



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

INFLUENCIA DE LA DESNUTRICIÓN EN LOS NIVELES DE ALBÚMINA
SÉRICA Y DE SU TRANSCRITO EN HÍGADO EN UN MODELO DE RATÓN
URÉMICO

TESIS QUE PARA OBTENE
EL TITULO DE:
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A

TERESA RENATA ROMERO SALAS

DIRECTOR DE TESIS DRA. CARMEN J. MORA VILLALPANDO

ASESOR DR. DIEGO J. ARENAS ARANDA

TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO 2008.





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A MIS PADRES TERESA SALAS ESLAVA Y EDGARDO ROMERO SANCHEZ

*A TÍ MADRE POR DARMME SIEMPRE TU APOYO INCONDICIONAL, POR
ALENTARME A ESTUDIAR, A SEGUIR MIS SUEÑOS Y CUMPLIR MIS METAS
ANTE LA ADVERSIDAD, POR TU CARIÑO, COMPRENSIÓN, Y POR ESTAR
CONMIGO EN ESE MOMENTO TAN DIFICIL DANDOME TU FORTALEZA, TIEMPO
Y DEDICACIÓN. GRACIAS MAMÁ TE QUIERO.*

*A TÍ PADRE POR TU APOYO EN EL MOMENTO MÁS DIFICIL DE MI VIDA, POR
ENSEÑARME E INCULCARME LOS VALORES PARA SER UNA MUJER
RESPONSABLE Y POR TU ESFUERZO QUE REALIZAS DIA A DIA.*

GRACIAS PAPÁ TE QUIERO.

*A AMBOS LES DEDICO ESTE TRABAJO, QUE ES MI FORMA DE AGRADECERLES
TODO SU APOYO PARA DESARROLLARME PROFESIONALMENTE, DONDE
REFLEJO EL ESFUERZO DE TODA NUESTRA FAMILIA.*

A MI HERMANA DINA E. ROMERO SALAS

GRACIAS HERMANA, POR SER COMO MI MADRE, MI EJEMPLO A SEGUIR, POR PREOCUPARTE POR MÍ, POR TODO TU ESFUERZO REALIZADO, DEDICACIÓN Y DESVELO PARA AYUDARME A SER LA MUJER QUE HOY ESTÁ AQUÍ AGRADECIÉNDOTE EL HABER CONTRIBUIDO A CUMPLIR MIS METAS Y SUEÑOS.

GRACIAS POR SACRIFICAR MUCHO DE TU TIEMPO, PARA DEDICÁRMELO, ESPERO CON ESTE PEQUEÑO TRABAJO RETRIBUIR UN POCO TODA TU DEDICACIÓN.

TE QUIERO.

A MI HERMANO EDGARDO ROMERO SALAS

GRACIAS HERMANO, POR SER MI EJEMPLO A SEGUIR, POR DARME TU APOYO EN TODOS LOS SENTIDOS, POR BRINDARME PARTE DE TU TIEMPO A CUIDARME PARA NO ESTAR SOLA Y POR ENSEÑARME A TENER TENACIDAD PARA ENFRENTAR LOS PROBLEMAS.

ESPERO CON ESTE PEQUEÑO TRABAJO RETRIBUIR UN POCO TODA TU DEDICACIÓN.

TE QUIERO.

A MIS CUÑADOS IRAIS CEBALLOS R. Y VÍCTOR JIMENEZ R.

GRACIAS POR SU APOYO PERSONAL.

A MIS SOBRINOS, ROMINA, EMILIANO, FERNANDA, BRUNO, DONOVAN Y VÍCTOR.

GRACIAS POR SER CADA UNO DE USTÉDES PARTE DE MIS MOTIVOS PARA SEGUIR ADELANTE, POR SUS TRAVESURAS Y CARIÑO. LOS QUIERO.

A MIS AMIGAS

POR SUS CONSEJOS Y APOYO INCONDICIONAL. LAS QUIERO.

A TÍ MI GUÍA E.S.C

GRACIAS POR ESTAR SIEMPRE CUIDÁNDOME, GUIÁNDOME Y POR NO DEJARME EN EL MOMENTO MÁS DIFÍCIL DE MI VIDA. PORQUE, AUNQUE SOLO TUVIMOS UNA OPORTUNIDAD DE ESTAR JUNTOS FÍSICAMENTE, SE QUE SIEMPRE ESTAS A MI LADO VELANDO POR MI BIEN ESTAR.

QUIERO QUE SEPAS QUE ERES UN EJEMPLO PARA MI, QUE ME HUBIERA GUSTADO COMPARTIR ESTE MOMENTO CONTIGO, PERO SE QUE ALGÚN DIA ESTAREMOS JUNTOS PARA RECUPERAR EL TIEMPO PERDIDO, PARA QUE ME BRINDES TU CARIÑO Y COMPAÑÍA LAS CUALES ME HAN HECHO MUCHA FALTA, PORQUE SE QUE SI TÚ NO TE HUBIERAS IDO, MI VIDA SERIA DIFERENTE, PERO A PESAR DE TODA ESTA ADVERSIDAD QUE NOS SEPARO, TÚ Y YO SABEMOS QUE ESTAMOS JUNTOS A PESAR DE TODO.

TE QUIERO.

UN ESPECIAL AGRADECIMIENTO A:

DRA. CARMEN J. MORA VILLALPANDO

GRACIAS, POR BRINDARME TU AMISTAD, POR COMPARTIR TUS CONOCIMIENTOS DE MANERA PERSONAL, POR LA CONFIANZA QUE ME BRINDASTE PARA LLEVAR A CABO LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO, QUE SIN TU APOYO Y COLABORACIÓN NO HUBIERA PODIDO SER POSIBLE.

ESTE TRABAJO TAMBIÉN ES TUYO Y ESPERO CON ESTO PODER DEMOSTRARTE MI MÁS SINCERO AGRADECIMIENTO, PORQUE EN PARTE A TI DEBO LA CULMINACIÓN DE MI FORMACIÓN COMO PROFESIONAL. GRACIAS POR TU APOYO COMO MI MAESTRA Y COMO MI AMIGA.

DR. DIEGO J. ARENAS ARANDA

DOCTOR, GRACIAS POR PERMITIRME DESARROLLARME DENTRO DE LA INVESTIGACIÓN, PORQUE SIN SU APOYO ACADÉMICO Y PERSONAL NO HUBIERA SIDO POSIBLE.

MI MÁS SINCERO RESPETO, AGRADECIMIENTO Y CARIÑO.

***MI MÁS SINCERO AGRADECIMIENTO PARA LA UNIDAD DE
INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES NEFROLÓGICAS DEL HOSPITAL
DE ESPECIALIDADES CMNSXXI***

*JEFE DE LA UNIDAD DR. JOSE RAMON PANIAGUA SIERRA, POR SU APOYO Y
COLABORACIÓN, PARA LA REALIZACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO.*

*DRA. MARCELA ÁVILA DÍAZ, POR SU AMISTAD, CONFIANZA Y SOBRE TODO
POR SU APOYO TANTO PROFESIONAL COMO PERSONAL PARA LA REALIZACIÓN
DEL PRESENTE TRABAJO.*

*DRA. Ma. DEL CARMEN PRADO URIBE, POR SU BRILLANTE DESARROLLO DEL
MODELO MURINO CON IRC, QUE FUE ELEMENTAL PARA EL DESARROLLO DEL
PRESENTE TRABAJO. TAMBIEN QUIERO AGRADECERLE SU AMISTAD Y SU
APOYO BRINDADO.*

A TÍ

GRACIAS POR TODO TU AMOR, CARIÑO, COMPRENSIÓN, PACIENCIA Y APOYO INCONDICIONAL. GRACIAS POR SER COMO ERES Y POR AYUDARME A SER UNA MEJOR PERSONA CADA DIA.

ESPERO SEGUIR CONTANDO CON TU CARIÑO Y APOYO A PESAR DEL TIEMPO. QUIERO HACERTE SABER QUE ERES UNA PERSONA MUY IMPORTANTE EN MI VIDA, LA QUE ME ALIENTA A PERSEGUIR MIS SUEÑOS, Y QUE POR TI QUIERO SUPERARME AL MÁXIMO, ASI QUE ESPERO SIEMPRE ESTAR EL UNO PARA EL OTRO.

TE AMO, POR SIEMPRE Y PARA SIEMPRE, Y RECUERDA:

*“Lo importante en el hombre
no es vencer, sino lograr, y su
razón de existir no sólo es buscar
y encontrarse, sino ser, siendo
inicio y final, morir y renacer, y
el tiempo y el lugar a cada paso,
llevando la capacidad de dar.”*

Emilio Rojas. Pequeño Hombre.1996

INDICE

	PAG.
1.- GLOSARIO	1
2.- RESUMEN	3
3.- INTRODUCCION	4
3.1- Función Renal	4
3.2- Insuficiencia Renal Crónica	4
3.3- Tratamiento	5
3.4- Desnutrición	6
3.5- Hipoalbuminemia	7
3.6- Albúmina	8
4.- JUSTIFICACIÓN	9
5.- ANTECEDENTES	10
6.- OBJETIVOS	11
6.1- General	
6.2- Particulares	
7.- DIAGRAMA DE FLUJO	12
8.- MATERIAL Y MÉTODOS	13
9.- RESULTADOS	19
10.- DISCUSIÓN	25
11.- CONCLUSIONES	27
13.- PERSPECTIVAS.....	28
12.- BIBLIOGRAFÍA	29
13.- ANEXOS	32

13.1- Electroforesis	33
13.2- Gel de Agarosa	34
13.3- Preparación de Gel de agarosa	35
13.4- Extracción de RNA con Trizol	36
13.5- RT-PCR (Transcriptasa reversa)	38
13.6- PCR Punto Final	39
13.7- PCR- Tiempo Real	41
13.8- Método de Sanger	44
13.9- Cuantificación de albúmina	45
13.10- Cuantificación de creatinina	46
13.11- Evaluación Global Subjetiva	47
13.12- NFK Guías K/DOQI	48
13.13- Jaula Metabólica	49

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁG.
Fig.1.- Vigilancia de Ingesta.....	19
Fig.2.- Creatinina sérica	20
Fig.3.- Albúmina sérica	21
Fig.4.- Nivel de expresión del mRNA del gene de albúmina en hígado	22
Fig.5.- Verificación de la amplificación del producto de PCR	23
Fig.6.- Curvas Melt para el gene de GADPH.	24
Fig.7.- Curvas Melt para el gene de albúmina.....	24
ANEXOS	
Fig.A1.- RT-PCR	38
Fig.A2.- PCR	40
Fig.A3.- qT-PCR	41
Fig.A4.- qT-PCR para el mRNA del gene de GADPH	42
Fig.A5.- Curva estándar de la qT-PCR para el gene GADPH	42
Fig.A6.- qT-PCR para el mRNA del gene de albúmina.....	43
Fig.A7.- Curva estándar de la qT-PCR para el gene de albúmina	43
Fig.A8.- Jaula Metabólica.....	49
Fig.A9.- Componentes de la Jaula Metabólica	50

1. GLOSARIO

cDNA.- DNA complementario

Ct.- Ciclo umbral (Treshold cycle)

Curva Melt.- Curva de la Temperatura de Desnaturalización del producto de PCR.

dATP.- Desoxi-adenosin trifosfato

dCTP.- Desoxi-citosín trifosfato

DEP.- Desnutrición energético proteínica

DEPC.- Dietil-piro-carbonato

dGTP.- Desoxi-glutamín trifosfato

DMSO.- Dimetil sulfoxido

DNA.- Acido desoxiribonucleico

dNTP.- Desoxi-nucleótido-trifosfato

DPCA.- Diálisis peritoneal ambulatoria continua

dTTP.- Desoxi-timidín trifosfato

FG.- Filtración Glomerular

GADPH.- Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa

IRC.- Insuficiencia Renal Crónica

K-DOQI.- Guías Clínicas de la Enfermedad Renal: Evaluación, Clasificación y Estratificación (Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification and Stratification)

MIA.- Desnutrición, inflamación, aterosclerosis (Malnutrition, inflammation and atherosclerosis)

mRNA.- RNA mensajero

Oligo-dt.- deoxinucleotido oligomérico de timinas

PCR.- Reacción en Cadena de la Polimerasa.

pmh.- Personas por millón de habitantes.

qT-PCR.- PCR cuantitativa – PCR en Tiempo Real.

