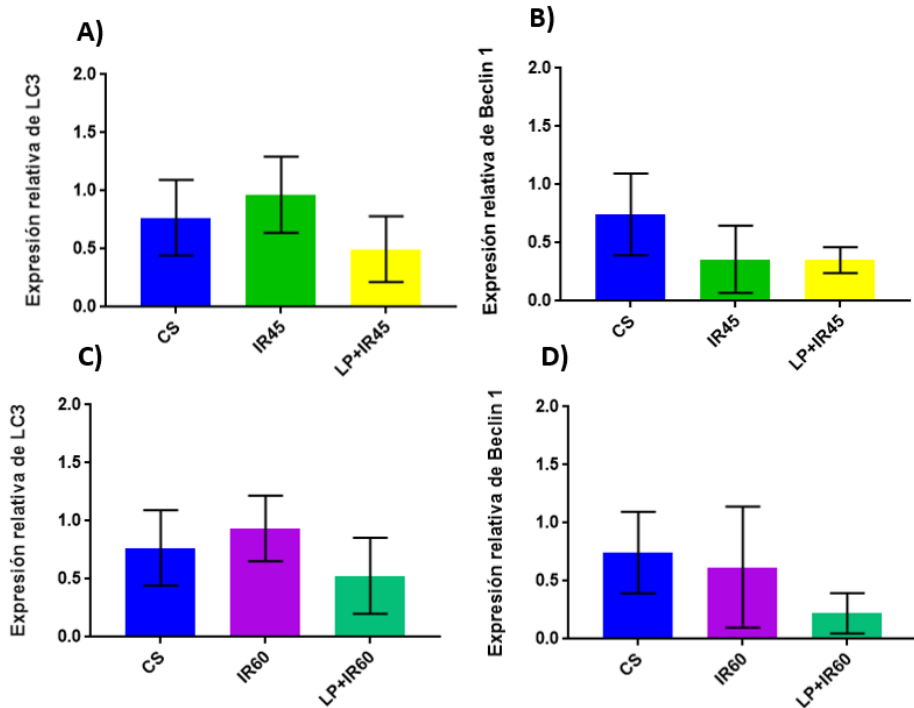


Figura 20. Expresión de genes relacionados con el proceso de autofagia en los diferentes grupos de estudio. Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar. CS (grupo control sano), IR60 (grupo control de daño con isquemia de 60 minutos), LP+IR60 (grupo pretratado con loperamida más daño con isquemia de 60 minutos), IR45 (grupo control de daño con isquemia de 45 minutos), LP+IR45 (grupo pretratado con loperamida más daño con isquemia de 45 minutos), todos los grupos control de daño y tratamiento fueron sometidos a 15 horas de reperusión.

También se estudiaron genes relacionados con el proceso inflamatorio característico del daño por IR. Para ello, se evaluaron los genes de la IL-1 $\beta$  y NF- $\kappa$ B. Con base en los resultados obtenidos, se observó una subexpresión significativa de IL-1 $\beta$  en el grupo LP+IR60 al compararlo con el grupo CS

(Figura 21 C). Por otro lado, hubo una subexpresión de NF- $\kappa$ B en el grupo IR60 al comparar con el grupo CS (Figura 21 D).

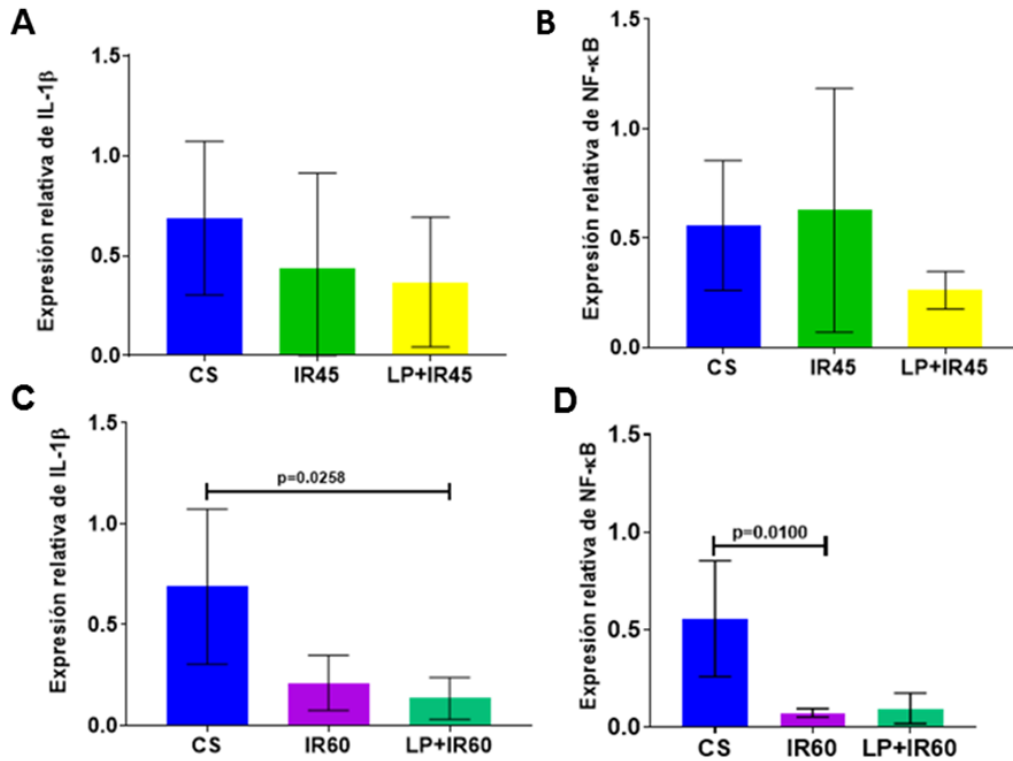


Figura 21. Expresión de genes relacionados al proceso inflamatorio en los grupos de estudio. Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar. CS (grupo control sano), IR60 (grupo control de daño con isquemia de 60 minutos), LP+IR60 (grupo pretratado con loperamida más daño con isquemia de 60 minutos), IR45 (grupo control de daño con isquemia de 45 minutos), LP+IR45 (grupo pretratado con loperamida más daño con isquemia de 45 minutos), todos los grupos control de daño y tratamiento fueron sometidos a 15 horas de perfusión.

Se determinó la expresión de la GPX, dado que la función de esta enzima es importante por el daño oxidativo que también es muy característico con el daño por IR. Los hallazgos más relevantes, demostraron que se presentó una subexpresión en el grupo LP+IR45 al comparar con el grupo CS (Figura 22 A). Mientras que también se observó una subexpresión en el grupo IR60 contra CS (Figura 22 B).

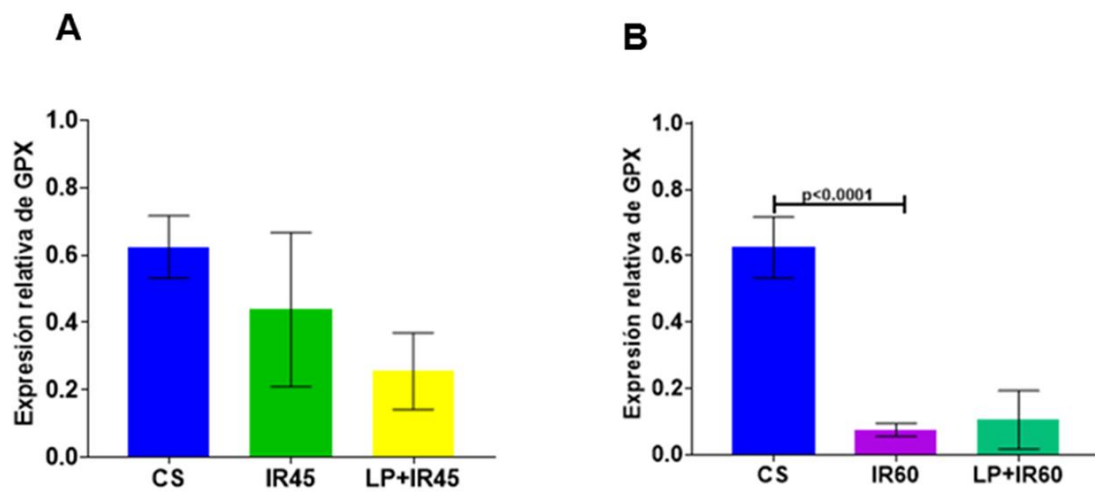


Figura 22. Expresión de GPX en los diferentes grupos de estudio. Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar. CS (grupo control sano), IR60 (grupo control de daño con isquemia de 60 minutos), LP+IR60 (grupo pretratado con loperamida más daño con isquemia de 60 minutos), IR45 (grupo control de daño con isquemia de 45 minutos), LP+IR45 (grupo pretratado con loperamida más daño con isquemia de 45 minutos), todos los grupos control de daño y tratamiento fueron sometidos a 15 horas de reperusión.

### 3.2.5 Análisis histológico

En el análisis histológico se buscó evaluar las condiciones estructurales del tejido renal para el resto de los grupos, además del grupo CS e IR 45 y 60, se evaluaron los grupos pretratados con loperamida como LP+IR45 y LP+IR60. Tanto en los grupos control de daño como los pretratados con loperamida, se hallaron los tres parámetros de daño histológico evaluados. En la figura 23 se muestran imágenes representativas de los grupos control de daño comparándolos con sus respectivos grupos pretratados, haciendo énfasis en la presencia de NTA, donde a simple vista muestran ser muy similares entre sí, a excepción del grupo LP+IR45 que presenta estructuras mejor conservadas.

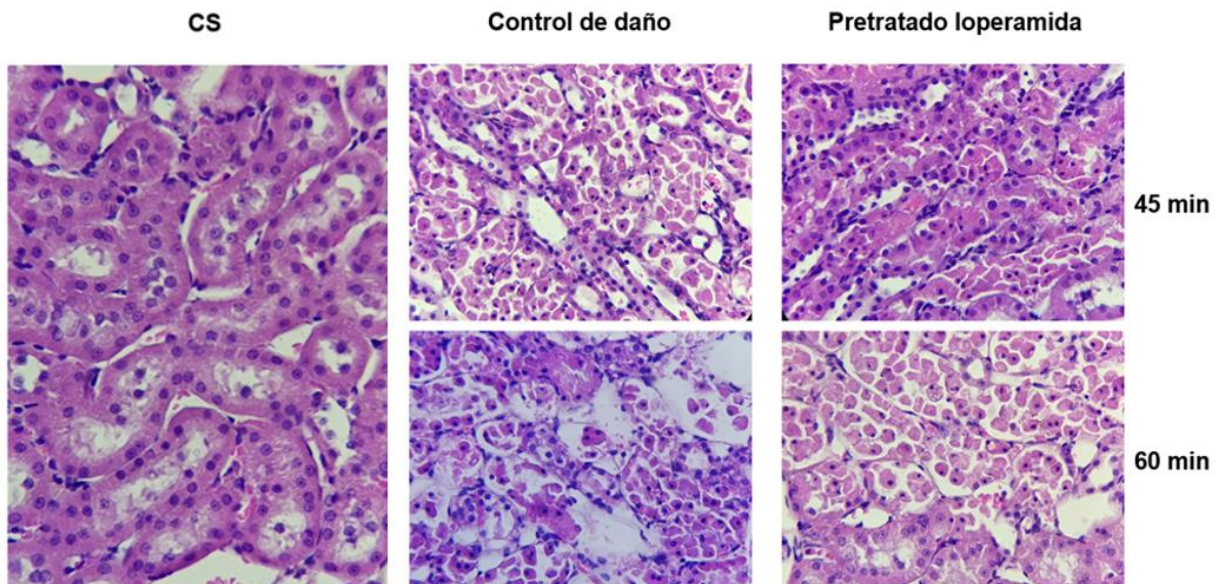


Figura 23. Imágenes representativas de los diferentes grupos de estudio donde se destaca la presencia de NTA. Tinción H&E, las imágenes se observaron con un aumento de 40x.