RNA.- Acido ribonucleico

RT-PCR.- Retrotranscriptasa reversa

SGA.- Evaluación Global Subjetiva

SPS.- Programa de análisis estadístico (Statistic program)

Taq Pol.- Polimerasa obtenida de *Termophilus aquaticus*.

TBE.- Tris-Borato-EDTA.

Tm .- Temperatura de desnaturalización (Temperatura melt.)

V. ref. – Valor de referencia.

INFLUENCIA DE LA DESNUTRICIÓN EN LOS NIVELES DE ALBÚMINA SÉRICA Y DE SU TRANSCRITO EN HÍGADO EN UN MODELO DE RATÓN URÉMICO

RESUMEN

La insuficiencia renal crónica (IRC), es una enfermedad que corresponde a la pérdida gradual de la función renal. Los pacientes con IRC presentan desnutrición e hipoalbuminemia la cual es un marcador de mortalidad. Se desconoce el mecanismo por el cual se modifica la concentración plasmática de albúmina en estos pacientes. Con este estudio se pretende investigar si la desnutrición influye en los niveles plasmáticos de albúmina y de su transcrito.

Se desarrollaron 3 grupos experimentales murinos; el modelo de IRC con vigilancia nutricional, el grupo de ratones sanos con restricción de alimento y el grupo control, a los tres grupos se les midieron concentraciones de albúmina y creatinina sérica así como la expresión del mRNA del gene de albúmina en hígado.

Los niveles de creatinina sérica encontrados en el modelo de Insuficiencia Renal Crónica (0.44 mg/dL) respecto a la de los grupos control (0.23 mg/dL) y restricción de alimento (0.23 mg/dL) confirman el éxito del modelo.

El grupo de Insuficiencia renal crónica desarrolló hipoalbuminemia, a las ocho semanas después de la segunda cirugía, con un promedio de albúmina sérica de 1.60 g/dL, mientras que el grupo de restricción de alimento presentó un promedio de 1.76 g/dL y el grupo control 1.84 g/dL., mostrando una diferencia estadísticamente significativa entre grupos.

Respecto a la cuantificación de la expresión relativa del mRNA del gene de albúmina, utilizando como gene normalizador el mRNA de GADPH , el grupo control tuvo un nivel de expresión relativa de 18.02 respecto al grupo de Insuficiencia renal crónica que registró una expresión relativa de 12.31 y el grupo de restricción de alimento 11.66 de expresión relativa. De los resultados se observa que la menor expresión se da en el grupo de restricción de alimento y no en el modelo de insuficiencia renal crónica. Por lo que con base en lo anterior, la desnutrición no influye en la concentración plasmática de albúmina de los ratones sanos con restricción de alimento, pero sí, en la expresión del mRNA del gene de albúmina. En la desnutrición por insuficiencia renal crónica se modificaron los niveles plasmáticos y los niveles de expresión del mRNA del gene.

Concluyendo que la síntesis de albúmina está regulada por un proceso molecular complejo en el modelo con IRC.

3. INTRODUCCIÓN

La insuficiencia renal crónica (IRC) ha incrementado su prevalencia en los últimos años, confirmando su importancia clínica y en la Salud Pública, considerándose en la actualidad un problema a nivel mundial (1) siendo uno de los síndromes más importantes en el campo de la nefrología (2) con una incidencia y prevalencia crecientes, y un alto costo (3). Se estima que más de un millón de personas en todo el mundo sufren de afecciones renales crónicas y que llegarán a necesitar alguna forma de terapia de diálisis o trasplante (2).

En México tres de cada cuatro mexicanos que padecen de IRC desconocen que tienen esta enfermedad, por lo que no reciben tratamiento. Aproximadamente 1,200 personas por pmh padecen IRC, datos que no son proporcionales a la cantidad de pacientes que reciben tratamientos, si se considera que alrededor de 25 mil son atendidos. Esto quiere decir que solamente uno de cada cuatro está diagnosticado y se le brinda tratamiento (2).

FUNCION RENAL

Los riñones tienen una función importante: eliminar del cuerpo las sustancias de desecho que se han ingerido o se han producido en el metabolismo. Otra función que es decisiva es la regulación del volumen y la composición de los líquidos corporales, es decir mantienen el equilibrio de los ingresos y las pérdidas. Esta función reguladora, proporciona el ambiente estable que todas las células necesitan para llevar a cabo sus diversas actividades. Los riñones realizan sus funciones más importantes filtrando el plasma sanguíneo y eliminando las sustancias de desecho de ese filtrado (4).

En el ser humano, cada riñón está formado por un millón de nefronas, aproximadamente; todas ellas son capaces de formar orina. El riñón no puede regenerar nefronas, por tanto las lesiones o enfermedades renales o el envejecimiento producen la pérdida de nefronas (4).

IRC

La IRC corresponde a la situación clínica en la que se ha producido la pérdida irreversible de un gran número de nefronas funcionales y de la función renal con una velocidad de filtración glomerular (FG) reducida e incapacidad para concentrar la orina. Este síndrome tiene múltiples etiologías como: congénito, hereditario o adquirido (3). La IRC corresponde a la última etapa de la enfermedad renal,

cuya clasificación está basada en las guías K-DOQI Evaluation, Classification, and Stratification en las que se establecen 5 etapas para la Enfermedad Renal respecto a la tasa de filtración glomerular: Etapa 1) daño renal y con normal o elevado filtrado glomerular mayor o igual a 90 mL/min, Etapa 2) daño renal con mediana disminución del filtrado glomerular de 60 – 89 mL/min, Etapa 3) moderada disminución del filtrado glomerular 30 – 59 mL/min, Etapa 4) severa disminución del filtrado glomerular de 15 – 29 mL/min, Etapa 5) falla renal con filtrado glomerular menor a 15 mL/min (o diálisis) (5).

En la IRC se presenta la uremia, que es consecuencia de la acumulación de toxinas, (6) y se refiere a la fase más avanzada de la insuficiencia renal crónica no tratada. (7) .La intensidad de las manifestaciones clínicas de la uremia varía de un paciente a otro y depende hasta cierto punto de la magnitud de la reducción de la masa renal funcionante y de la velocidad con la que se pierde la función renal (8).

Además de factores asociados con la uremia, como la acidosis metabólica e inflamación, los principales síntomas que se presentan en la IRC son; osteodistrofia renal, anemia, disfunción plaquetaria, acidosis metabólica, edema, hiponatremia, hiperfosfatemia, hipocalcemia, , pericarditis, intolerancia a carbohidratos y resistencia a insulina, hiperlipidemias, disfunción sexual e infertilidad en la mujer, anorexia, náuseas, vómito, nicturia, anemia, pérdida de energía, hipertensión e inapetencia (9).

TRATAMIENTO

La pérdida grave de la función renal, supone una amenaza para la vida y obliga a eliminar los productos tóxicos de desecho (4). La pérdida de la función renal es irreversible, incurable, progresivo y mortal por tanto será necesario recurrir a tratamientos sustitutivos para poder prolongar la vida del paciente (8). Miles de personas pueden sobrevivir durante 15 ó 20 años gracias a la diálisis. Pero este tratamiento no puede mantener una composición completamente normal de los líquidos orgánicos ni puede sustituir todas las múltiples funciones que llevan a cabo los riñones por lo que la salud de estos pacientes suele estar alterada (4).

Entre las opciones de diálisis figuran: hemodiálisis, diálisis peritoneal ambulatoria continua (DPCA) y diálisis nocturna automatizada. Las dos principales funciones de la diálisis son la eliminación de solutos y de líquido. La mayoría de los pacientes son sometidos a tres sesiones de diálisis por semana, en general durante 3 – 4 horas en cada sesión. (7).

Un mejor tratamiento para la pérdida permanente de la función renal es el restablecimiento de un tejido renal funcional mediante trasplante de donante emparentado vivo o cadáver, tomando en cuenta que el rechazo inmunológico es la principal amenaza que se cierne sobre el éxito a corto plazo del trasplante renal (4).

En México alrededor del 90% de los pacientes están en tratamiento con diálisis peritoneal, aproximadamente el 3% recibe un trasplante y alrededor del 7% hemodiálisis (8).

DESNUTRICIÓN

Las muertes prematuras en estos pacientes están asociadas con la aterosclerosis, la inflamación y la desnutrición, que son factores relacionados en la IRC denominados como el síndrome "MIA" el cual es parte del síndrome urémico. (9)

La desnutrición es un estado potencialmente reversible, que se origina como resultado de la deficiente incorporación de los nutrientes a las células del organismo, y se presenta con diversos grados de intensidad y variadas manifestaciones clínicas. La incorporación deficiente de nutrientes se debe a la falta de ingestión, a un aumento de los requerimientos, a un gasto excesivo o a la combinación de los tres factores (10).

La desnutrición energético- proteínica (DEP) es una enfermedad en la que existe una adecuada digestión de las proteínas de la dieta, pero su absorción está reducida de 10 a 30 por ciento, es causa de morbilidad y mortalidad, las formas leve y moderada son las que más prevalecen. Existen formas graves como el marasmo y kwashiorkor, aunque es menor la prevalencia (10).

La disfunción del riñón se asocia con una gran variedad de alteraciones metabólicas y nutricias que hacen que la desnutrición y el desgaste sean comunes en los individuos con padecimientos renales.

Las causas de la DEP en enfermos renales son multifactoriales y se han identificado tres mecanismos principales: 1) Consumo inadecuado de nutrientes por la presencia de síntomas urémicos como la anorexia, náuseas y vómito. La ingestión puede verse afectada por alteraciones en el sentido del gusto y la presencia de enfermedades gastrointestinales, 2) Pérdida de nutrientes durante la diálisis debido a que durante la DPCA se pierden de 5 a 15 g de proteínas al día, dos tercios de éstas son albúmina. Las pérdidas de aminoácidos van de 1.5 a 4 g por día, por lo que las pérdidas proteínicas participan en el mantenimiento de la hipoalbuminemia que se presenta con frecuencia en estos pacientes y 3) Alteraciones metabólicas de proteínas y aminoácidos.

Puede llegar a ser necesaria la restricción de algunos nutrientes (proteínas), a fin de que se proporcionen las proteínas necesarias para prevenir la desnutrición y para compensar los efectos secundarios y disminuir la progresión de la falla renal, en particular cuando se inicia en una etapa temprana de la enfermedad,

Una cifra reducida de albúmina es por sí sola un indicador de desnutrición, ya que constituye el 60% de las proteínas plasmáticas (10), por lo que se considera un indicador nutricional importante en pacientes renales, según Rigaud en el 2000.

La mayoría de los pacientes con enfermedad renal sufren de desnutrición energética y proteica denominada desnutrición urémica, la cual se presenta en aproximadamente del 20 – 50% de los pacientes con diálisis, ya que múltiples estudios han demostrado que la presencia repentina de la desnutrición urémica incrementa la mortalidad en estos pacientes.(11) Se ha considerado que el requerimiento diario mínimo de proteína es de aproximadamente 0.6 g/kg en individuos sanos, pero en pacientes con enfermedad renal aún no ha sido establecido. Algunos estudios han sugerido que en pacientes con enfermedad renal crónica la restricción espontánea de consumo proteico en la dieta es menor a los 0.6 g/kg diarios cuando la filtración glomerular es menor a 10 mL/min (12).

HIPOALBUMINEMIA

Una concentración de albúmina menor a tres gramos por decilitro se correlaciona con un aumento en las tasas de morbilidad y mortalidad, por lo que se ha considerado un indicador nutricional en pacientes renales (10), y la hipoalbuminemia en estos pacientes es un poderoso predictor de mortalidad (13). A pesar de que en pacientes con desnutrición proteico-calórica los niveles de albúmina sérica son normales aún en la inanición, por lo que se piensa que la hipoalbuminemia en sujetos con IRC tiene un origen complejo (14), aunque se sabe que en parte la hipoalbuminemia puede estar influenciada por la inflamación (15).

ALBÚMINA

La albúmina es la principal proteína del plasma humano con una concentración de entre 3.4 a 4.7 g/dL y comprende cerca del 60% de la proteína plasmática total. De la albúmina corporal extracelular 40% está en el plasma y 60% en los espacios extracelulares. El hígado produce alrededor de 12g de albúmina por día (16), lo cual representa alrededor del 30% al 40% de la síntesis proteínica hepática

total y la mitad de toda su proteína es secretada. La albúmina humana consiste en una cadena polipeptídica de 585 aminoácidos, la forma de la molécula completa es elipsoidal, con una masa relativamente baja de alrededor de 65 kDa (20) por lo que en conjunto con su alta concentración en plasma se considera que es responsable de 75 a 80% de la presión osmótica del plasma humano (16).

El gene de la albúmina humana se localiza en el cromosoma 4 q11 y presenta 16,981 nucleótidos, 15 exones y 14 intrones, es homólogo en humano y rata (17).

Se sabe que los bajos niveles de transcripción de la albúmina son el factor limitante de la síntesis proteica, pero aún se desconoce el mecanismo por el cual disminuyen los niveles de ésta proteína en la IRC (18).

4. ANTECEDENTES

Moshage J.H., et al. 1987. Investigaron el probable mecanismo molecular de la reducción de la síntesis de albúmina durante la inflamación usando experimentos in vivo e in vitro en ratas, postulando la importancia de los mediadores de la respuesta a la inflamación, reduciendo la síntesis de albúmina y el mRNA de albúmina en hígado pero no la síntesis total de proteínas (18).

Foley N.R., et al. 1996. Realizaron un estudio con 432 pacientes con IRC, en el que estudiaron la hipoalbuminemia con respecto a la mortalidad en pacientes con enfermedad renal, concluyendo que la hipoalbuminemia es un factor de pronóstico adverso en pacientes con diálisis, y que está fuertemente asociada con enfermedades cardíacas y con respuestas inflamatorias (24).

Stenvinkel P., et al. 1999. Estudiaron la relación entre la aterosclerosis, desnutrición y la inflamación (Síndrome "MIA") en pacientes con insuficiencia renal crónica. Sus resultados indicaron que el rápido desarrollo de la aterosclerosis en etapas avanzadas de enfermedad Renal Crónica es dada por el sinergismo de mecanismos, como la desnutrición, la inflamación y así como componentes genéticos (9).

Ahuja S.T. y Match E.W., 2004. Formulan una discusión de los mecanismos que causan la pérdida de proteínas, masa muscular, albúmina y otras proteínas del plasma en pacientes sometidos a diálisis (25).

Don R.B. y Kaysent G. 2004. Hacen una relación entre la inflamación y la nutrición, ya que la hipoalbuminemia ha sido un importante efecto fisiológico y esencial para la salud. Se infiere de los estudios clínicos que la causa de la hipoalbuminemia y más en específico de los niveles bajos de la albúmina son responsables de la mortalidad en pacientes con IRC (15).

5. JUSTIFICACIÓN

La IRC es de importancia en la Salud Pública, considerándose un problema a nivel mundial y con alto costo, por lo que ha sido tema de múltiples investigaciones. Los pacientes con IRC presentan hipoalbuminemia, que es un marcador de mortalidad y también presentan desnutrición, sin embargo en pacientes con desnutrición proteico-calórica los niveles de albúmina sérica son normales aún en la inanición, por lo que se piensa que el mecanismo por el cual se regula la síntesis de albúmina, es un proceso molecular complejo.

Hasta el momento se desconoce el proceso por el que se desarrolla la hipoalbuminemia en pacientes con IRC, por lo que es importante investigar este mecanismo a nivel molecular.

6. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

* Determinar la influencia de la desnutrición en la concentración del mRNA de albúmina en la IRC

6.2. OBJETIVOS PARTICULARES

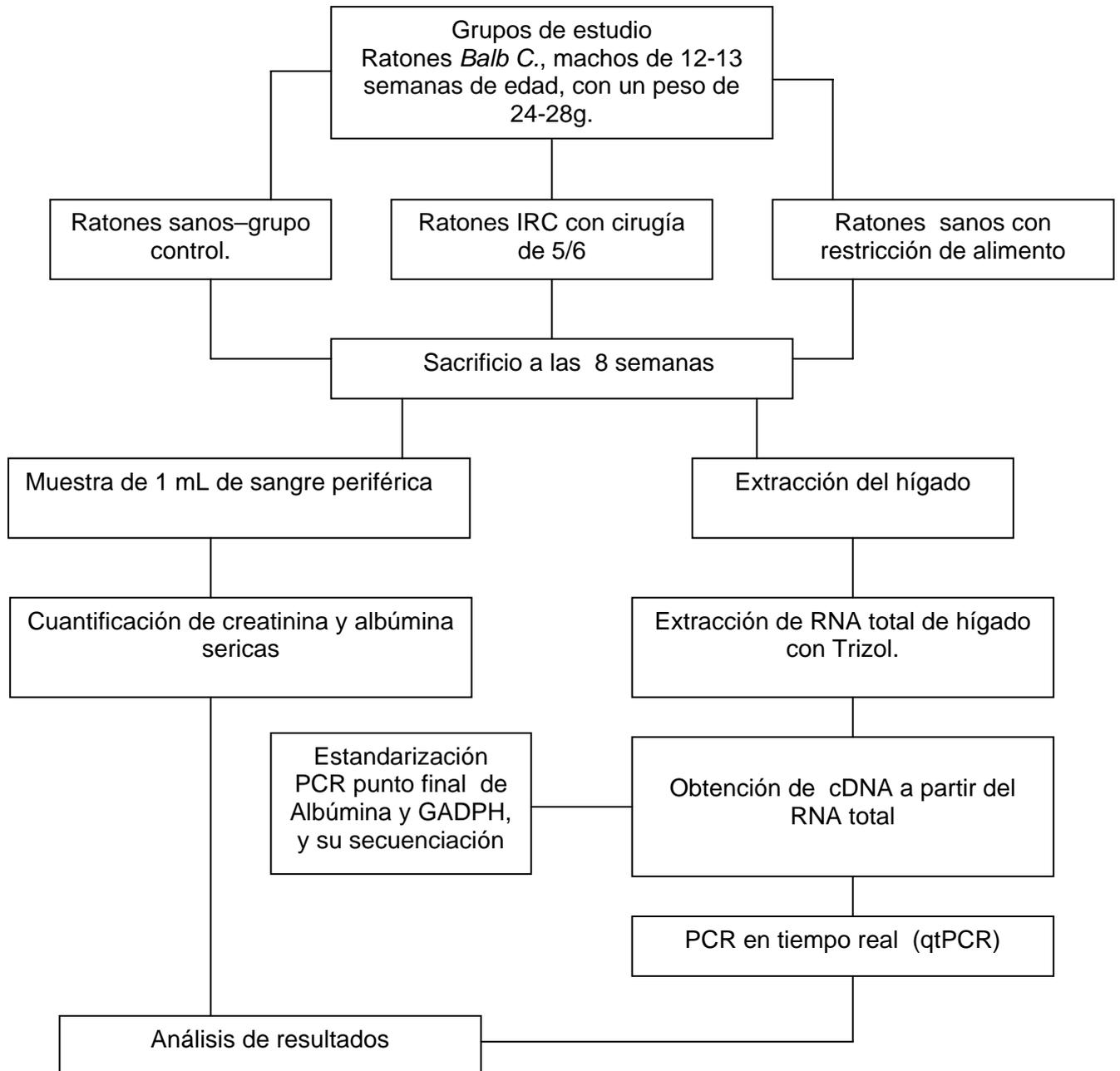
* Desarrollo de un modelo de ratón urémico con vigilancia nutricional.

* Desarrollo de un grupo de ratones sanos con restricción nutricional.

* Cuantificación de niveles de albúmina y creatinina sérica en plasma en los grupos experimentales.

* Cuantificación de la expresión del gene de albúmina en hígado en los grupos experimentales.

7. DIAGRAMA DE FLUJO



7. MATERIAL Y MÉTODOS

DISEÑO

CRITERIOS DE INCLUSIÓN: ratones *Balb C.*, machos de 12-13 semanas de edad, con un peso de 24-28g.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN: ratones con menor edad y peso a lo establecido en los criterios de inclusión, y ratones hembra o ratones que no sean de la cepa *Balb C.*

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN: ratones que en el transcurso de 8 semanas de vigilancia, hayan muerto o presentado algún tipo de infección o complicación.

GRUPOS DE ESTUDIO

Ratones *Balb C.* sanos – grupo control de 17 ratones sin tratamiento.

Ratones *Balb C* con IRC: 25 ratones que fueron intervenidos con cirugía de 5/6, que al mes tuvieron una creatinina sérica mayor que la del grupo control.

Ratones *Balb C.* sanos con restricción de alimento. 10 ratones de los cuales se registró cuánto ingirieron diariamente de alimento.

Desarrollo del modelo de ratón con IRC: A un lote de 24 ratones *Balb C* que mediante la técnica de 5/6 que consiste en la extirpación de uno de los riñones (es decir 3/6 de lo que los dos riñones forman un entero) y a la siguiente semana la extirpación de 2/6 del otro riñón mediante cirugía. A fin de inducir un estado de IRC. Se registró cuánto ingirieron diariamente de alimento.

El grupo de ratones sanos con restricción de alimento fue un lote de 10 ratones *Balb C* los cuales se colocaron en jaulas metabólicas, se les dio alimento previamente pesado.

, se les restringió el alimento a los ratones de este grupo, De acuerdo a un promedio del consumo de alimento del modelo urémico q se onitoreo para simular las condiciones de ingesta que se presentan en los ratones con IRC.

A los tres grupos se les dio un seguimiento de 8 semanas hasta su sacrificio.

SACRIFICIO DE ANIMALES EXPERIMENTALES Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Para el sacrificio de los tres grupos experimentales, los ratones se sometieron a anestesia y se les tomó una muestra de 1 mL de sangre periférica con una jeringa de 1ml y heparina. La muestra fue

colocada en un tubo eppendorff de 1.5 mL de la cual se separó el plasma en tubos eppendorff de 0.6 mL centrifugando a 3000 x g por 15 minutos a 4°C. Almacenamiento del plasma a -20°C

También se extrajo el hígado, manteniéndolo en frío, se guardó en criotubos e inmediatamente en nitrógeno líquido para su conservación a -70°C, para ser procesado posteriormente.

CUANTIFICACIÓN DE ALBÚMINA

Posterior al sacrificio se cuantificó albúmina en plasma con el método automatizado de azul de Bromocresol, en Hitachi 902 Roche.

CUANTIFICACIÓN DE CREATININA

Para verificar la insuficiencia renal, se cuantificó creatinina en plasma con el método automatizado Hitachi 902 Roche. Almacenamiento del plasma a -20°C

EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL DE HÍGADO

Extracción de RNA total de hígado con Trizol. Se trituró el tejido con Trizol en un homogeneizador Polytron PT1200 (sin que la muestra de tejido excediera el 10% del volumen del Trizol usado para la homogeneización) y se agitó por 15 segundos. El homogeneizado se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 0.2mL de cloroformo por 1mL de Trizol. La muestra se centrifugó a 12000 x g durante 15 minutos a 4°C. Después se transfirió la fase acuosa a un tubo eppendorff estéril, para después precipitar el RNA total con 0.5 mL de alcohol isopropílico por cada mL de Trizol. Se incubó la muestra a -70°C por 60 minutos para después ser centrifugada a 12000 x g por 10 minutos a 4°C.