En la evaluación del grado de NTA y el grado de CP, no se encontraron hallazgos adicionales además de lo que ya se comentó en el apartado 3.1 sobre la evidencia de la alteración en los grupos controles de daño con respecto al grupo CS (Figura 24 y figura 25). Sin embargo, para el caso del grupo LP+IR45 si demostró una mejora en el parámetro de congestión medular al ser comparado con el grupo IR45 (Figura 24 C).

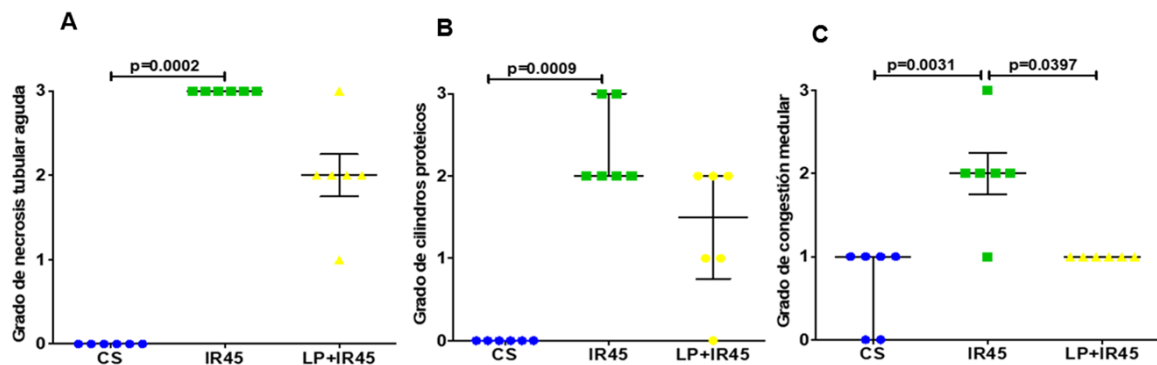


Figura 24. Evaluación histológica en los grupos con 45 minutos de isquemia. A) Grado de NTA, B) Grado de cilindros proteicos, C) Grado de congestión medular. Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar. CS (grupo control sano), IR45 (grupo control de daño con isquemia de 45 minutos), LP+IR45 (grupo pretratado con loperamida más daño con isquemia de 45 minutos), todos los grupos control de daño y tratamiento fueron sometidos a 15 horas de reperfusión.

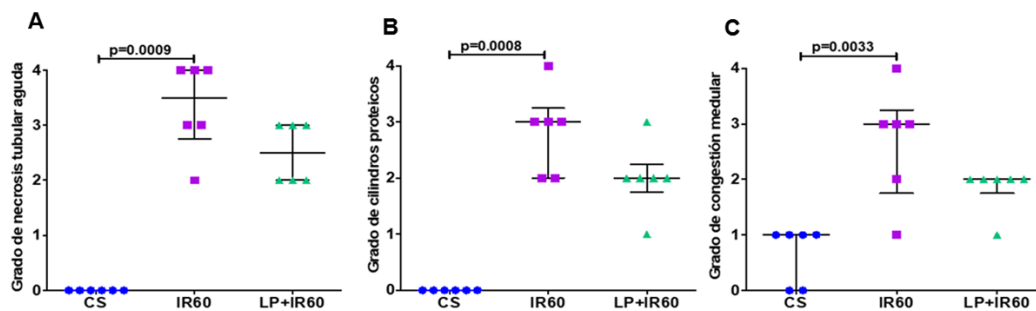


Figura 25. Evaluación histológica en los grupos con 60 minutos de isquemia. A) Grado de NTA, B) Grado de cilindros proteicos, C) Grado de congestión medular. Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar. CS (grupo control sano), IR60 (grupo control de daño con isquemia de 60 minutos), LP+IR60 (grupo pretratado con loperamida más daño con isquemia de 60 minutos), todos los grupos control de daño y tratamiento fueron sometidos a 15 horas de reperfusión.

### 3.3 Perfil metabólico

Se obtuvieron los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (CMPG presat,  $\text{D}_2\text{O}$  10%) de las 30 muestras de suero como se muestra en la figura 26. Dichos espectros recolectados fueron posteriormente analizados para la identificación y cuantificación de metabolitos séricos.

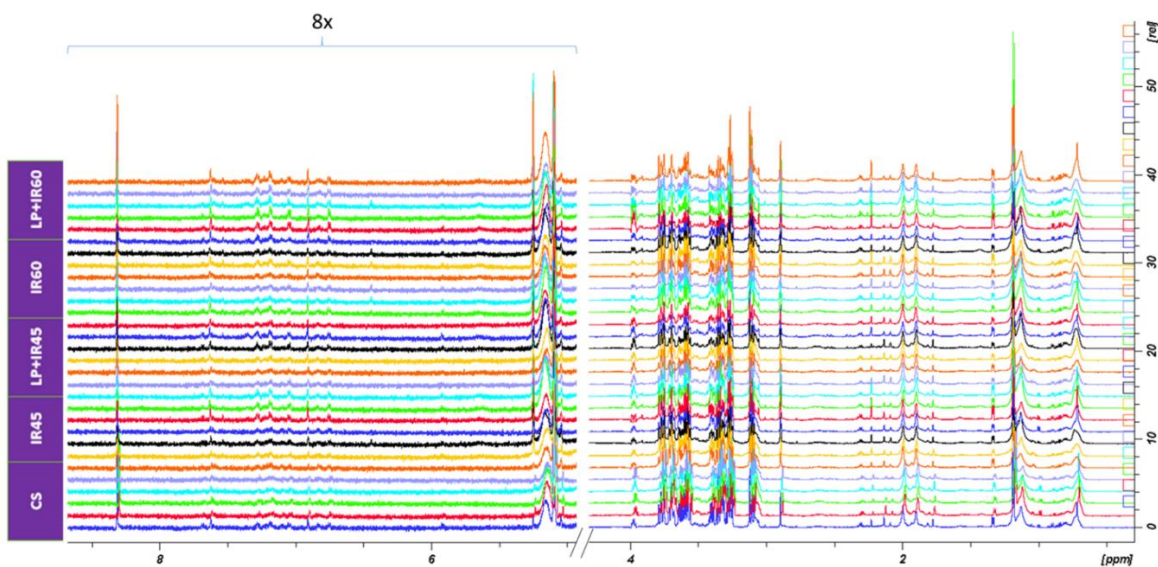


Figura 26. Recopilación de los 30 espectros obtenidos de las muestras de suero de los diversos grupos de estudio.

En los espectros CPMG presat de las muestras de suero de los diversos grupos de estudio fue posible identificar 26 metabolitos presentes en las muestras a partir de la biblioteca de espectros del programa Chenomx y las bases de datos HMDB y BMRB, dichos metabolitos han sido previamente reportados por otros grupos de investigación en suero de ratas en condiciones normales. En la figura 27 se muestra un espectro con la asignación de los metabolitos.



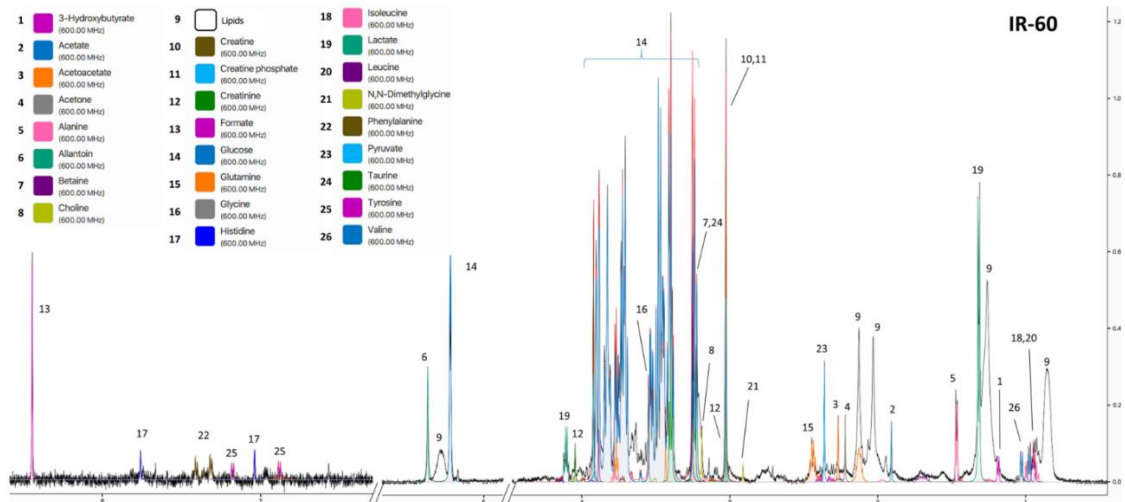


Figura 27. Identificación de los 26 metabolitos en el programa Chenomx de una rata del grupo IR60.

En la figura 28 se muestran los espectros representativos de cada grupo donde se marcan las señales más características de cada metabolito identificado. Se observa cómo es evidente los cambios en la intensidad de algunas señales entre los grupos, por ejemplo, en el caso de la alantoína vemos como aumentó la señal a 5.4 ppm de forma considerable en los grupos de IR45 e IR60 a comparación del grupo CS, mientras que solo en el grupo LP+IR45 disminuyó teniendo una intensidad similar al grupo CS.