Se decantó el sobrenadante para dejar solamente la pastilla que se formó en el interior del tubo, para ser lavada con etanol al 75%, en proporción de 1ml de etanol por 1ml de trizol usado y se centrifugó a 8000 x g 5 min. a 4°C. Se realizó un segundo lavado con etanol como se acaba de describir.

Por último se reconstituyó la pastilla de RNA total con 200 µL de agua DEPC y se guardaron las muestras a -70°C.

CUANTIFICACIÓN DEL RNA

Se cuantificó la concentración del RNA total por medio del método de espectroscopía UV a 260nm en NanoDrop ND-1000 al igual que verificar su pureza, utilizando 1µL de la muestra para su cuantificación.

INTEGRIDAD DEL RNA

Para verificar la integridad del RNA, se preparó un gel de agarosa al 1% en amortiguador TBE 1x (preparado con agua DEPC), se aplicaron 2 μL de la muestra con 1 μL de amortiguador de carga, y se dejó correr 25 minutos aproximadamente a 70 volts. Una vez terminado el tiempo de corrimiento, el gel se colocó en un transiluminador para observar el RNA con luz UV.

DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Se diseñaron los oligonucleotidos por medio del programa PRIMER1.

Para Albúmina oligo sentido (Upalpi) con una T_m de 61°C con la secuencia: 5' CCTCTGGCAAATGAAGTGG 3'. Oligo antisentido (Donalpi) con una T_m de 60°C y con secuencia: 5' GAAACACACCCCTGGAAAAAAA 3'.

Para el gene normalizador GADPH oligo sentido (Gasen) con una T_m de 64°C , cuya secuencia es: 5' ATGTGTCCGTCGTGGATCTGA 3'. Oligo antisentido (Ganti) con una T_m de 63°C , con la siguiente secuencia: 5' TTGAAGTCGCAGGAGACAACCT 3'.

OBTENCIÓN DE cDNA

Se obtuvo cDNA a partir del RNA total de hígado de ratón con un estuche "SuperScript First-Strand" (Invitogen) por RT-PCR. Partiendo de una concentración de 5 μg de RNA total, Oligo dT (1 μL), dNTPmix 10mM (2 μL), agua DEPC ajustando el volumen total a 12 μL . La muestra se incubó a 65°C . Se añadió Buffer 5x (4 μL), DTT 0.1M (1 μL), RNasa OUT 40 U/ μL (1 μL), agua DEPC (1 μL) y Termo Script RT 15 unidades/ μL). Se incubó 60 minutos a 55°C , 5 minutos a 85°C . y por último se agregó 1 μL de RNasa H e incubó por 20 minutos a 37°C . Las incubaciones se realizaron en el Termomixer comfort Eppendorf . Se guardaron las muestras a -20°C .

PCR – PUNTO FINAL

Se realizó una PCR punto final para amplificar un fragmento del mRNA de Albúmina, con la mezcla de reacción: Buffer 10x (2.5 μL), MgCl_2 50mM (1.5 μL) dNTPmix 10mM (1 μL), Upalpi 5mM (1 μL), Donalpi 5mM (1 μL), DMSO 10% (1 μL), Taq Pol. (0.25 μL), cDNA (2.5 μL) y Agua (14.25 μL). La reacción se llevó a cabo en un termociclador eppendorff, a 95°C 3 minutos 1 ciclo, 94°C 15 segundos, 59°C 30 segundos, 72°C 30 segundos 30 ciclos y 4°C 5 minutos 1 ciclo.

VERIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR

Para su verificación se preparó un gel de agarosa al 1% en amortiguador TBE 1x (preparado con agua DEPC), se aplicaron 2 μ L del producto de PCR con 1 μ L de amortiguador de carga, 1.5 μ L de marcador de peso molecular de 50 pb con 1 μ L de amortiguador de descarga y se dejó correr 40 minutos aproximadamente a 70 volts. Una vez terminado el tiempo de corrimiento, el gel se colocó en un transiluminador para observar el amplicón con luz UV.

PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR

Se procedió a la purificación del producto de Albúmina con un estuche de purificación de producto de PCR en gel QIAGEN – QIA QUICK. Se cortó la banda de interés a partir del gel de agarosa y se pesó. Se colocaron 400mg de gel en tubo eppendorff de 1.5 ml estéril. Cuando fueron más de 400mg se dividieron en alícuotas. Se añadieron 30 μ l de Buffer de Solubilización de Gel (L1) por cada 10 mg de gel.

SOLUBILIZACIÓN DEL GEL: Se incubó a 50 °C por 15min, se mezcló cada 3 min para asegurar la disolución del gel. Ya disuelto el gel se realizó una incubación por 5 min más. **FILTRAR POR COLUMNA:** Se colocó una columna en tubo de 2 ml y se procedió a pipetear la mezcla del paso anterior en la columna y después se centrifugó a 12 000 x g durante 1min. Por último se descartó el filtrado. **LAVADO DEL FILTRO:** En el mismo tubo de 2 ml se colocó una columna y se añadieron 500 μ l de Buffer de Solubilización de Gel (L1). Posteriormente se incubó a temperatura ambiente por 1min, y después se centrifugó a 12 000 x g por 1 min. **LAVADO DE DESCARGA:** Se procedió a depositar el contenido en un tubo de 2ml estéril, al cual se agregaron 700 μ l de Wash Buffer (L2) (que con anterioridad se le haya agregado etanol) y se incubó por 5min a temperatura ambiente, para posteriormente Centrifugar a 12 000 x g por 1 min. Se volvió a centrifugar por 1min para remover los residuos del Wash Buffer.

ELUCION DEL DNA: se descartó todo en tubo de 1.5ml, al cual se agregaron 50 μ l de TE Buffer directamente en el centro de la columna. Se incubó por 1min a temperatura ambiente y después se centrifugó a 12 000 x g por 2 min. Se cuantificó la concentración en NanoDrop ND-1000 y se guardó la muestra en el refrigerador a -20°C.

MARCAJE PARA SECUENCIACIÓN

Se procedió a la amplificación y preparación para la secuenciación por el método de Sanger, con fluorocromos. Se hizo una reacción de amplificación por PCR con 4µL de dNTPs marcados con fluorocromos ("Big-Dye" de PE Byosistem), 0.16µL del iniciador en sentido 5'-3', 5-20ng del producto purificado previamente y agua estéril, para un volumen total de 20µL, y con las mismas condiciones de tiempo, temperatura y número de ciclos de la PCR antes descrita. Se purificó el producto de PCR obtenido, utilizando una columna comercial "centri-sep" (QI-Agen), hidratada 30 minutos antes de ser utilizada, se centrifugó por 2 minutos a 3000 rpm, se depositó cuidadosamente el producto de la reacción al centro de la columna y se colectó dentro de un tubo colector de 1.5ml. Se centrifugó 2 minutos a 3000rpm y por último la muestra se secó en una centrífuga con vacío (speed vac).

SECUENCIACIÓN

Una vez seca la muestra se secuenció en un secuenciador comercial de Applied Biosystem ABI prism – de 16 capilares. (Laboratorio de Bioquímica FES-I)

qT-PCR

Por medio de PCR en tiempo real se cuantificó el mRNA de albúmina con Syber-Green, usando como gene normalizador el GADPH.

Los reactivos y condiciones para la qT-PCR para Albúmina fueron como sigue: Buffer 10x (2.5 µL), MgCL₂ 50nM (1.5 µL), dNTPmix 10mM (1µL), Oligonucleotidos Upalpi y Donalpi 5mM (1 µL de cada uno), Sybr gren 25x (0.25 µL), DMSO 10% (1 µL) y Taq (0.25 µL) bajo las siguientes condiciones: 95^oC 3 minutos 1 ciclo, 94^oC 15 segundos, 59^oC 30 segundos, 72^oC 30 segundos 30 ciclos .

Para GADPH: Buffer 10x (2.5 µL), MgCl 50nM (1.5 µL), dNTPmix 10mM (0.5 µL), Oligonucleotidos Gasen y Ganti 5mM (1 µL de cada uno), Sybr gren 25x (0.25 µL), DMSO 10% (1 µL) y Taq (0.25 µL). La reacción se llevo acabo en el Rotor Gene 6, con las siguientes condiciones: 94^oC 3 minutos, 94^oC 15 segundos, 59^oC 30 segundos, 72^oC 30 segundos con 30 ciclos.

El cálculo de la expresión relativa del mRNA de albúmina se calculó de la siguiente forma: se obtuvo el Ct de mRNA de albúmina, el cual se calculó con la curva estándar. Se obtuvo también el el Ct del gene normalizador GADPH, y, aplicando la siguiente fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$, se obtuvo la expresión relativa del mRNA de albúmina. El Ct se calculó en base a la intensidad de la señal fluorescente respecto al número de ciclos donde se estableció el Treshold. El nivel de expresión está dado en

unidades arbitrarias, ya que la expresión es una proporción entre los niveles de expresión del gene de albúmina y los del gene constitutivo GADPH, por lo tanto se eliminan las unidades.

El cDNA se sintetizó a partir del producto de RT-PCR (ver síntesis de cDNA). La linealidad de la curva estándar se construyó a partir de la una dilución de 10 hasta 1000 veces verificar el cDNA obtenido.

Para comprobar que el producto de que se genero de el qT-PCR es uno solo en cada prueba, se construyeron las curvas Melt. (Ver figura Anexo – qT-PCR).

Se procedió al análisis estadístico con el programa SPSS v16, se obtuvieron los parámetros estadísticos y se aplicó ANOVA.

9. RESULTADOS

En los siguientes gráficos se muestran los resultados de vigilancia de alimentación, concentraciones de creatinina y albúmina séricas y los niveles de expresión del mRNA del gene de albúmina en los tres grupos experimentales; el grupo de ratones control (RC), el modelo de ratones con insuficiencia renal crónica (IRC), y ratones sanos con restricción de alimento (RSA).

En la Fig. 1, se muestra el promedio del consumo de alimento (g) de los grupos Control 8.01 g n=17 e Insuficiencia Renal Crónica 4.8g por día n=24, con lo que se puede observar que el grupo de Insuficiencia Renal Crónica tuvo una ingesta menor respecto al grupo Control. En base al promedio de la ingesta del grupo de Insuficiencia Renal Crónica, le fue restringido el alimento al grupo de Restricción de alimento.

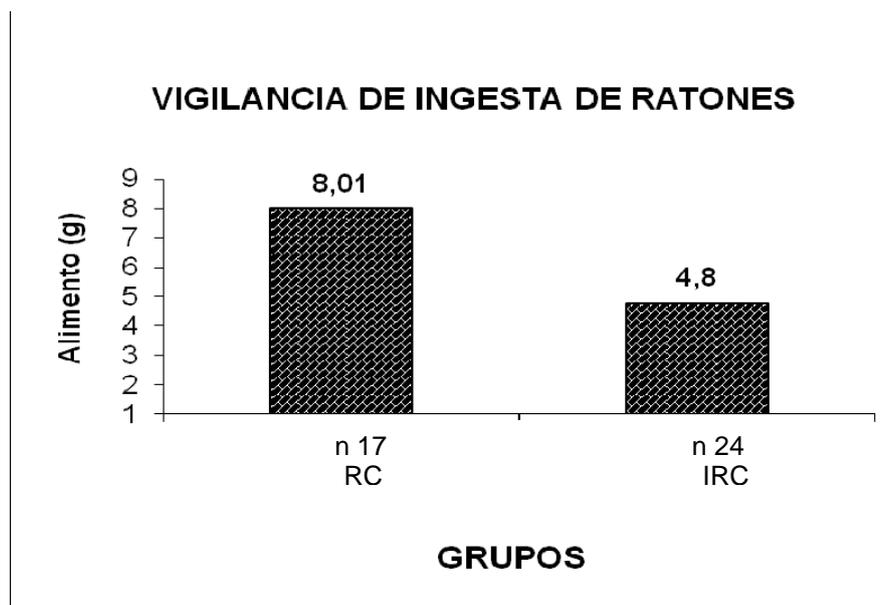


Fig 1.- Vigilancia de Ingesta. Se muestra el promedio del consumo de alimento (g) por día de los grupos RC e IRC.

Los niveles de creatinina sérica nos informan el estado de la función renal, como se observa en la Fig 2., la concentración de creatinina plasmática mostró una diferencia significativa del grupo de Insuficiencia Renal Crónica 0.44 mg/dL respecto al grupo Control 0.23 mg/dL (p 0.000) y al grupo de Restricción de alimento 0.23 mg/dL (p 0.002), confirmando así el funcionamiento del desarrollo del modelo de Insuficiencia Renal Crónica a las ocho semanas de evolución posteriores a la cirugía de 5/6.

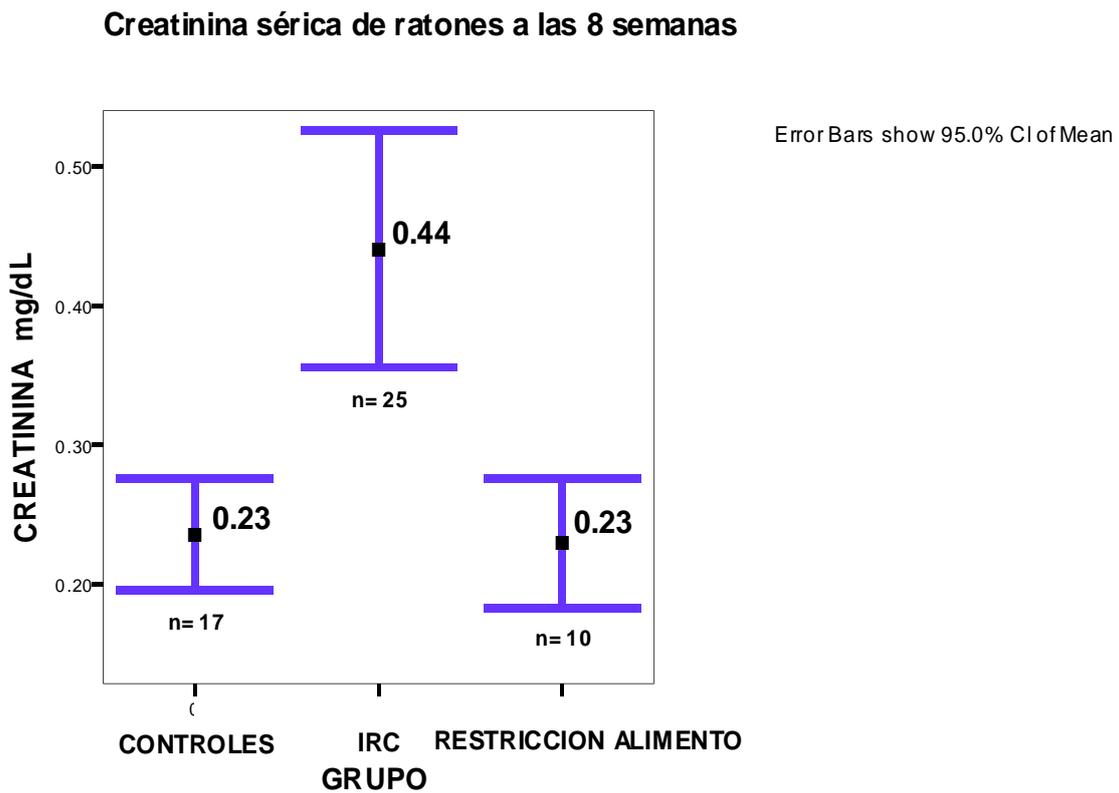


Fig. 2.- Creatinina sérica. Se muestran las concentraciones de creatinina sérica, en los grupos de ratones Control, IRC y Restricción de alimento.

En la Fig. 3 se muestran los niveles de albúmina sérica, en el grupo de Insuficiencia Renal Crónica 1.58 g/dL, en el grupo control 1.84 g/dL, y en el grupo de Restricción de alimento 1.76 g/dL. En el análisis estadístico hecho por ANOVA mostró diferencia significativa entre los grupos Control e Insuficiencia Renal Crónica ($p < 0.01$) mientras que no hubo diferencia significativa entre el grupo de Restricción de alimento y el grupo de Insuficiencia Renal Crónica. Este dato llama la atención por la dispersión, pero dado que estadísticamente no hay diferencia significativa, la desnutrición no influye en las concentraciones de albúmina sérica en ratones sanos, lo cual concuerda con lo que proponen Gebrin y colaboradores en el 2006 donde concluyen que la concentración de albúmina sérica no puede ser utilizada como un marcador del estado nutricional.

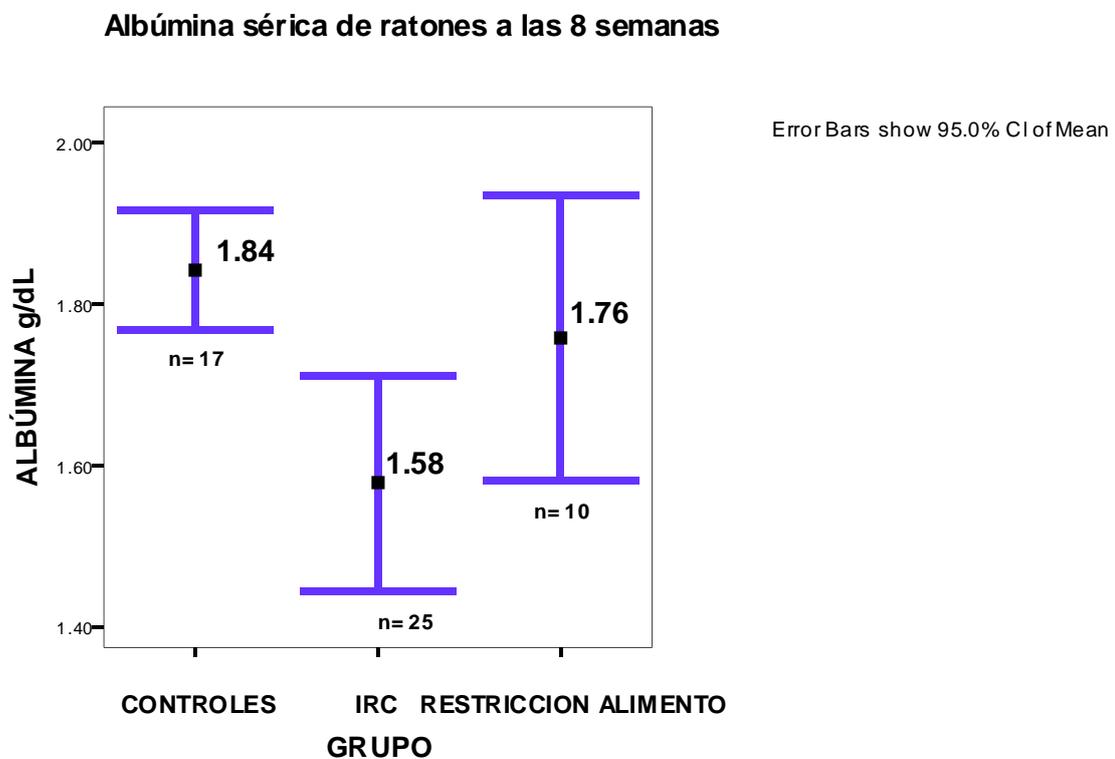


Fig. 3.- Albúmina sérica. Se muestran las concentraciones de albúmina sérica, en los grupos de ratones Control, IRC y Restricción de alimento.

Respecto a la cuantificación del nivel de expresión del mRNA del gene de albúmina, en la Fig. 4, observamos que la expresión del mRNA del gene de albúmina del grupo Control es de 18.02 veces (respecto al gene normalizador), en el grupo de Insuficiencia Renal Crónica 12.31 veces y en el grupo de Restricción de alimento 11.66 veces. En cuanto al análisis estadístico se puede observar que hay una diferencia significativa en cuanto al grupo de Insuficiencia Renal Crónica respecto al grupo Control, mientras que en el grupo de Insuficiencia Renal Crónica y Restricción de alimento no se mostró una diferencia estadísticamente significativa. Por lo que en base a la Fig.3 no hay una correlación directamente proporcional del mRNA del gene de albúmina respecto a la concentración plasmática de la proteína.

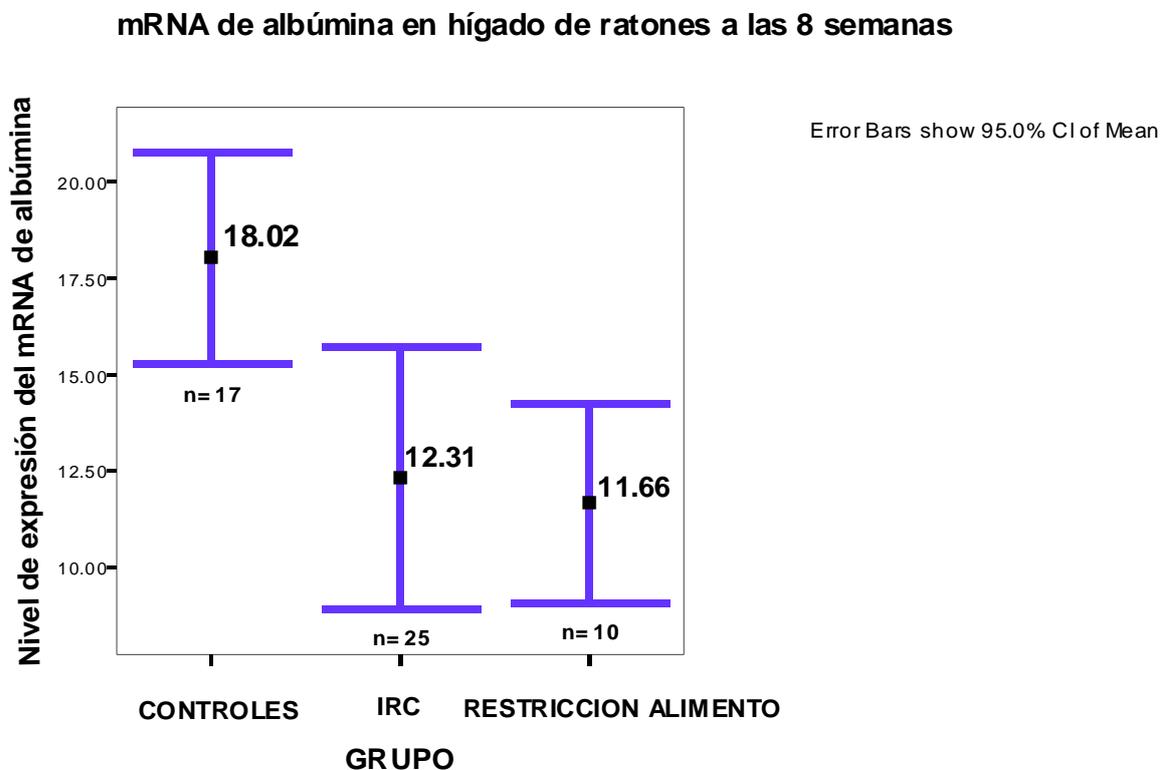


Fig. 4.- Nivel de expresión del mRNA del gene de albúmina en hígado. Se muestran los niveles del transcrito de albúmina en los grupos de ratones Control, IRC y Restricción de alimento. El nivel de expresión está dado en número de veces respecto al gene normalizador.