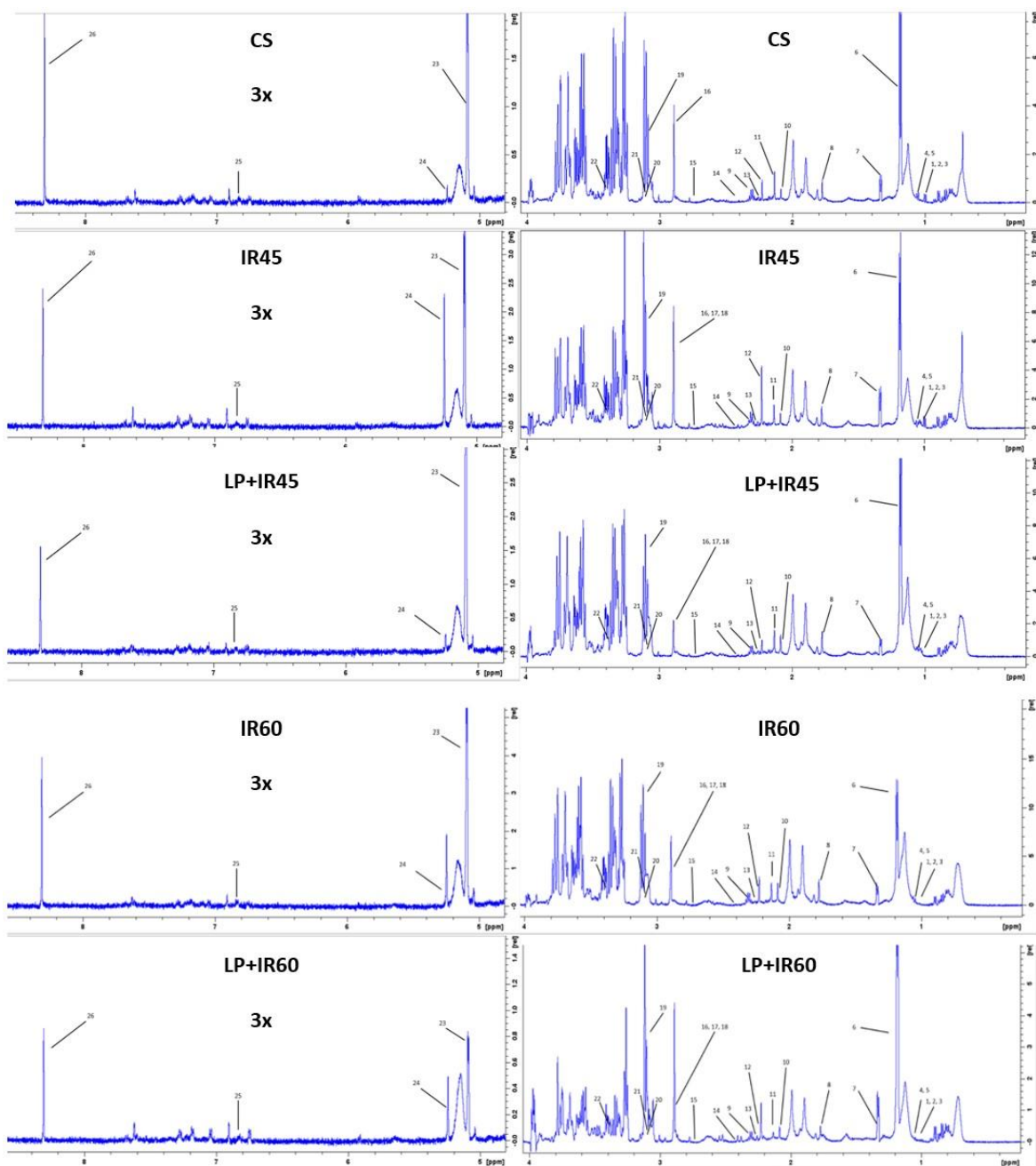


Figura 28. Espectros  $^1\text{H}$ -RMN representativos de cada grupo experimental. 1) isoleucina, 2) leucina, 3) valina, 4) propilenglicol, 5) 3-hidroxi-butirato, 6) lactato, 7) alanina, 8) acetato, 9) glutamina, 10) acetona, 11) acetoacetato, 12) piruvato, 13) succinato, 14) citrato, 15) N,N-dimetilglicina, 16) creatina, 17) creatinina, 18) creatina fosfato, 19) colina, 20) taurina, 21) betaína, 22) glicina, 23) glucosa, 24) alantoína, 25) tirosina, 26) formiato.

Por otro lado, del total de metabolitos identificados, solo fue posible cuantificar 14 metabolitos que cumplían con las condiciones de presentar al menos una señal de buena relación señal/ruido y con poco o ningún solapamiento con señales adyacentes, a excepción del lactato que se determinó mediante deconvolución y cuyos resultados se mostrarán más adelante. En la Tabla VI se indican los metabolitos que fueron cuantificados, mientras que en la figura 29 se muestra un espectro con la integración de algunas de las señales que fueron utilizadas para el análisis por RMNc. En el anexo A se incluyen los resultados de la cuantificación de los metabolitos séricos en los distintos grupos de estudio.

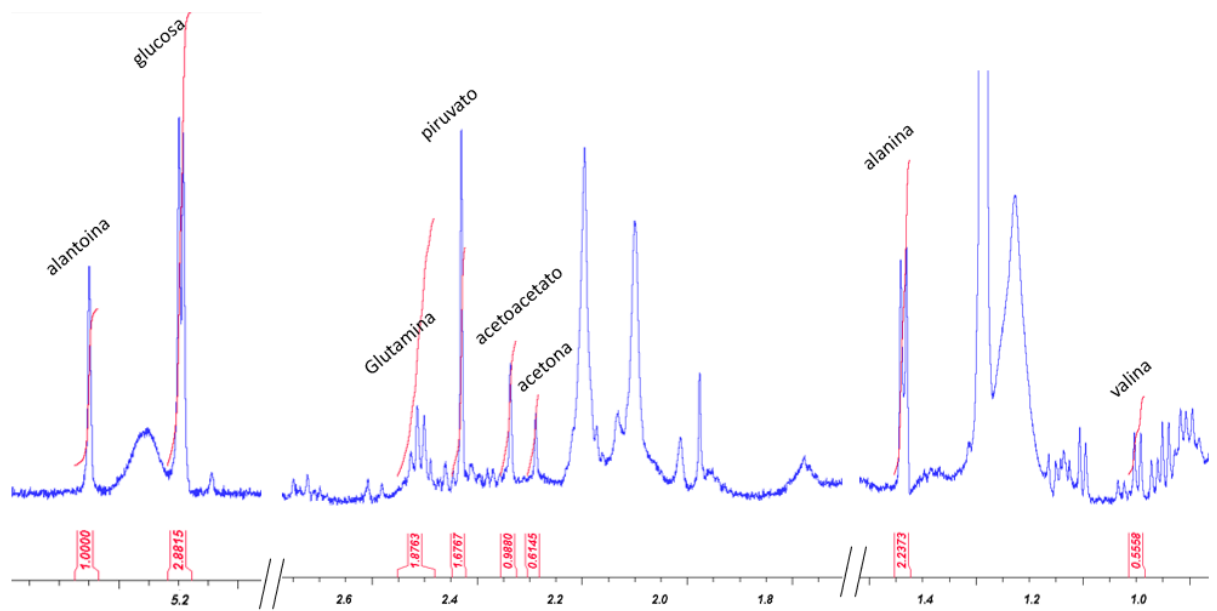


Figura 29. Ejemplo de integración de las señales de algunos metabolitos cuantificados.

Cabe destacar que, en el grupo CS fue posible cuantificar la creatina, con una concentración promedio de 0.365 mM ( $\delta$  3 ppm). Desafortunadamente, en el resto de los grupos ya no fue posible cuantificar la creatina, debido a que la señal se solapaba con la aparición de las señales de creatinina y creatina fosfato.

Tabla VI. Lista de metabolitos cuantificados en las muestras de suero de los diversos grupos de estudio.

<b>Metabolitos cuantificados</b>
Acetato ( $\delta$ 1.9 ppm)
Acetoacetato ( $\delta$ 2.3 ppm)
Acetona ( $\delta$ 2.2 ppm)
Alantoína ( $\delta$ 5.4 ppm)
Formiato ( $\delta$ 8.4 ppm)
Glucosa ( $\delta$ 5.2 ppm)
Glutamina ( $\delta$ 2.5 ppm)
Lactato ( $\delta$ 1.3, 4.1 ppm)
Piruvato ( $\delta$ 2.4 ppm)
Valina ( $\delta$ 1, 2.3 ppm)
Alanina ( $\delta$ 1.5 ppm)
Propilenglicol ( $\delta$ 1.1, 3.5, 3.9 ppm)
N,N-dimetilglicina ( $\delta$ 2.9 ppm)
Citrato ( $\delta$ 2.5 y 2.7 ppm)

Para el caso particular de la señal del lactato (1.3 ppm), que es una señal intensa, pero a la vez, con un problema de traslape importante con una señal de los lípidos. Para realizar la cuantificación del lactato se optó por realizar la integración de la región de traslape con la señal del lactato (1.2 a 1.4 ppm), para posteriormente realizar una deconvolución de toda la señal integrada. Con esta acción se calculó el área bajo la curva que corresponde únicamente a la señal del lactato, teniendo en cuenta que la señal se trata de un doblete, al ser deconvolucionado, el procedimiento de análisis lo divide a su vez como dos singuletes, por lo tanto, se toman en cuenta la integración de ambas señales que en realidad corresponde al doblete del grupo metilo del lactato (Figura 30).

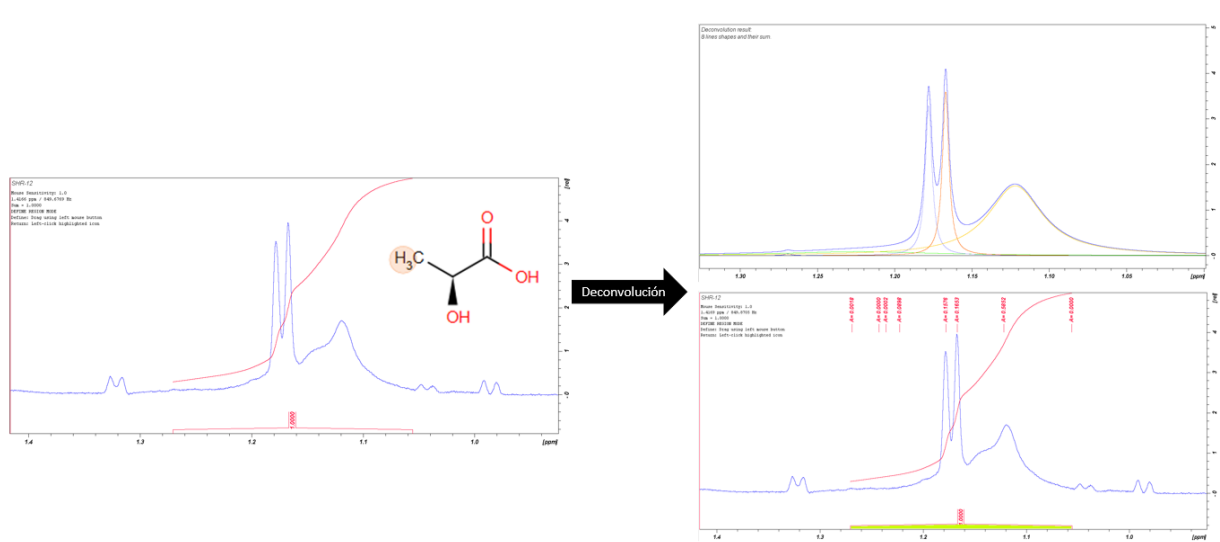


Figura 30. Señal del grupo metilo del lactato que se descompone en señales más sencillas al aplicar la deconvolución.

La concentración total de glucosa fue cuantificada teniendo en consideración que, la señal tomada para la cuantificación de dicho metabolito (5.2 ppm), corresponde a la  $\alpha$ -glucosa que se encuentra a una relación de 36:64 con respecto a la  $\beta$ -glucosa. Por lo tanto, para cuantificar este metabolito, fueron consideradas ambas conformaciones de la glucosa para obtener la concentración total.

Para el caso de los grupos de IR45 y LP+IR45, se observaron incrementos significativos en las concentraciones en los mismos metabolitos (glutamina, piruvato, alantoína, y N,N-dimetilglicina) en el grupo IR45 contra CS, como en el caso de IR60 contra CS. Sin embargo, en el grupo LP+IR45 únicamente se observaron disminuciones significativas en las concentraciones de glucosa y propilenglicol (Figura 31).