En la siguiente figura se muestra la electroforesis en gel de agarosa al 1% donde se visualiza la el producto de RT- PCR del mRNA de albúmina con tamaño de 110 pb y del mRNA del gene de GADPH con un tamaño de 145 pb. Ambos obtenidos de hígado de ratón control en donde en base al número de carril, el 1.- M.P.M representa el marcador de Peso Molecular de 50 pb, 2.- T-GADPH es el testigo del gen de GADPH, 3.- GADPH es el mRNA de GADPH, 4.- T-ALB es el testigo del mRNA de albúmina, y 5.-ALB-59°C representan la verificación de la temperatura de alineamiento de los oligonucleotidos en una reacción de PCR para el mRNA de albúmina.

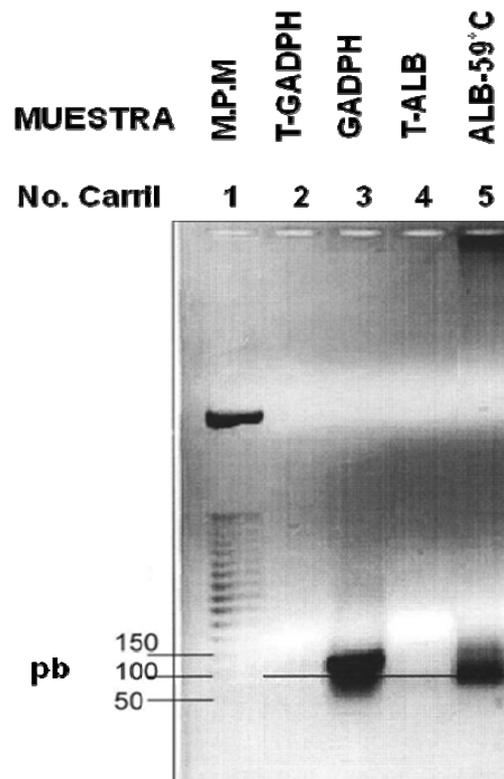


Fig. 5.- Verificación de la amplificación del producto de PCR. Se muestra la presencia del producto de RT-PCR del gen de GADPH y de albúmina en un gel de agarosa al 1.2%.

En la Fig. 6, se ilustra la curva Melt del mRNA del gene de GADPH. Se observa que el producto de PCR es el mismo en todas las muestras, ya que todas las muestras tienen la misma temperatura: 90.5 °C que es el pico máximo Bin C. También se muestra las temperaturas de referencia que se toman para que el equipo asigne la temperatura de desnaturalización de las muestras este rango se observa desde Bin A a Bin C, para evitar que se registren los picos anteriores a Bin A.

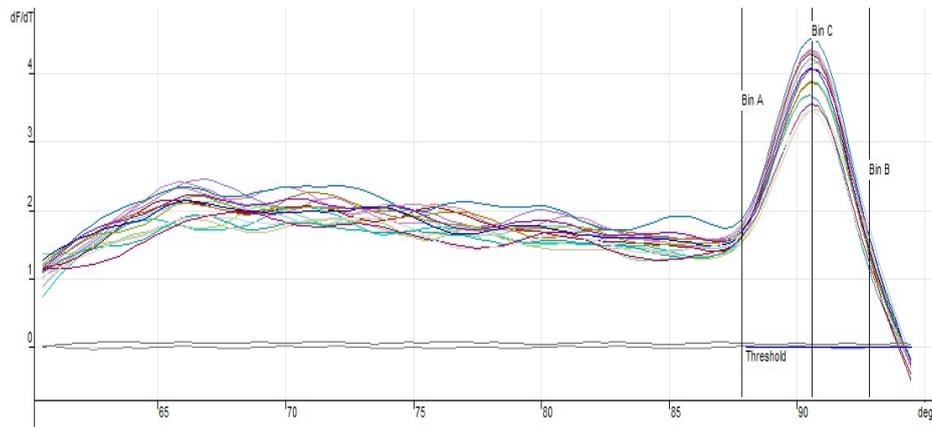


Fig.6.- Curvas Melt. Se muestra el producto de qT-RT-PCR del mRNA del gene de GADPH. Donde dF/dT es la proporción del incremento de fluorescencia respecto al incremento del tiempo.

La figura 7, muestra la curva Melt del mRNA del gene de albúmina donde se observa que el producto es el mismo ya que se desnaturalizan a la misma temperatura.

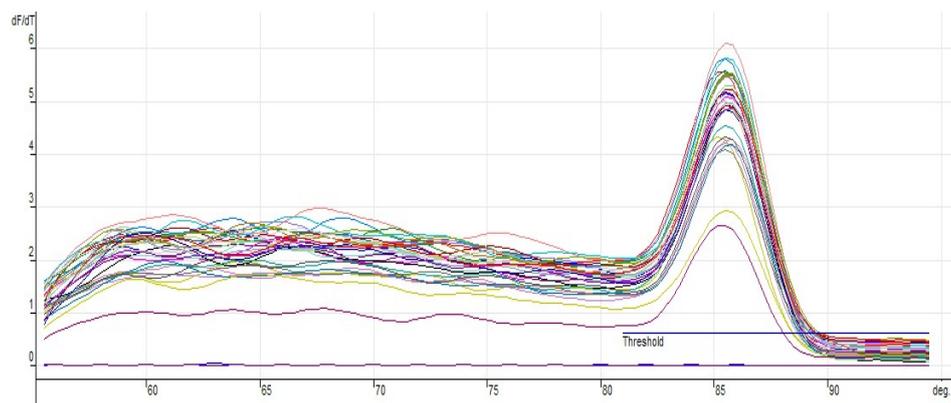


Fig. 7.- Curvas Melt. Se muestra el producto de qT-RT-PCR del mRNA del gene de albúmina.

7. DISCUSIÓN

En varias investigaciones clínicas como las de Fuhrman MP. et. al. 2002 y Gibs J. et. al.1999. se ha demostrado que los pacientes con IRC, con hipoalbuminemia tienen mayor riesgo de mortalidad que aquellos con concentraciones séricas de albúmina normal (19,20). En el presente trabajo, el grupo de insuficiencia renal crónica mostró niveles menores de albúmina sérica respecto al grupo control y al grupo de restricción de alimento confirmando una hipoalbuminemia, tal como se muestra en la Fig.3.

En un estudio realizado, en un modelo de rata, por Moshage y colaboradores, reportaron que los cambios en la concentración de albúmina sérica y en su mRNA fueron directamente proporcionales, proponiendo que la disminución en la síntesis de albúmina es resultado de la desnutrición, y que la limitante podría ser la síntesis del mRNA (18).

En el presente trabajo se utilizó qT-PCR para cuantificar la expresión del gene de albúmina. En la estandarización, el producto obtenido con PCR de punto final, se secuenció y se comprobó, que fue el fragmento de 110 pb con la secuencia del transcrito del gene de albúmina, y mediante qT-PCR se verificó la existencia de un solo producto (Fig. 6 y 7). Por lo cual la cuantificación del mRNA del gene de albúmina por qt-PCR es confiable.

Con esta metodología obtuvimos que la diferencia en la expresión del mRNA del gene de albúmina entre los grupos de insuficiencia renal crónica y restricción de alimento, no es estadísticamente significativa, pero sí respecto al grupo control, resultados análogos con el estudio realizado en el 2000 por Rout et al, donde observaron que los niveles del mRNA de albumina disminuyen en hígado de ratas con sepsis, y que sin embargo no disminuyen los niveles de albúmina sérica (21).

Por lo que consideramos que la regulación de la síntesis de la proteína pudiera ser por diferentes mecanismos de control tanto a nivel pretraduccional, como postraduccional del mRNA del gene de albúmina.

Debido a que no hay diferencias estadísticamente significativas en la concentración de albúmina sérica entre el grupo control y el grupo de restricción de alimento, podemos afirmar que la desnutrición por restricción de alimento en los ratones sanos no influye sobre la concentración de los niveles séricos de albúmina, sin embargo el proceso de desnutrición por restricción de alimento que

acompaña a la Insuficiencia renal crónica, sí influye en las concentraciones séricas de albúmina lo que conlleva a la generación de una hipoalbuminemia, como se observa en la Fig 3.

Gebrin y colaboradores en el 2006, y Don en el 2004 establecen que la concentración de albúmina sérica puede ser influenciada por otros factores aparte de un bajo o un buen estado nutricional (15,22), por lo que la hipoalbuminemia por sí sola no puede ser considerada como un marcador de desnutrición. Nuestros resultados concuerdan con la idea anterior puesto que la concentración de albúmina sérica (Fig 3) presenta una dispersión amplia, la cual da lugar a un cierto empalme con los resultados del grupo de IRC, lo que nos indica que la desnutrición en el grupo de IRC contribuye al desarrollo de la hipoalbuminemia, pero la restricción de alimento no la propicia.

Por otro lado la investigación realizada por Keysen en el 2001 establece que una desnutrición acompañada por algún padecimiento de la misma IRC, como la inflamación sí influye en los bajos niveles de albúmina sérica (23).

La hipoalbuminemia, es un marcador de mortalidad, por lo que con base en los resultados anteriores, es de vital importancia entender el mecanismo que da lugar a la disminución de los niveles de albúmina sérica, en pacientes con insuficiencia renal crónica, esto ayudaría al diseño de estrategias que contribuyan a disminuir la mortalidad

11. CONCLUSIONES

Los niveles de creatinina sérica ($>0.2\text{mg/dL}$) encontrados en el modelo de Insuficiencia renal crónica respecto a la de los grupos control y restricción de alimento confirman la funcionalidad del modelo.

La concentración de albúmina sérica al igual que la ingesta en el modelo urémico son menores respecto al grupo control.

No se catalogó hipoalbuminemia en el grupo de Restricción de alimento.

La desnutrición no influye en la concentración plasmática de los ratones con restricción de alimento pero sí en el mRNA, siendo diferente en la desnutrición por insuficiencia renal crónica donde se modifican los niveles plasmáticos y el control del mecanismo del mRNA de albúmina.

De acuerdo al presente trabajo, el mRNA no es el limitante de la síntesis de la albúmina. Por lo tanto, la síntesis de albúmina está regulada por un proceso molecular complejo, en pacientes con Insuficiencia Renal Crónica

12. PERSPECTIVAS

En la IRC conviven múltiples factores, que complican el estado de salud del paciente. Aparte de la desnutrición, variables como la inflamación, la aterosclerosis y la expansión de volumen, no son consideradas en este trabajo. Por lo que las perspectivas de esta investigación son ambiciosas e incluyen, estudios en los que se abordan investigaciones no solo a nivel del mRNA, si no también sobre la relación de los microRNAs y la regulación de síntesis de albúmina.

13. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Mezzano A. S., Aros E. C. 2005. Enfermedad renal crónica: clasificación, mecanismos de progresión y estrategias de renoprotección. Revista Medica Chile. 133:338-348.
- 2.- Paniagua S.J.R., Amato M.J.D. 2002. Diálisis peritoneal continua ambulatorias. Evidencias para una prescripción racional, en: Retos de la seguridad social en salud en el siglo XXI, Evaluación y gestión tecnológica. IMSS. 61pp.
- 3.- Minsal, 2005. MINISTERIO DE SALUD. Guía Clínica Insuficiencia Renal Crónica Terminal. 1st Ed. Santiago:
- 4.- Guyton A., Hall J. 1997. Tratado de Fisiología Médica. Interamericana. 9 Edición. McGraw-Hill. México. D.F. pp1262.
- 5.- <http://www.kidney.org/professionals/KDOQI/guideline/cpr1.htm.K/DOQI>. 2001 Clinical Practice Guidelines for Bone Metabolism and Disease in chronic Kidney Disease.
- 6.- Schoots A., Mikers F., Cramers c., De Smet R., Ringoir S. 1984. Uremic toxins and the elusive middle molecules. Nephrology. 38: 1-8.
- 7.- Braunwald E., Fuci A.S., Kasper D.L., Hauser S.L., Longo D. L., Jameson J.L. 2002. Harrison Principios de Medicina Interna. McGraw-Hill-Interamericana de España. México, D.F. 15ª edición. Vol. II. 3262pp.
- 8.- García P., Ma. Reyes H. Viniegra L. 2001. Múltiples facetas de la Investigación en Salud. Proyectos estratégicos d el IMSS. Paniagua S.J.R., Amato M.J.D. Prevalencia de la Insuficiencia Renal Crónica en la Población Derechoabiente del IMSS. Editorial Sestante. México D.F. 399pp.
- 9.- Stenvinkel P., Heimbürger O., Paultre F., Diczfalusy U., Wang T., Berglund L., and Jogestrand T. 1999. Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure. International Society of Nephrology. 55 . 1899-1911.
- 10.- Casanueva, E., Kaufer, H.M., Pérez L.A.B., Arroyo P., 1995. Nutrición Médica. Editorial Médica Panamericana. Fundación Mexicana para la Salud. México. D.F. 573pp.

- 11.- Kopple J.D: 1994. Effect of nutrition on morbidity and mortality in maintenance dialysis patients. American Journal Kidney Disease. 24:1002-1009.
- 12.- Lim V.S., Flanigan M. J. 2001. Protein intake in patients with renal failure: comments on the current NKF-DOQI guidelines for nutrition in chronic renal failure. Seminars in Dialysis. 14: 150-152.
- 13.- Burton D. R., Helmut G.R. 1994. Renal Pathophysiology – the essentials. Edit. Williams & Wilkins. United States America. 351 pp.
- 14.- Legg V. 2005. Complications of Chronic Kidney Disease. American Journal. 105;6:44-47.
- 15.- Don R. B., Kaysen G. 2004. Serum albumin: relationship to inflammation and nutrition Seminars in Dialysis 17(6). pp 432-437.
- 16.- Murria R., Granner D., Mayes P., Rodwell V. 1997. Bioquímica de Harper. 14 Edición. Manual Moderno. México. D.F. 1021pp.
- 17.- Phillip P. Minghetti S, Duane E . Ruffner S, Wun-Jing Kuang S, Olivia E . Dennisont, James W., Hawkins S, Wanda G. Beattie S, and Achilles Dugaiczky .,1986. Molecular Structure of the Human Albumin Gene Is Revealed by Nucleotide Sequence within 911-22 of Chromosome 4". The Journal Biological Chemistry The American Society of Biological Chemistry. *Printed in U.S.A.*.Vol. 261, No. 15, Issue of May 25, pp.
- 18.- Moshage H. J., Janssen M.J.A., Franssen J.H., Hafkenscheid M.J.C., and Yap H.S. 1987. Study of the molecular mechanism of Decreased liver Synthesis of Albumin in Inflammation. The American Society for Clinical Investigation, Inc. 79. 1635-1641.
- 19.- Fuhrman M. P. 2002. The albumin-Nutrition Connection: Separating myth from fact. Nutrition.18:199-200.
- 20.- Gibbs J., Cull W., Henderson W., et al. 1999. Preoperative serum albumin levels as a predictor of operative mortality and morbidity. Arch Surg. 134: 36-42.
- 21.- Ruot B., Breuille D., Rambourdin F., et al. 2000. Synthesis rate of plasma albumin is a good indicator of liver albumin synthesis in sepsis. American Journal Physiology. 279:E244-E251.
- 22.- Gebrin N., Imoberdorf R., Wegman M., Rublin M., Ballmer E. P. 2006. Serum albumin- a qualified parameter to determine the nutritional status?. Swiss Medical Wkly. 136:664-669.

23.- Kayseow G., Chertow G. M., Adhikarla R., Young B., Ronco C., Levin N.W. 2001. Inflammation and dietary protein intake exert competing effects on serum albumin and creatinine in hemodialysis patients.

Kidney International.60:333-340.

24.- Foley R. N., Parfrey S. P., Harnett J. D., Kent G. M., Murray D. C. and Barre P. E. 1996. Hypoalbuminemia, Cardiac morbidity, and Mortality in End-Stage Renal Disease. Journal of the America Society of Nephrology. 7(5). pp728-736.

25.- Ahuja S. T., Mitch E. W. 2004.The evidence Against Malnutrition as a prominent problem for Chronic Dialysis patients. Departament of Medicine, division of Nephrology, University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas. 17(6). 427-431.

26.- Levine N. I. 2004. Fisicoquímica. 2004. 5ª edición. Mc Graw Hill. España. Vol. 2. 644pp.

27.- Klug W. S., Cummings M. R. 1998. Conceptos de Genética. 5ª edición. Prentice Hall. España. 814pp.

28.- McPherson M. J., Moller S. G. 2006. PCR. 2ª edición. Taylor & Francis. New York. 292 pp.

29.- Strachan T., Read P. A. 2006. Genética Humana. 3ª edición. Mc Graw Hill. México. 676pp.

30.- Inserto ALB plus – Albumin BCG method. 2005-01. Roche/Hitachi.

31.- Inserto CREA – Creatinina BCG method. 2006-03. Roche/Hitachi.

32.- Baxter Healthcare Corporation.1994. 5M007. Evaluación del Estado Nutricional de Pacientes de Diálisis utilizando la Evaluación Global Subjetiva. Edi. División Renal.15pp.

14. ANEXOS

14.1 ELECTROFORESIS

La electroforesis es la más importante de las técnicas físicas disponibles en la bioquímica y la biología molecular.

Esta técnica permite separar fragmentos de DNA, cadenas de RNA y proteínas de distinto tamaño, haciéndolas migrar bajo la influencia de un campo eléctrico, usando como medio geles de distinto tamaño de poro (geles de poliacrilamida o agarosa) para separar las moléculas con una relación carga – masa.

Las moléculas más pequeñas migran a través del gel a una velocidad mayor que las más grandes. La clave de la separación está en los poros del gel que se utiliza como medio, que restringe más la migración de las moléculas grandes que la migración de las moléculas pequeñas.

Cuando finaliza la electroforesis, las bandas de las moléculas de distinto tamaño se identifican mediante un colorante fluorescente que se une en este caso a los ácidos nucleicos.

Haciendo alusión al DNA, la carga de un fragmento de este ácido nucleico es proporcional a su longitud, por lo que la movilidad de un fragmento de DNA es independiente del fragmento, y la electroforesis en un disolvente libre no separa fragmentos de DNA de diferentes longitudes. En un gel de polímeros, los fragmentos más cortos de DNA pueden moverse con mayor velocidad a través de los poros, por lo que es posible separar los fragmentos por tamaño.

Los fragmentos aparecen como una serie de bandas que pueden visualizarse tiñendo el DNA con bromuro de etidio e iluminándolo con luz ultra violeta.

El tamaño de los fragmentos individuales puede determinarse corriendo un conjunto de fragmentos marcadores de tamaño conocido (marcador de peso molecular) en otro carril del mismo y gel y así hacer la comparación.

La movilidad electroforética o de la biomolécula depende de su carga, tamaño, forma, concentración y viscosidad del solvente y naturaleza del gel (que actúa como un tamiz molecular) (26).

14.2 GEL DE AGAROSA

La migración de moléculas cargadas en un campo eléctrico se denomina electroforesis, técnica que permite separar fragmentos de DNA, cadenas de RNA y proteínas de distinto tamaño, haciéndolas migrar bajo la influencia de un campo eléctrico.

Si la electroforesis se lleva a cabo en un disolvente libre, el calentamiento del disolvente debido a la corriente eléctrica produce un flujo de convección que elimina la separación deseada.

Uno de los geles utilizados habitualmente es un gel de agarosa, que contiene un medio acuoso dispersado en los poros de una red tridimensional formada por un polisacárido obtenido a partir de agar.

En una molécula de DNA, cada grupo de fosfato que une a dos desoxirribosas tiene un hidrógeno ácido.

La ionización de estos hidrógenos resulta en una carga negativa del DNA en disolución acuosa. Las cadenas laterales de R de 3 de los 20 aminoácidos de $\text{NH}_2\text{CHR}\text{COOH}$ que aparecen en proteínas contienen un grupo amino, y las cadenas R de dos de ellos contiene un grupo COOH . En una disolución tampón de pH bajo, la protonación de los grupos amino dan una carga positiva la proteína. Para un valor determinado intermedio del pH, la proteína no tiene carga.

En la electroforesis en gel, las disoluciones tampón superior e inferior están conectadas por una placa del gel (que contiene en sus poros la disolución tampón). Cada disolución contiene un electrodo. Una capa de la disolución de las macromoléculas a separar está depositada en una muesca en el borde superior del gel. El borde del gel contiene varias muescas, de forma que varias muestras pueden ser tratadas simultáneamente en vías paralelas (26).

14.3 PREPARACION DE GEL DE AGAROSA

Para la preparación del gel de agarosa al 1% para una cámara de electroforesis pequeña, se realizó la siguiente metodología en el presente trabajo.

Se procedió a pesar 35 mg de garosa en una balanza analítica, la cual se colocó en un matraz Elen Meyer de 125 mL.

En una probeta de 100 mL se midieron 35 mL de Buffer TBE al 1 x, el cual se añadió al matraz con la agarosa previamente pesada.

Para disolver la garosa, se sometió a una temperatura elevada en el horno de microondas por aproximadamente 30 segundos. Antes de sacar del horno la mezcla, verificar que esté totalmente disociada.

Antes de verter la agarosa ya disuelta en la cámara de electroforesis, con una micro pipeta, se tomaron 3.5 µl de bromuro de etidio, el cual se colocó en la base de la placa donde se colocará el gel de agarosa.

Ya colocado el bromuro de etidio en la placa, se procedió a verter la agarosa ya disuelta en la placa sin rebasar los límites de la cámara de electroforesis, la cual se homogeniza con el bromuro de etidio, se colocó el peine en base al número de muestras que se fueran a verificar y se dejó homogenizar completamente a temperatura ambiente. Si al verter la agarosa se formaran burbujas, estas se deben quitar.

Una vez homogenizado el gel se procedió a quitar el peine, para que quede las muescas listas, para la carga de las muestras en cada una de ellas. Recordando que los ácidos nucleicos migran al polo positivo, las muescas deben quedar en el polo negativo para que al cargar las muestras, estas migren al polo opuesto, y así obtener los resultados esperados.

Se colocó el buffer al 1x, se le colocó su tapa a la cámara con sus dos electrodos, los cuales se conectan a una fuente de poder a un voltaje y tiempo determinado.

En el caso de este trabajo el voltaje utilizado para el RNA total fue de 70 volts durante 25 minutos

14.4 EXTRACCIÓN DE RNA CON TRIZOL

Todo el procedimiento de la extracción del RNA se realiza en condiciones estériles, para poder obtener de las muestras procesadas una mejor calidad de RNA en cuanto a su pureza e integridad, para lo cual se recomienda utilizar, cubre bocas, guantes, una bata limpia y de ser posible realizar el procedimiento de la extracción dentro de una campana para PCR o una campana para extracción de vapores químicos.

HOMOGENEIZACIÓN DE TEJIDOS

Se pesan entre 50-100 mg del tejido de interés. El corte del tejido se puede realizar en un mortero estéril y realizar el corte del tejido en nitrógeno líquido o hielo seco. Se colocan las muestras en un tubo con 1mL de trizol y se homogenizan durante algunos segundos y se colocan los tubos en hielo.

El homogeneizador se lavara con agua y posteriormente con cloroformo, para evitar impurezas entre cada muestra.