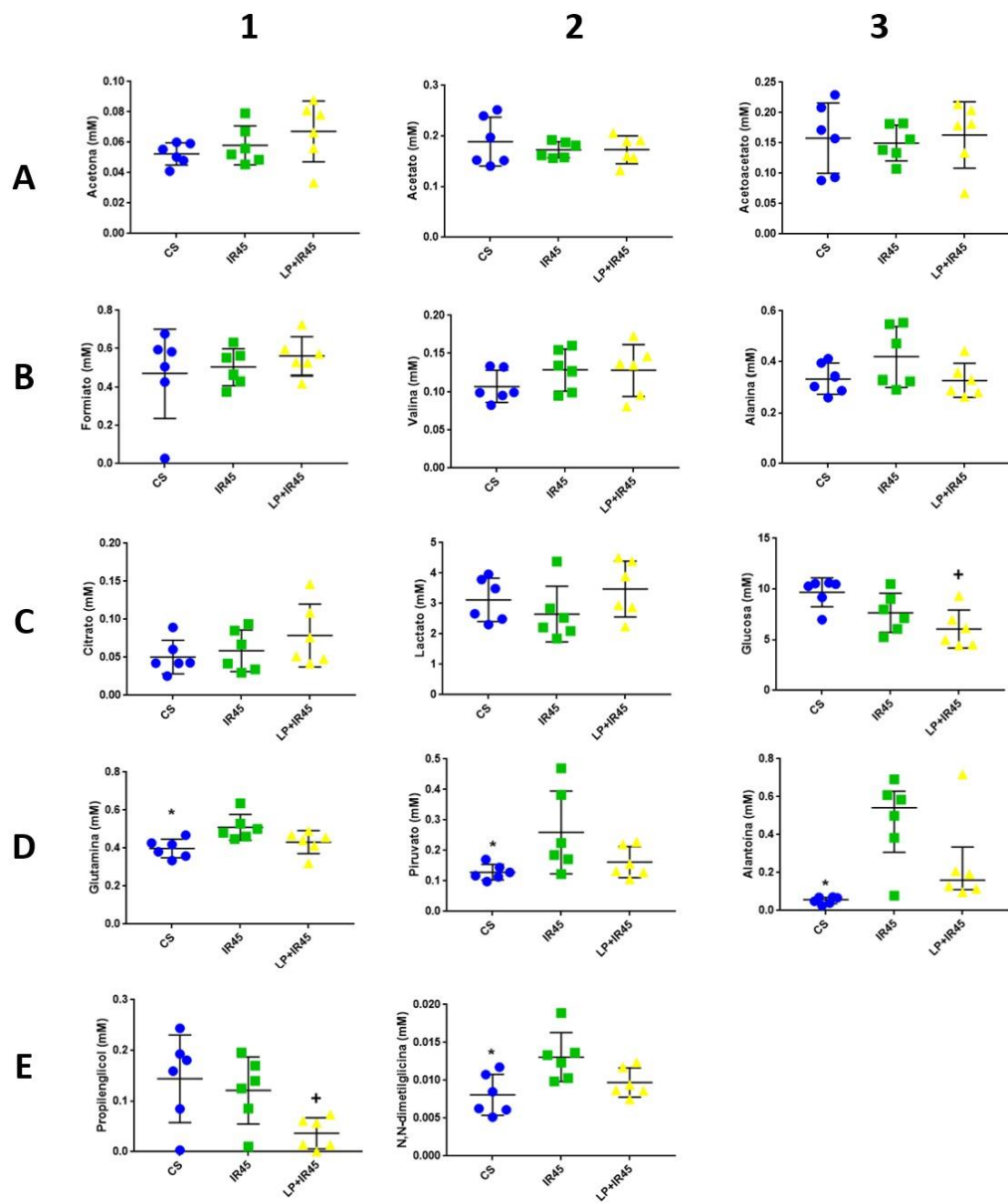


Figura 31. Metabolitos cuantificados en los grupos con 45 minutos de isquemia. A1) Acetona, A2) Acetato, A3) Acetoacetato, B1) Formiato, B2) Valina, B3) Alanina, C1) Citrato, C2) Lactato, C3) Glucosa, D1) Glutamina, D2) Piruvato, D3) Alantoína, E1) Propilenglicol, E2) N,N-dimetilglicina. Comparando con el grupo CS +p< 0.05. Comparando con el grupo IR45 \*p< 0.05.

En la figura 32 se muestran los gráficos correspondientes a los metabolitos cuantificados para los grupos CS, IR60 y LP+IR60. Al realizar las pruebas de comparación múltiple para cada metabolito, no se observan diferencias significativas entre grupos para el caso de la acetona, acetato, acetoacetato, formiato, y propilenglicol. Por otro lado, se observó un aumento significativo en el grupo IR60 al compararlo con el grupo CS para glutamina, piruvato, alantoína, y N,N-dimetilglicina. Adicionalmente, cabe destacar que, el grupo LP+IR60 mostró un aumento significativo de ciertos metabolitos al comparar con el grupo CS como fue en el caso de la valina, alanina, citrato, y lactato. Así mismo, el grupo LP+IR60 mostró una disminución significativa frente al grupo CS en el caso de la glucosa.



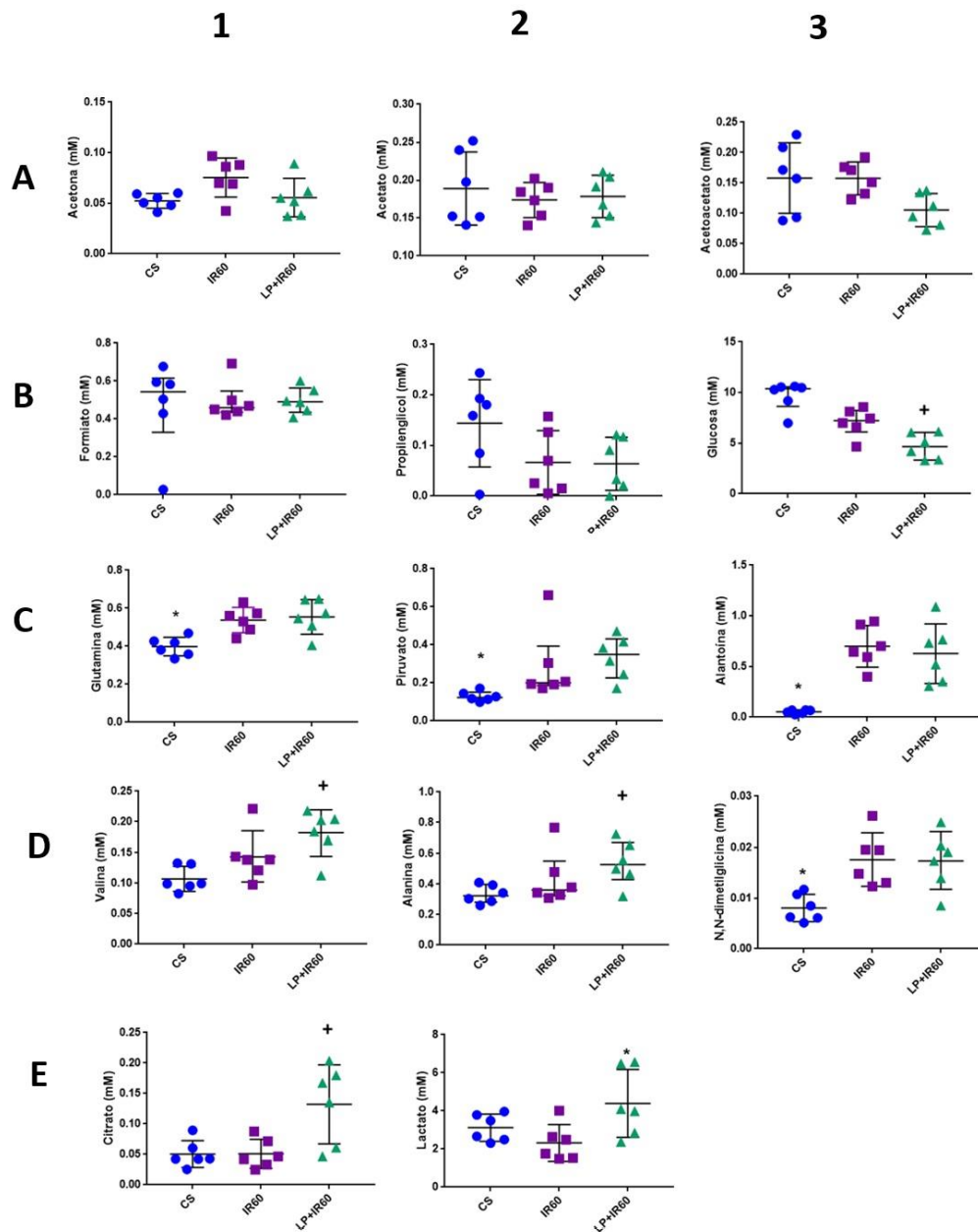


Figura 32. Metabolitos cuantificados en los grupos con 60 minutos de isquemia. A1) Acetona, A2) Acetato, A3) Acetoacetato, B1) Formiato, B2) Propilenglicol, B3) Glucosa, C1) Glutamina, C2) Piruvato, C3) Alantoína, D1) Valina, D2) Alanina, D3) N,N-dimetilglicina, E1) Citrato, E2) Lactato. Comparando con el grupo CS +p< 0.05. Comparando con el grupo IR60 \*p< 0.05.

## CAPÍTULO IV

### 4. Discusión

La IR es un daño implicado en los trasplantes, ocasionando una lesión que puede comprometer la viabilidad del injerto. Es importante la búsqueda y desarrollo de estrategias terapéuticas y de diagnóstico para disminuir el impacto de la IR en la clínica(Kalogeris et al., 2012).

Como primera etapa en este trabajo, consistió en evaluar el modelo de daño y comprobar que dicho modelo sería de utilidad para estudiar lo que ocurre en el daño por IR renal. Cabe destacar que, la isquemia renal y posterior etapa de reperfusión a través del clampaje de las arterias renales en modelos murinos, es ampliamente utilizado en diversos estudios para evaluar la efectividad de potenciales tratamientos contra la lesión por IR(Cura-Esquivel et al., 2018; Kyriakopoulos et al., 2018; Nazarinia et al., 2019; Perez-Meseguer et al., 2019).

Se evaluaron 3 tiempos de isquemia (30, 45 y 60 minutos) utilizados comúnmente en este tipo de estudios en modelos murinos(Dobashi et al., 2000; Kurcer et al., 2007; Uz et al., 2009; Zahran et al., 2015). Por otra parte, únicamente se consideró un tiempo de reperfusión (15 h), siendo un tiempo de reperfusión optimizado previamente por nuestro grupo de trabajo que resulta ser lo suficientemente prolongado para presentar un daño lo suficientemente potente para alterar los marcadores más importantes de daño, pero con una sobrevida de los sujetos de experimentación del 100%(Perez-Meseguer et al.,

2019; Torres-González et al., 2018). El incremento de las concentraciones séricas de creatinina y BUN , permiten identificar el daño renal por la incapacidad del riñón para filtrar estos metabolitos(Arai et al., 2016; Molitoris, 1998). El daño a través de estos marcadores, indican que a partir de 45 minutos de isquemia (IR45) existe daño renal al elevar significativamente las concentraciones de creatinina y BUN. Mientras que, el grupo de 60 de isquemia (IR60) el daño es más exacerbado al aumentar de forma significativa las concentraciones de creatinina con respecto a IR45. Se decidió descartar el grupo IR30 para la evaluación histológica y estudios posteriores, dado que no elevó significativamente los marcadores de daño renal. Así mismo, ya se ha reportado que después de 30 minutos de isquemia renal es cuando apenas se hace evidente la presencia de signos como la NTA(Iglesias et al., 2011). Probablemente podemos atribuir que, con 30 minutos de isquemia no fueron suficientes para observar el estallido respiratorio que ocurre en la etapa de reperfusión, lo cual ya ha sido reportado por otros autores(Willy et al., 2000).

El daño a los túbulos renales se asocia directamente con el aumento del BUN y creatinina en suero, sin embargo, también se asocia con un grado elevado de daño histológico, es decir, en las alteraciones de las estructuras del tejido renal(Chatterjee, 2007). Al evaluar los grupos de IR45 e IR60, se observó una diferencia significativa en dichos grupos al compararlos con el grupo CS. Con lo anterior, se demostró que 45 y 60 min de isquemia con 15 h de reperfusión fueron suficientes para tener un efecto sobre la función y la

estructura del tejido renal, y, por lo tanto, resultaron ser modelos útiles para el estudio de la IR renal.

Como una estrategia para disminuir el daño por IR, se evalúan fármacos con capacidad de actuar en una o varias vías involucradas durante los cambios fisiológicos provocados durante la IR. Los fármacos candidatos como potenciales protectores contra dicho daño, van desde antioxidantes, antiinflamatorios, hasta inductores de la autofagia como es el caso de la LP(Cura-Esquivel et al., 2018; Li & Zheng, 2021; Shen et al., 2018).

Las concentraciones séricas de BUN y creatinina en los grupos pretratados, demostraron que, el grupo LP+IR45 (10 mg/kg) disminuyó significativamente las concentraciones de dichos marcadores, y no así en el grupo de LP+IR60. Por otro lado, con respecto a la evaluación histológica, sólo se observó una mejoría significativa en la CM.

Para el caso particular de la glucosa, ya se tiene reportado por Wei y cols, como dicho marcador disminuye a partir de 2 h de reperfusión con 25 min de isquemia renal bilateral, esto debido a la pérdida de la capacidad del riñón de reabsorber la glucosa(Wei, Xiao, Fogle, & Dong, 2014). Dicho efecto se observó como una tendencia en el grupo de IR45. Sin embargo, en el grupo de IR60 si resultó ser significativa la disminución de la glucosa sérica al compararlo con el grupo CS, lo que también se relaciona con un mayor daño en comparación al grupo IR45. En ambos grupos pretratados la glucosa disminuyó de manera significativa, incluso en el grupo LP+IR60 fue significativamente menor en comparación al IR60, logrando observar un efecto sinérgico; ya se ha

reportado el efecto hipoglucemiante de la loperamida en un modelo murino de diabetes(Tzeng et al., 2003).

Para descartar si existe un efecto hepatotóxico, se determinan las pruebas de daño hepático(M. Levine, O'Connor, Padilla-Jones, & Gerkin, 2016; Ozer, Ratner, Shaw, Bailey, & Schomaker, 2008). En el caso del grupo IR45, únicamente se observó un aumento significativo de la AST al comparar con el grupo CS. Al tratarse de la alteración únicamente de AST y a su vez, este al ser un marcador inespecífico de daño, también puede estarse elevando por el daño renal(Chatterjee et al., 2002), y esto no nos permite discernir cuál es el tipo de daño que propicia en mayor medida su elevación. Sin embargo, en el grupo IR60, es más claro que pudiera estarse presentando una lesión hepática, porque hay una elevación significativa tanto de ALT y AST al comparar con el grupo CS. Lo cual pudiera ser atribuido a lo reportado por Golab y *co/s*, quienes comprobaron que el daño renal mediante isquemia también tiene un efecto en el hígado, produciendo daño tanto oxidativo como inflamatorio en los hepatocitos(Golab et al., 2009). Por otro lado, LP+IR60 disminuyó significativamente ALT, y, por lo tanto, puede indicar un efecto hepatoprotector.

Durante la IR, el daño oxidativo e inflamatorio son los que más impactan en la lesión en el tejido renal(Dobashi et al., 2000; Kelly et al., 1996; Kurcer et al., 2007; Meldrum, Meldrum, Meng, Ao, & Harken, 2002; Salvadori et al., 2017; Uz et al., 2009). Cuando se estudia la lesión por IR, es importante y necesario evaluar aquellos marcadores directos e indirectos asociados al daño por estrés oxidativo, y marcadores asociados al daño inflamatorio, con la finalidad de

ampliar los detalles acerca de cómo predomina este tipo de daño en los distintos modelos de IR, así como para conocer detalles acerca de los efectos de aquellos potenciales tratamientos contra el daño por IR.

Cuando ocurre daño por estrés oxidativo, en el organismo están presentes las defensas antioxidantes quienes se encargarán de contrarrestar el efecto de las ROS(Dobashi et al., 2000). Al determinar los antioxidantes totales séricos, únicamente se observó un aumento significativo en el grupo IR60 al comparar con CS, un efecto que a simple vista parece paradójico, dado que se ha reportado que estos tienden a disminuir durante el proceso de IR renal(Uz et al., 2009). Sin embargo, se ha reportado que en IR intestinal los niveles de antioxidantes totales fluctúan de acuerdo con el tiempo de reperfusión, donde conforme pasa el tiempo estos pueden incrementarse concordando con nuestros resultados elevados por haber sido evaluados post reperfusión(Slavíková et al., 1998).

Al determinar indirectamente la actividad de la SOD, no se encontraron alteraciones significativas a 45 min o 60 min de IR con 15 h de reperfusión. Lo anterior pudiera deberse a que en el grupo IR45, el tiempo de isquemia puede no ser lo suficientemente prolongado para tener efecto en la actividad de SOD ya que solo se ha reportado alteraciones en la actividad de dicha enzima a tiempos más prolongados de isquemia como 60 y 90 min(Dobashi et al., 2000; I. Singh, Gulati, Orak, & Singh, 1993). En la lesión por IR renal se ha establecido que hay un efecto distinto entre la MnSOD y CuZnSOD solo a tiempos prolongados de IR (60-90 min), siendo que la primera aumenta y la segunda

disminuye de forma significativa(Dobashi et al., 2000). Esto pudiera explicar el resultado no significativo de la actividad de esta enzima en el presente estudio ya el ensayo realizado determina indirectamente la actividad total de ambas enzimas (MnSOD y CuZnSOD) presentando una alteración antagónica. Por lo que se sugiere evaluar la actividad de esta enzima aun tiempo más prolongado de IR, como lo ha reportado Singh y *cols* quienes evaluaron la actividad total de SOD a 90 minutos de isquemia con 24 horas de reperfusión, observando una disminución significativa en la actividad de dicha enzima(I. Singh et al., 1993).

Otra estrategia sensible que refleja el daño in vivo inducido por el estrés oxidativo es la determinación de MDA, dado que se considera un biomarcador de la peroxidación lipídica de las membranas celulares(Su et al., 2020). Uz y *cols* reportaron un aumento significativo de MDA en el grupo IR que consistió en 45 min de isquemia renal y 24 h de reperfusión(Uz et al., 2009). Por otra parte, Dobashi y *cols* han reportado que a 60 min de isquemia con 2 h de reperfusión no se observa un incremento de MDA en el grupo IR en comparación con el grupo CS, mientras que a este tiempo de isquemia con 24 h de reperfusión el incremento de MDA es significativo(Dobashi et al., 2000). Por lo tanto, sugerimos que los niveles de MDA encontrados en los grupos IR45 e IR60 no mostraron ningún cambio debido al menor tiempo de reperfusión de 15 horas evaluado en nuestro modelo de daño, por lo que será necesario evaluar este marcador a mayores tiempos de reperfusión.

Respecto a los marcadores inflamatorios se ha reportado que la IL-1 $\beta$  aumenta a 1 y 2 h de reperfusión y regresa a valores basales a las 4 horas en

un modelo de 32 minutos de isquemia(Kelly et al., 1996), por lo cual esto pudiera explicar los valores séricos semejantes observados entre los grupos sano e IR. Por otro lado, se sabe que cuando se combinan tiempos muy largos de IR con un activador de la autofagia, esto conllevaría a una lesión en lugar de una protección contra la IR renal, dado que en este proceso ya hay una inducción de la autofagia por la presencia de las ROS(Decuyper et al., 2015). Esto concuerda con nuestros hallazgos donde en el grupo sometido al proceso de IR y tratamiento con un inductor de la autofagia como la LP se exacerbó los niveles de IL-1 $\beta$  a los 60 min de isquemia.

Un estudio reportó un aumento de la IL-6 durante el periodo post reperfusión a las 2 horas en un modelo de IR renal de 60 min de isquemia con 24 de reperfusión(Kurcer et al., 2007). Esto concuerda con el presente estudio, ya que no se encontró diferencia significativa de esta citocina a las 15 h de reperfusión.

En cuanto al TNF- $\alpha$  se ha reportado que esté solo se eleva en las primeras horas de reperfusión(Meldrum et al., 2002), por lo cual explicaría la semejanza entre los niveles encontrados en los grupos sano e IR para este mediador proinflamatorio que fue evaluado a tiempos más prolongados de reperfusión. Por otro lado se ha descrito que inductores de la autofagia como la rapamicina(Ling et al., 2016) disminuyen los niveles de TNF- $\alpha$  e IL-6 durante la lesión por IR, en este estudio la LP otro inductor de autofagia(Shen et al., 2018; Zielke et al., 2018) solo logró disminuir los niveles de TNF- $\alpha$  y no así los de IL-6



a los 45 min de isquemia con 15 h de reperfusión, lo que pudiera también estar relacionado a los tiempos post reperfusión evaluados.

En cuanto a la expresión relativa de genes asociados a inflamación, estrés oxidativo y autofagia en los grupos de IR45 con y sin tratamiento no se observó ningún cambio significativo entre ellos ni con el grupo control sano, mientras que a los 60 min de isquemia solo se observó una disminución significativa de Nf- $\kappa$ B en IR vs CS. Aunque no se encontró estudios de expresión relativa de este gen en isquemia, otros autores han reportado un aumento en la concentración de NF- $\kappa$ B a partir de los 30 min de isquemia e incrementándose a los 60 min de reperfusión, sin embargo, a partir de los 120 minutos de reperfusión se ha reportado una disminución en la concentración de este marcador(Sung, Zhu, Au-Yeung, Siow, & Karmin, 2002). Esto pudiera explicar porque a las 15 h de reperfusión que nosotros empleamos se observó una subexpresión relativa significativa en el grupo IR60 vs CS.

Por otra parte, respecto a la expresión relativa de GPx se observó una disminución significativa en el grupo LP+IR45 vs CS, pero no contra IR, mientras que a los 60 min de isquemia si se observó una subexpresión de este gen en el grupo IR vs CS. Esto concuerda con lo reportado por Dobashi y *cols*, que reportaron que a los 60 min de isquemia se observa una disminución significativa en la expresión de este gen(Dobashi et al., 2000).

En cuanto al perfil metabólico es interesante hacer notar que los metabolitos cuantificados que mostraron diferencias significativas entre el grupo

CS respecto a los grupos de IR de 45 y 60 minutos de isquemia fueron alantoína, piruvato, N,N-dimetilglicina, y glutamina.

La alantoína es considerada un marcador de estrés oxidativo, dado que es un producto metabólico final del ácido úrico y, por lo tanto, del metabolismo de la xantina que es fuertemente estimulada durante los periodos de reperfusión(Granger, 2017). Sin embargo, es necesario tener en consideración que la uricasa (enzima que cataliza la reacción del ácido úrico a la alantoína) está presente en mamíferos como la rata, pero en humanos no se ha descrito la actividad de dicha enzima. Se ha reportado la presencia de alantoína en humanos y esto podría ser posible mediante una reacción secundaria no enzimática, que involucra la reacción entre el ácido úrico y el peróxido de hidrógeno(Serkova, Fuller, Klawitter, Preise, & Niemann, 2005). La alantoína se elevó de forma significativa en el grupo IR60 e IR45 al compararlos con el grupo CS, este aumento ya había sido reportado por Malagrino y cols a 30 minutos de isquemia renal y 6 horas de reperfusión(Malagrino et al., 2016).

La glutamina es el aminoácido libre de mayor abundancia en el cuerpo y su fuente principal es el músculo esquelético desde donde se libera al torrente sanguíneo y se transporta a una variedad de tejidos. Tiene un papel esencial, ya que promueve y mantiene la función de varios órganos como el riñón(Esposito et al., 2011). Este aminoácido también es de utilidad como un marcador en la activación de linfocitos y también es utilizado como sustrato para la producción de glutatión(Roth et al., 2002). En este estudio, la glutamina también se elevó significativamente en ambos grupos de daño isquémico al

compararlos con el grupo CS lo cual concuerda con lo reportado por Malagrino y cols quienes observaron la elevación de este marcador, principalmente también en la etapa de isquemia(Malagrino et al., 2016).

La N,N-dimetilglicina es un aminoácido derivado de la glicina que se encuentra en el cuerpo en cantidades pequeñas. Actúa como mediador en numerosos procesos bioquímicos y es precursor del aminoácido metionina. Los niveles de N,N-dimetilglicina fueron significativamente mayores en los grupos de IR45 e IR60 al comparar con el grupo CS, lo que concuerda con lo reportado por Malagrino y cols quienes observaron el mismo efecto a las 6 horas de reperfusión(Malagrino et al., 2016).

El piruvato es un producto de la glucólisis y necesario para la posterior producción de ATP. Este marcador aumentó significativamente en los grupos IR de 45 y 60 minutos en comparación del grupo CS. Malagrino y cols reportaron que este marcador también aumenta a las 6 horas de reperfusión(Malagrino et al., 2016). Dicho aumento, puede presentarse como una respuesta a la lesión donde se conserven las funciones aeróbicas, y que por otra parte, se puede relacionar con una pérdida de la LDH por la lisis celular(Nielsen, Qi, Bertelsen, & Laustsen, 2020).

Por otro lado, es relevante hacer notar que, en el grupo con tratamiento con LP e isquemia de 60 minutos, el perfil metabólico solo diferenció a este con respecto al CS y no contra el grupo IR. Este grupo mostró un aumento significativo en la concentración de lactato al compararlo con el CS. Dado que durante la isquemia hay un período de hipoxia que compromete la formación de

ATP por la vía de la cadena respiratoria, esto conduce a una forma compensatoria que consiste en catalizar la reacción del piruvato a lactato por la LDH(Chatauret, Badet, Barrou, & Hauet, 2014). Se ha reportado como las concentraciones de lactato aumentan mientras que los de piruvato disminuyen durante el proceso de isquemia previo a la reperfusión (Zager, Johnson, & Becker, 2014).

Otros metabolitos como la alanina y valina se elevaron sólo en el grupo LP+IR60 al compararlo con el grupo CS. Estos se relacionan con reacciones tanto catabólicas como anabólicas que producen metabolitos que normalmente se consumen durante el metabolismo mitocondrial. Al considerar que en el grupo LP+IR60 al estar pretratado con un fármaco con actividad reportada como inductor de la autofagia, esto explicaría el aumento de ambos metabolitos, ya que como se ha descrito hay una pérdida de mitocondrias durante los procesos de IR y autofagia lo que provoca la acumulación de valina y alanina(Chihanga et al., 2018).

El citrato es un ácido orgánico que se filtra libremente a través del glomérulo y su regulación es mediante la reabsorción tubular. Una vez reabsorbido, se metaboliza en la mitocondria para entrar al ciclo de los ácidos tricarbónicos(Hauet et al., 2000). En este estudio solo se observó un aumento en los niveles de citrato en el grupo LP+IR60 lo que podría estar asociado a un incremento de la afección de la función renal, así como con en el daño mitocondrial que se presentó en este grupo tratado con el periodo más largo de isquemia y donde al parecer la LP no protegió al riñón, esto al comparado con

el grupo CS. Otros autores han descrito que este metabolito se incrementa también en el daño por IR con una elevación máxima a las 6 horas de reperfusión(Malagrino et al., 2016). Cabe mencionar que en otros modelos de daño renal con ácido fólico e IR se determinó que el citrato se disminuye en orina de ratas con diversos grados de enfermedad renal crónica(Perales-Quintana et al., 2019), esto concuerda con nuestros hallazgos contrarios, al aumentar este metabolito a nivel sérico.

Llama la atención que al cuantificarse los niveles de glucosa por la técnica convencional de espectroscopia UV se observó el mismo patrón para este metabolito a través del perfil metabólico por RMN en todos los grupos de estudio, sin embargo solo se observó una disminución significativa de la glucosa principalmente en los grupos con tratamiento independientemente del tiempo de isquemia contra el CS, esto concuerda con lo ya reportado previamente para la LP de su potencial efecto hipoglucemiante(Tzeng et al., 2003). Otros autores han reportado un fluctuación de los niveles de glucosa dependiente del tiempo de reperfusión, encontrándose un aumento de dicho marcador al tiempo a las 6 horas y disminuyendo a las 11 h de reperfusión(Malagrino et al., 2016), esto último concuerda con el presente estudio donde a las 15 h de reperfusión de los grupos con tratamiento también se observó una disminución significativa de este marcador.

Los niveles de propilenglicol fueron significativamente menores en el grupo LP+IR45 al compararlo con el grupo CS. La disminución pudiera asociarse al efecto hipoglucemiante del fármaco, dado que se ha reportado que

el propilenglicol a bajas dosis tiene la capacidad de inducir la gluconeogénesis y por ende aumentar la utilización del propilenglicol para la generación de más glucosa(Wittman & Bawin, 1974).

## CAPÍTULO V

### 5. Conclusiones

Se logró desarrollar un modelo de daño renal por IR a los tiempos de 45 y 60 minutos de isquemia en ratas Wistar en el cual los niveles de BUN y creatinina mostraron ser los mejores marcadores bioquímicos de daño renal y confirmado histológicamente.

Se demostró la actividad nefroprotectora de la LP solo a los 45 minutos de isquemia.

A los tiempos de IR evaluados no se logró evidenciar la participación de los mediadores de inflamación, de autofagia, ni de estrés oxidativo ya que solo los antioxidantes totales permitieron diferenciar al grupo CS de los de IR.

El perfil metabólico por RMN identificó 26 metabolitos séricos en los grupos sometidos a daño, con y sin tratamiento. De los cuales 14 pudieron ser cuantificados mediante el método de estándar externo.

Los metabolitos que permitieron diferenciar entre el CS y los grupos con IR fueron: alantoína, glutamina, NN-dimetilglicina y piruvato.

Solo la alantoína permitió diferenciar al grupo IR vs LP-IR45

Los metabolitos que permitieron diferenciar CS del grupo LP+IR60 fueron: alanina, valina, lactato y citrato, estos han sido descritos como marcadores de daño renal lo que sugiere que la LP no protegió contra el daño por IR a los 60 minutos de isquemia.

## CAPÍTULO VI

### **Perspectivas**

Comprobar la actividad de la autofagia en los grupos pretratados con LP mediante western blot.

Realizar el análisis metabolómico de los espectros previamente obtenidos en la búsqueda más información a través de la estadística multivariable.

Evaluar un modelo de IR renal de 60 minutos de isquemia y 24 horas de reperfusión, para evaluar la capacidad de distinguir diferencias en los marcadores inflamatorios, de autofagia y de estrés oxidativo.



## Referencias

- Arai, S., Kitada, K., Yamazaki, T., Takai, R., Zhang, X., Tsugawa, Y., ... Miyazaki, T. (2016). Apoptosis inhibitor of macrophage protein enhances intraluminal debris clearance and ameliorates acute kidney injury in mice. *Nature Medicine*, 22(2), 183–193. <https://doi.org/10.1038/nm.4012>
- Aránguiz Urroz, P., Contreras Ferrat, A., Rojas Rivera, D., Troncoso Cotal, R., Marambio Morales, P., Toro, B., ... Lavandero González, S. (2006). Autofagia del cardiomiocito: ¿Un nuevo mecanismo de adaptación al estrés o de muerte celular?, 25, 331–338.
- Bayrak, O., Bavbek, N., Karatas, O. F., Bayrak, R., Catal, F., Cimentepe, E., ... Akcay, A. (2008). Nigella sativa protects against ischaemia/reperfusion injury in rat kidneys. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 23(7), 2206–2212. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfm953>
- Beckonert, O., Keun, H. C., Ebbels, T. M. D., 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. *Nature Protocols*, 2(11), 2692–2703. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.376>
- Bugger, H., & Pfeil, K. (2020). Mitochondrial ROS in myocardial ischemia reperfusion and remodeling. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165768>
- Chatauret, N., Badet, L., Barrou, B., & Hauet, T. (2014). Ischemia-reperfusion:

From cell biology to acute kidney injury. *Progres En Urologie*, 24(SUPPL.1), S4–S12. [https://doi.org/10.1016/S1166-7087\(14\)70057-0](https://doi.org/10.1016/S1166-7087(14)70057-0)

Chatterjee, P. K. (2007). Novel pharmacological approaches to the treatment of renal ischemia-reperfusion injury: A comprehensive review. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 376(1–2), 1–43. <https://doi.org/10.1007/s00210-007-0183-5>

Chatterjee, P. K., Patel, N. S. A., Kvale, E. O., Cuzzocrea, S., Brown, P. A. J., Stewart, K. N., ... Thiemermann, C. (2002). Inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney International*, 61(3), 862–871. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2002.00234.x>

Chen, T. K., Knicely, D. H., & Grams, M. E. (2019). Chronic Kidney Disease Diagnosis and Management: A Review. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 322(13), 1294–1304. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.14745>

Chihanga, T., Ma, Q., Nicholson, J. D., Ruby, H. N., Edelman, R. E., Devarajan, P., & Kennedy, M. A. (2018). NMR spectroscopy and electron microscopy identification of metabolic and ultrastructural changes to the kidney following ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 314(2), F154–F166. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00363.2017>

Cooper, J. E., & Wiseman, A. C. (2013). Acute kidney injury in kidney

transplantation. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 22(6), 698–703. <https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e328365b388>

Cura-Esquivel, I., Delgado-Chávez, E. N., García-Narro, J. H., Torres-González, L., Alarcón-Galván, G., Moreno-Peña, D. P., ... Cordero-Pérez, P. (2018). Attenuation of pro-inflammatory cytokines and oxidative stress by misoprostol in renal ischemia/reperfusion in rats. *Pharmazie*, 73(9), 537–540. <https://doi.org/10.1691/ph.2018/8498>

De Duve, C. (1966). FUNCTIONS OF LYSOSOMES. *Annu Rev Physiol*, 435–492.

Decuypere, J. P., Ceulemans, L. J., Agostinis, P., Monbaliu, D., Naesens, M., Pirenne, J., & Jochmans, I. (2015). Autophagy and the kidney: Implications for ischemia-reperfusion injury and therapy. *American Journal of Kidney Diseases*, 66(4), 699–709. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2015.05.021>

Denayer, T., Stöhrn, T., & Van Roy, M. (2014). Animal models in translational medicine: Validation and prediction. *New Horizons in Translational Medicine*, 2(1), 5–11. <https://doi.org/10.1016/j.nhtm.2014.08.001>

Día Mundial de la Hipertensión 2020 - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud. (n.d.). Retrieved August 1, 2021, from <https://www.paho.org/es/campanas/dia-mundial-hipertension-2020>

Diabetes. (n.d.). Retrieved August 1, 2021, from <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>

Dobashi, K., Ghosh, B., Orak, J. K., Singh, I., & Singh, A. K. (2000). Kidney

ischemia-reperfusion: Modulation of antioxidant defenses. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 205(1–2), 1–11.

<https://doi.org/10.1023/A:1007047505107>

Esposito, E., Mondello, S., Di Paola, R., Mazzon, E., Italiano, D., Paterniti, I., ... Cuzzocrea, S. (2011). Glutamine contributes to ameliorate inflammation after renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 383(5), 493–508.

<https://doi.org/10.1007/s00210-011-0610-5>

Estadísticas | Centro Nacional de Trasplantes | Gobierno | gob.mx. (n.d.).

Retrieved May 29, 2022, from

<https://www.gob.mx/cenatra/documentos/estadisticas-50060>

Farrar, C. A., Asgari, E., Schwaeble, W. J., & Sacks, S. H. (2012). Which pathways trigger the role of complement in ischemia/reperfusion injury? *Frontiers in Immunology*, 3(NOV), 1–6.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00341>

Golab, F., Kadkhodae, M., Zahmatkesh, M., Hedayati, M., Arab, H., Schuster, R., ... Soleimani, M. (2009). Ischemic and non-ischemic acute kidney injury cause hepatic damage. *Kidney International*, 75(8), 783–792.

<https://doi.org/10.1038/ki.2008.683>

Gottlieb, R. A., & Mentzer, R. M. (2010). Autophagy During Cardiac Stress: Joys and Frustrations of Autophagy. *Annual Review of Physiology*, 72(1), 45–59.

<https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135757>

- Granger, D. N. (2017). Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 255(6), H1269–H1275.  
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.1988.255.6.h1269>
- Green, D. R., Galluzzi, L., & Kroemer, G. (2011). Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science*, 333(6046), 1109–1112. <https://doi.org/10.1126/science.1201940>
- 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.  
<https://doi.org/10.1006/cryo.2000.2291>
- Hnilicová, P., Bittšanský, M., & Dobrota, D. (2014). Optimization of brain T2 mapping using standard CPMG sequence in a clinical scanner. *Measurement Science Review*, 14(2), 117–125. <https://doi.org/10.2478/msr-2014-0016>
- Iglesias, A. F., Núñez, L. G., Fernández, J. L. C., Salgueiro, S. R., & Febles, E. S. (2011). Poscondicionamiento con ozono en un modelo de isquemia-reperfusión renal . Pruebas funcionales y morfológicas.  
<https://doi.org/10.3265/Nefrologia.pre2011.M>
- Iheagwam, F. N., Ogunlana, O. O., Ogunlana, O. E., Isewon, I., & Oyelade, J. (2019). Potential Anti-Cancer Flavonoids Isolated From *Caesalpinia*

bonduc Young Twigs and Leaves: Molecular Docking and In Silico Studies .  
*Bioinformatics and Biology Insights*, 13, 117793221882137.

<https://doi.org/10.1177/1177932218821371>

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), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163021>

Kalogeris, T., Baines, C. P., Krenz, M., & Korthuis, R. J. (2012). *Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury. International Review of Cell and Molecular Biology* (1st ed., Vol. 298). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394309-5.00006-7>

Kelly, K. J., Williams, W. W., Colvin, R. B., Meehan, S. M., Springer, T. A., Gutiérrez-Ramos, J. C., & Bonventre, J. V. (1996). Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are protected against ischemic renal injury. *Journal of Clinical Investigation*, 97(4), 1056–1063.  
<https://doi.org/10.1172/JCI118498>

Kobuchi, S., Shintani, T., Sugiura, T., Tanaka, R., Suzuki, R., Tsutsui, H., ... Matsumura, Y. (2009). Renoprotective effects of  $\gamma$ -aminobutyric acid on ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats. *European Journal of Pharmacology*, 623(1–3), 113–118.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.09.023>

Kruger, N. J. (1994). The Bradford method for protein quantitation. *Methods in*

*Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 32, 9–15. <https://doi.org/10.1385/1-59259-169-8:15>

Kurcer, Z., Oguz, E., Ozbilge, H., Baba, F., Aksoy, N., Çelik, H., ... Gezen, M. R. (2007). Melatonin protects from ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats: This effect is not mediated by proinflammatory cytokines. *Journal of Pineal Research*, 43(2), 172–178. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2007.00459.x>

Kyriakopoulos, G., Tsaroucha, A. K., Valsami, G., Lambropoulou, M., Kostomitsopoulos, N., Christodoulou, E., ... Simopoulos, C. E. (2018). Silibinin Improves TNF- $\alpha$  and M30 Expression and Histological Parameters in Rat Kidneys After Hepatic Ischemia/Reperfusion. *Journal of Investigative Surgery*, 31(3), 201–209. <https://doi.org/10.1080/08941939.2017.1308044>

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. *Analytical Chemistry*, 89(17), 8582–8588. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b02354>

Levine, B., & Kroemer, G. (2008). Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell*, 132(1), 27–42. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.018>

Levine, M., O'Connor, A. D., Padilla-Jones, A., & Gerkin, R. D. (2016). Comparison of Prothrombin Time and Aspartate Aminotransferase in Predicting Hepatotoxicity After Acetaminophen Overdose. *Journal of Medical Toxicology*, 12(1), 100–106. <https://doi.org/10.1007/s13181-015->

0504-x

- Li, M., & Zheng, Z. (2021). Protective effect of Parecoxib Sodium against Ischemia Reperfusion-induced Intestinal Injury. *Molecular Medicine Reports*, 24(5). <https://doi.org/10.3892/mmr.2021.12416>
- Ling, H., Chen, H., Wei, M., Meng, X., Yu, Y., & Xie, K. (2016). The Effect of Autophagy on Inflammation Cytokines in Renal Ischemia/Reperfusion Injury. *Inflammation*, 39(1), 347–356. <https://doi.org/10.1007/s10753-015-0255-5>
- Ma, S., Wang, Y., Chen, Y., & Cao, F. (2015). The role of the autophagy in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1852(2), 271–276. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.05.010>
- Malagrino, P. A., Venturini, G., Yogi, P. S., Dariolli, R., Padilha, K., Kiers, B., ... Pereira, A. C. (2016). *Metabolomic characterization of renal ischemia and reperfusion in a swine model*. *Life Sciences* (Vol. 156). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.05.025>
- 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: Bridging Education and Research*, 38 A(5), 197–220. <https://doi.org/10.1002/cmr.a.20223>
- Meldrum, K. K., Meldrum, D. R., Meng, X., Ao, L., & Harken, A. H. (2002). TNF-



$\alpha$ -dependent bilateral renal injury is induced by unilateral renal ischemia-reperfusion. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 282(2 51-2), 540–546.

<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00072.2001>

Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M., & Klionsky, D. J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 451(7182), 1069–1075. <https://doi.org/10.1038/nature06639>

Molitoris, B. A. (1998). Mechanisms of cellular injury in ischemic acute renal failure. *Semin Nephrol*, 18(5), 490–497.

Nazarinia, D., Aboutaleb, N., Gholamzadeh, R., Nasser Maleki, S., Mokhtari, B., & Nikougoftar, M. (2019). *Conditioned medium obtained from human amniotic mesenchymal stem cells attenuates focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats by targeting mTOR pathway*. *Journal of Chemical Neuroanatomy* (Vol. 102). Elsevier B.V.  
<https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2019.101707>

Nielsen, P. M., Qi, H., Bertelsen, L. B., & Laustsen, C. (2020). Metabolic reprogramming associated with progression of renal ischemia reperfusion injury assessed with hyperpolarized [1-13C]pyruvate. *Scientific Reports*, 10(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65816-1>

Olthof, P. B., van Golen, R. F., Meijer, B., van Beek, A. A., Bennink, R. J., Verheij, J., ... Heger, M. (2017). Warm ischemia time-dependent variation in liver damage, inflammation, and function in hepatic ischemia/reperfusion

injury. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1863(2), 375–385. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.10.022>

Ozer, J., Ratner, M., Shaw, M., Bailey, W., & Schomaker, S. (2008). The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology*, 245(3), 194–205. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.11.021>

Perales-Quintana, M. M., Saucedo, A. L., Lucio-Gutiérrez, J. R., Waksman, N., Alarcon-Galvan, G., Govea-Torres, G., ... Cordero-Pérez, P. (2019). Metabolomic and biochemical characterization of a new model of the transition of acute kidney injury to chronic kidney disease induced by folic acid. *PeerJ*, 7, 1–26. <https://doi.org/10.7717/peerj.7113>

Perez-Meseguer, J., Torres-González, L., Gutiérrez-González, J. A., Alarcón-Galván, G., Zapata-Chavira, H., Waksman-De Torres, N., ... Cordero-Pérez, P. (2019). Anti-inflammatory and nephroprotective activity of *Juglans mollis* against renal ischemia-reperfusion damage in a Wistar rat model. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 19(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2604-7>

Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, R. G. (2004). Delayed graft function in kidney transplantation. *Current Opinion in Organ Transplantation*, 24(1), 82–86. <https://doi.org/10.1097/MOT.0000000000000604>

Ponticelli, C. (2014). Ischaemia-reperfusion injury: a major protagonist in kidney transplantation. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 29(6), 1134–1140. <https://doi.org/10.1093/ndt/gft488>

- Ponticelli, Claudio. (2014). Ischaemia-reperfusion injury: A major protagonist in kidney transplantation. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 29(6), 1134–1140. <https://doi.org/10.1093/ndt/gft488>
- Prathapasinghe, G. A., Siow, Y. L., Xu, Z., & Karmin, O. (2008). Inhibition of cystathionine- $\beta$ -synthase activity during renal ischemia-reperfusion: Role of pH and nitric oxide. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 295(4), 912–922. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00040.2008>
- Ran, Z., An, Y., Zhou, J., Yang, J., Zhang, Y., Yang, J., ... Li, R. (2021). Subchronic exposure to concentrated ambient PM<sub>2.5</sub> perturbs gut and lung microbiota as well as metabolic profiles in mice. *Environmental Pollution*, 272, 115987. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2020.115987>
- Roth, E., Oehler, R., Manhart, N., Exner, R., Wessner, B., Strasser, E., & Spittler, A. (2002). Regulative potential of glutamine - Relation to glutathione metabolism. *Nutrition*, 18(3), 217–221. [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(01\)00797-3](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(01)00797-3)
- Salvadori, M., Rosso, G., & Bertoni, E. (2017). Update on ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation: Pathogenesis and treatment. *World Journal of Transplantation*, 5(2), 52. <https://doi.org/10.5500/wjt.v5.i2.52>
- Serkova, N., Fuller, T. F., Klawitter, J., Preise, C. E., & Niemann, C. U. (2005). <sup>1</sup>H-NMR-based metabolic signatures of mild and severe ischemia/reperfusion injury in rat kidney transplants. *Kidney International*, 67(3), 1142–1151. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00181.x>

- Shen, H., Yao, Z., Zhao, W., Zhang, Y., Yao, C., & Tong, C. (2018). miR-21 enhances the protective effect of loperamide on rat cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation, reactive oxygen species production and apoptosis via regulating Akap8 and Bard1 expression. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 1312–1320. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.7047>
- Simmler, C., Napolitano, J. G., McAlpine, J. B., Chen, S. N., & Pauli, G. F. (2014). Universal quantitative NMR analysis of complex natural samples. *Current Opinion in Biotechnology*, 25, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.08.004>
- Singh, A. P., Singh, N., & Bedi, P. M. S. (2017). Estradiol mitigates ischemia reperfusion-induced acute renal failure through NMDA receptor antagonism in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 434(1–2), 33–40. <https://doi.org/10.1007/s11010-017-3034-9>
- Singh, I., Gulati, S., Orak, J. K., & Singh, A. K. (1993). Expression of antioxidant enzymes in rat kidney during ischemia-reperfusion injury. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 125(2), 97–104. <https://doi.org/10.1007/BF00936438>
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2008). *Principios de análisis instrumental* (6a ed.). México, D.F.: CENGAGE Learning.
- Slavíková, H., Lojek, A., Hamar, J., Dusková, M., Kubala, L., Vondráček, J., & Cí Z, M. (1998). Total antioxidant capacity of serum increased in early but not late period after intestinal ischemia in rats. *Free Radical Biology and Medicine*, 25(1), 9–18. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00030-6](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00030-6)

- Slegtenhorst, B. R., Dor, F. J. M. F., Rodriguez, H., Voskuil, F. J., & Tullius, S. G. (2014). Ischemia/Reperfusion Injury and its Consequences on Immunity and Inflammation. *Current Transplantation Reports*, 1(3), 147–154.  
<https://doi.org/10.1007/s40472-014-0017-6>
- Smolinska, A., Blanchet, L., Buydens, L. M. C., & 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.  
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.05.049>
- Su, D., Li, P., Wang, X., Zhang, W., Zhang, Y., Wu, C., ... Tang, B. (2020). Observing Malondialdehyde-Mediated Signaling Pathway in Cerebral Ischemia Reperfusion Injury with a Specific Nanolight. *Analytical Chemistry*, 92(3), 2748–2755. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05008>
- Sung, F. L., Zhu, T. Y., Au-Yeung, K. K. W., Siow, Y. L., & Karmin, O. (2002). Enhanced MCP-1 expression during ischemia/reperfusion injury is mediated by oxidative stress and NF- $\kappa$ B. *Kidney International*, 62(4), 1160–1170.  
<https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2002.kid577.x>
- Thurman, J. M. (2007). Triggers of inflammation after renal ischemia/reperfusion. *Clinical Immunology*, 123(1), 7–13.  
<https://doi.org/10.1016/j.clim.2006.09.008>
- Torras, J., Herrero-Fresneda, I., Lloberas, N., Riera, M., Cruzado, J. M., & Grinyo, J. M. (2002). Promising effects of ischemic preconditioning in renal transplantation. *Kidney International*, 61(6), 2218–2227.

<https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2002.00360.x>

Torres-González, L., Cienfuegos-Pecina, E., Perales-Quintana, M. M., Alarcon-Galvan, G., Muñoz-Espinosa, L. E., Pérez-Rodríguez, E., & Cordero-Pérez, P. (2018). Nephroprotective Effect of *Sonchus oleraceus* Extract against Kidney Injury Induced by Ischemia-Reperfusion in Wistar Rats . *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 1–7.

<https://doi.org/10.1155/2018/9572803>

Transplantation - World Kidney Day. (n.d.). Retrieved August 2, 2021, from <https://www.worldkidneyday.org/facts/topics/organ-donation/transplantation/>

Tzeng, T. F., Liu, I. M., Lai, T. Y., Tsai, C. C., Chang, W. C., & Cheng, J. T. (2003). Loperamide increases glucose utilization in streptozotocin-induced diabetic rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 30(10), 734–738. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1681.2003.03903.x>

Uz, E., Karatas, O. F., Mete, E., Bayrak, R., Bayrak, O., Atmaca, A. F., ... Akcay, A. (2009). The effect of dietary ginger (*Zingiber officinalis* Rosc) on renal ischemia/reperfusion injury in rat kidneys. *Renal Failure*, 31(4), 251–260. <https://doi.org/10.1080/08860220902779921>

Vakifahmetoglu-norberg, H., Xia, H., Vakifahmetoglu-norberg, H., Xia, H., & Yuan, J. (2015). Pharmacologic agents targeting autophagy Find the latest version : Pharmacologic agents targeting autophagy. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(1), 5–13. <https://doi.org/10.1172/JCI73937.conditionally>

Velasco Rodríguez, V. (2003). *Muestreo y tamaño de la muestra: una guía*

*práctica para personal de salud que realiza investigación.* (E. Cid, Ed.).

Walther, C. P., Podoll, A. S., & Finkel, K. W. (2014). Summary of clinical practice guidelines for acute kidney injury. *Hospital Practice (1995)*, *42*(1), 7–14.

<https://doi.org/10.3810/hp.2014.02.1086>

Warlé, M. C., Pertijs, J. C. L. M., Verweij, V. G. M., Rongen, G. A., Wagener, F. A., Van der Vliet, J. A., ... Masereeuw, R. (2013). Humoral signalling compounds in remote ischaemic preconditioning of the kidney, a role for the opioid receptor. *Nephrology Dialysis Transplantation*, *28*(7), 1721–1732.

<https://doi.org/10.1093/ndt/gfs601>

Wei, Q., Xiao, X., Fogle, P., & Dong, Z. (2014). Changes in metabolic profiles during acute kidney injury and recovery following ischemia/reperfusion.

*PLoS ONE*, *9*(9), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106647>

Willy, C., Dahouk, S., Starck, C., Kaffenberger, W., Gerngroß, H., & Plappert, U. G. (2000). DNA damage in human leukocytes after ischemia/reperfusion injury. *Free Radical Biology and Medicine*, *28*(1), 1–12.

[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00211-7](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00211-7)

Wishart, D. S. (2008). Quantitative metabolomics using NMR. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *27*(3), 228–237.

<https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.12.001>

Wittman, J. S., & Bawin, R. R. (1974). STIMULATION OF GLUCONEOGENESIS BY PROPYLENE GLYCOL IN THE FASTING RAT. *Life Sciences*, *15*, 515–524.

- YOKOZAWA, T., FUJII, H., KOSUNA, K., & NONAKA, G. (2002). Effects of Buckwheat in a Renal Ischemia-Reperfusion Model. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65(2), 396–400.  
<https://doi.org/10.1271/bbb.65.396>
- Zager, R. A., Johnson, A. C. M., & Becker, K. (2014). Renal cortical pyruvate depletion during AKI. *Journal of the American Society of Nephrology*, 25(5), 998–1012. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013070791>
- Zahran, M. H., Hussein, A. M., Barakat, N., Awadalla, A., Khater, S., Harraz, A., & Shokeir, A. A. (2015). Sildenafil activates antioxidant and antiapoptotic genes and inhibits proinflammatory cytokine genes in a rat model of renal ischemia/reperfusion injury. *International Urology and Nephrology*, 47(11), 1907–1915. <https://doi.org/10.1007/s11255-015-1099-5>
- Zhang, L., Wang, L., Wang, R., Gao, Y., Che, H., Pan, Y., & Fu, P. (2017). Evaluating the effectiveness of GTM-1, rapamycin, and carbamazepine on autophagy and Alzheimer disease. *Medical Science Monitor*, 23, 801–808.  
<https://doi.org/10.12659/MSM.898679>
- Zielke, S., Meyer, N., Mari, M., Abou-El-Ardat, K., Reggiori, F., van Wijk, S. J. L., ... Fulda, S. (2018). Loperamide, pimozide, and STF-62247 trigger autophagy-dependent cell death in glioblastoma cells. *Cell Death and Disease*, 9(10), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1003-1>
- Zul, E. A., García, A. I., Lucio, J. R., Waksman, N., & Saucedo, A. L. (2022). La RMN en el estudio del metaboloma humano: Definiciones y aspectos



prácticos. In *Una aproximación a la espectroscopia de RMN* (First, pp. 132–146). Oaxaca: Universidad Tecnológica de la Mixteca.

## Anexo 1

# Resultados de la cuantificación de los metabolitos séricos de los diferentes grupos de estudio (mM)

GRUPO/metabolito	Acetato	Acetoacetato	Acetona	Alantoina	Formiato	Glucosa	Glutamina	Lactato	Piruvato	Valina	Alanina	Propilglicol	N,N-Dimethylglicina	Citrato
SHR-2(SR-2)	0.1516	0.1716	0.0504	0.0489	0.5941	10.6110	0.3813	2.3117	0.1280	0.0994	0.3943	0.0032	0.0061	0.0254
SHR-9	0.1974	0.1573	0.0592	0.0997	0.5830	10.2790	0.3985	3.7902	0.1135	0.0998	0.3048	0.1929	0.0085	0.0424
SHR-7	0.1523	0.0882	0.0411	0.0260	0.0276	6.9798	0.3346	3.4930	0.1175	0.0956	0.2608	0.1592	0.0063	0.0429
SHR-8	0.2517	0.0935	0.0554	0.0707	0.4291	10.5448	0.4191	3.9651	0.1707	0.1321	0.4110	0.2435	0.0117	0.0422
SHR-12	0.2397	0.2294	0.0600	0.0671	0.5046	10.4844	0.4269	2.6658	0.0983	0.0829	0.2880	0.1807	0.0051	0.0604
SHR-14	0.1407	0.2085	0.0480	0.0694	0.6770	9.1807	0.4685	2.4953	0.1442	0.1333	0.3429	0.0846	0.0108	0.0895
IR45-1	0.1814	0.1336	0.0454	0.3831	0.3770	7.9915	0.5018	2.0969	0.1715	0.0995	0.2922	0.0104	0.0123	0.0670
IR45-4.1	0.1618	0.1825	0.0520	0.0786	0.5624	9.0269	0.4814	2.2132	0.1229	0.0952	0.3289	0.1959	0.0099	0.0944
IR45-5	0.1920	0.1074	0.0559	0.6088	0.4654	5.2333	0.4619	4.3810	0.4696	0.1547	0.5478	0.1402	0.0133	0.0939
IR45-7	0.1870	0.1386	0.0791	0.5856	0.6320	10.4954	0.5290	2.8393	0.2244	0.1605	0.4713	0.1701	0.0103	0.0419
IR45-12	0.1562	0.1818	0.0485	0.6925	0.5513	6.6533	0.6351	2.5348	0.3822	0.1341	0.5539	0.1249	0.0137	0.0853
IR45-4.2	0.1577	0.1561	0.0671	0.4994	0.4324	7.1335	0.4482	1.8528	0.1853	0.1270	0.3253	0.0854	0.0189	0.0298
LOR-2	0.2059	0.2041	0.0879	0.0974	0.5276	9.3176	0.4124	2.2454	0.1318	0.1385	0.2812	0.0141	0.0094	0.0479
LOR-3	0.1605	0.0673	0.0334	0.1282	0.7264	6.1497	0.4414	3.8913	0.1558	0.0812	0.3583	0.0005	0.0087	0.0915
LOR-4	0.1320	0.1814	0.0561	0.1142	0.5969	6.9542	0.4570	2.8790	0.1286	0.0962	0.2892	0.0608	0.0075	0.0417
LOR-5	0.1914	0.2141	0.0781	0.1926	0.4204	4.9798	0.3202	4.3918	0.1060	0.1729	0.2638	0.0135	0.0124	0.0761
LOR-10	0.1573	0.1339	0.0665	0.7185	0.5713	4.5227	0.4676	4.5096	0.2280	0.1463	0.4421	0.0733	0.0117	0.1464
LOR-13	0.1896	0.1788	0.0810	0.2080	0.5249	4.4312	0.4906	2.9457	0.2200	0.1346	0.3304	0.0569	0.0086	0.1086
IR60-1	0.1533	0.1924	0.0860	0.9454	0.4399	7.4535	0.6319	1.4986	0.3041	0.1438	0.4806	0.0053	0.0195	0.0419
IR60-2	0.2017	0.1324	0.0424	0.9127	0.4504	4.6570	0.5302	4.0191	0.6607	0.2210	0.7661	0.0253	0.0261	0.0877
IR60-3	0.1897	0.1760	0.0881	0.4001	0.6924	8.1214	0.4415	1.5338	0.1946	0.1214	0.3092	0.0152	0.0148	0.0247
IR60-4	0.1402	0.1711	0.0966	0.5937	0.4217	6.8931	0.4886	1.7472	0.2062	0.1392	0.3793	0.0699	0.0196	0.0333
IR60-9	0.1844	0.1511	0.0693	0.7019	0.4985	8.1733	0.5736	2.4989	0.1911	0.0981	0.3438	0.1267	0.0124	0.0465
IR60-10	0.1734	0.1225	0.0700	0.6444	0.4687	6.5918	0.5602	2.6321	0.1707	0.1385	0.3290	0.1572	0.0131	0.0717
LR-2	0.2109	0.1374	0.0891	0.7653	0.6005	5.1105	0.6448	2.8487	0.4718	0.2041	0.5581	0.1174	0.0140	0.0611
LR-3	0.1437	0.0948	0.0372	0.3058	0.5507	3.3514	0.5082	3.9830	0.2449	0.1129	0.4670	0.0000	0.0085	0.0465
LR-4	0.1676	0.0812	0.0521	1.0903	0.4449	6.1278	0.6483	4.0951	0.4170	0.1838	0.5014	0.0205	0.0204	0.1798
LR-5	0.1913	0.0727	0.0383	0.5203	0.4069	4.1899	0.5461	6.5620	0.3828	0.2022	0.6566	0.1212	0.0191	0.1351
LR-6	0.1528	0.1121	0.0618	0.3518	0.4943	3.2921	0.4051	6.4802	0.3160	0.2178	0.7239	0.0395	0.0174	0.1673
LR-7	0.2045	0.1344	0.0552	0.7317	0.4867	6.9562	0.5739	2.3758	0.1716	0.1705	0.3207	0.0910	0.0348	0.2035