FASE DE SEPARACIÓN

Colocar las muestras ya homogeneizadas en tubos eppendorf estériles de 1.5 mL (realizarlo en hielo) y dejar incubando 5 minutos a temperatura ambiente para que se disocien completamente los complejos nucleoproteicos. Añadir 0.2 mL de cloroformo (frío) por 1ml de trizol usado en la homogeneización. Tapar bien los tubos y agitarlos vigorosamente durante 15 seg. e incubar 5 min. a temperatura ambiente.

Centrifugar las muestras a 12000 rpm 15 min. a 4°C. Después de la centrifugación la mezcla se separa en 3 fases: fase roja fenol-cloroformo, una interfase y una fase acuosa superior incolora, el RNA está la fase acuosa

OPCIONAL: Recuperar la fase orgánica para aislamiento de DNA o proteínas si se desea.

PRECIPITACIÓN DEL RNA

Transferir la fase acuosa un tubo eppendorf estéril de 1.5 mL. Añadir alcohol isopropílico (frío) 0.5 ml por 1 ml de trizol usado. Agitar e incubar las muestras a -70°C durante 1 hr.

Centrifugar a 12000 rpm 10 min. a 4°C. El RNA precipitado es generalmente invisible antes de la centrifugación, formando un gel sobre las paredes y en el fondo del tubo.

LAVADO DEL RNA

Quitar (decantar) el sobrenadante. Lavar el botón del RNA con etanol al 75% (frío), en una proporción de 1mL de etanol por 1mL de trizol usado en la homogeneización, mezclar con la mano y centrifugar a 8000 rpm 5 min. a 4°C.

Posteriormente se decanta nuevamente el sobrenadante y se repite el resto del procedimiento un vez más.

DISOLUCIÓN DEL RNA

Al finalizar el procedimiento, secar el botón del RNA (con aire- dejar los tubos abiertos dentro de la campana estéril y sobre una gasa también estéril), no secar por centrifugación. Es importante no dejar secar el botón por completo.

Disolverlo con agua inyectable (100 – 200 µl) el volumen dependerá de la cantidad observada en el tubo.

Almacenar a -70°C.

Se recomienda que posterior a la extracción, se realice la cuantificación del RNA, así como la verificación en un gel de agarosa al 1%, y etiquetar con los tubos con la concentración obtenida (µg/ µl).

14.5 OBTENCIÓN DE cDNA

Esta técnica se basa en la obtención de cDNA a partir de mRNA de un tejido o una línea celular.

Casi todas las moléculas de mRNA tienen una cola de poli-A en su extremo 3'. Primero se hibrida la población de moléculas de mRNA que tiene colas de poli-A 3' con oligo-dT.

La secuencia de oligo -dT hibrida con la cola de poli-A, y sirve de cebador para la síntesis de una cadena complementaria de DNA utilizando la enzima retrotranscriptasa (ThermoScriptRT). Esta enzima es una DNA polimerasa dependiente de RNA que copia un molde de RNA de cadena sencilla en un DNA de cadena sencilla. El resultado es un dúplex RNA-DNA de doble cadena.

La cadena de RNA se elimina tratándola con la enzima ribonucleasa H. Entonces, la cadena sencilla de DNA se utiliza como molde para sintetizar la cadena complementaria de DNA, utilizando la DNA polimerasa.

El extremo 3' de la cadena sencilla de DNA se dobla sobre sí mismo formando una horquilla, por lo que puede servir de cebador para sintetizar la segunda cadena.

El resultado es un DNA dúplex con las cadenas unidas por un extremo. La orquilla puede abrirse utilizando la nucleasa obteniendo una molécula de DNA de doble cadena denominada DNA complementario o cDNA, cuya secuencia nucleotídica deriva de una molécula de RNA (27).

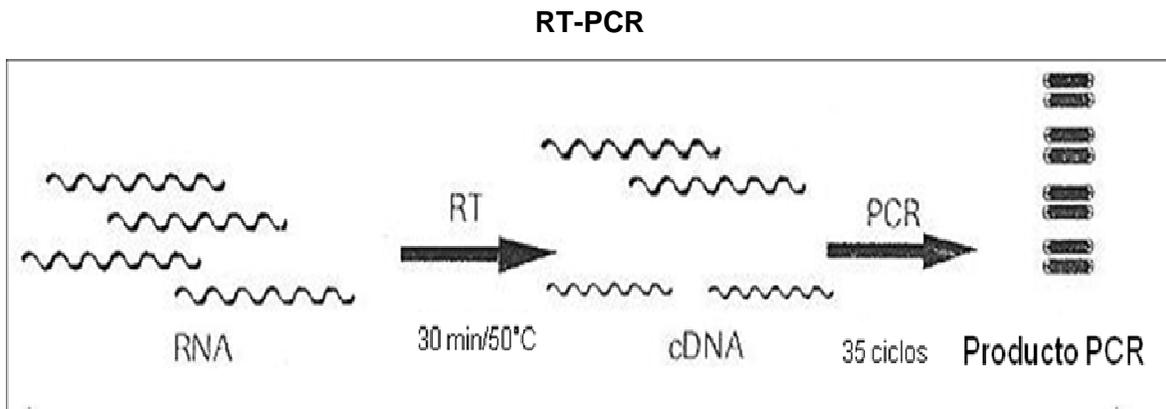


Fig. A1.- RT-PCR. Síntesis de cDNA a partir de RNA. Invitrogen

14.6 PCR – PUNTO FINAL

La técnica de PCR permite la amplificación directa de segmentos de DNA específicos que estén presentes en cantidades muy pequeñas. Se puede utilizar muestras de DNA de distintas fuentes, muestras forenses como sangre seca o semen, muestras almacenadas en registros médicos, pelos, restos momificados, fósiles y el DNA genómico.

Este método se basa en la utilización de DNA polimerasa, dNTPs, oligonucleótidos que hibridan con la cadena complementaria a la secuencia a amplificar, Buffer y $MgCl_2$.

Hay tres pasos fundamentales en la reacción de PCR:

- 1.- Desnaturalización
- 2.- Hibridación
- 3.- Síntesis o elongamiento, los cuales se describen a continuación (27).

1.- Primero, el DNA de doble cadena que se quiere amplificar se desnaturaliza por calor ($95^{\circ}C$ 3 minutos) para obtener así cadenas sencillas.

2.- Los cebadores hibridan al DNA de cadena sencilla. Generalmente se utilizan dos cebadores diferentes, cada uno de ellos tiene la secuencia complementaria a una de las dos cadenas del DNA. Los cebadores se alinean con sus extremos 3' encargados ya que hibridan a cadenas opuestas. Este paso es crucial ya que la especificidad de los cebadores es primordial para no obtener productos inespecíficos, de eso también dependerá la T_m de los cebadores, ya que es diferente para cada caso y es a la temperatura a la que se iniciara la hibridación de estos cebadores.

3.- A la mezcla de reacción se le añade una DNA polimerasa (Taq), la cual extiende los cebadores en dirección 5' - 3' de la nueva cadena añadiendo los dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) utilizando como molde al DNA de cadena sencilla unido al cebador. El producto es una molécula de DNA de doble cadena.

Cada grupo de tres pasos (desnaturalización, hibridación y extensión) se denomina ciclo. Generalmente, cada paso del ciclo se realiza a temperatura diferente. El ciclo puede repetirse llevando a cabo otra vez todos los pasos.

Empezando con una molécula de DNA, el primer ciclo produce dos moléculas de DNA, dos ciclos producen cuatro, tres ciclos producen ocho y así sucesivamente. El proceso es automático y se utiliza un termociclador, que puede programarse para realizar un número predeterminado de ciclos, produciendo grandes cantidades de segmentos de DNA amplificado en pocas horas (28).

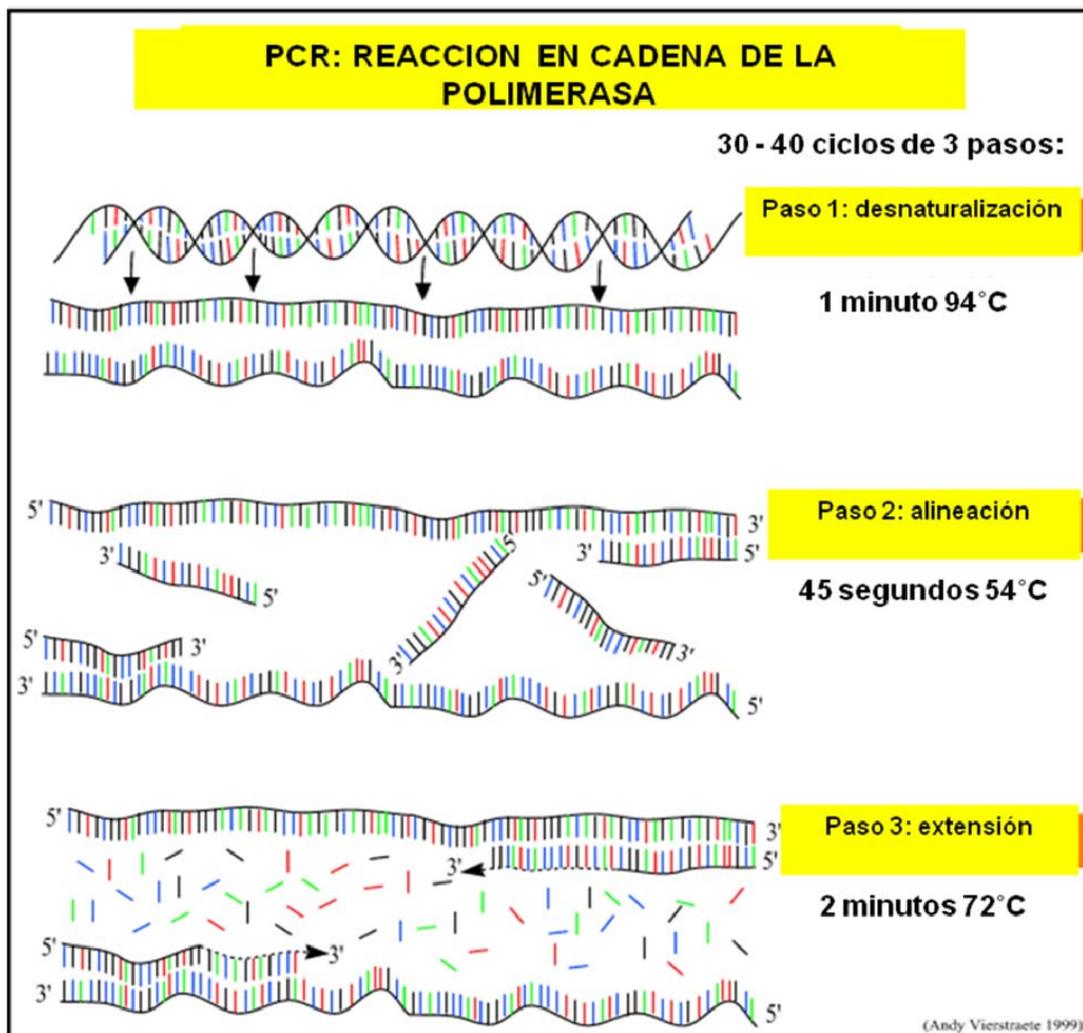


Fig. A2.- PCR. Amplificación de DNA por PCR.

14.7 PCR- TIEMPO REAL

Es una variable de la PCR cuantitativa en la que se usa un termociclador de detección de fluorescencia para amplificar secuencias específicas y medir de manera simultánea sus concentraciones.

Tiene dos aplicaciones principales en investigación:

- a) Cuantificar la expresión génica (y confirmar la expresión diferencial de genes detectados mediante análisis de hibridación de microarreglo)
- b) Seleccionar mutaciones y polimorfismos de nucleótido único.

Consta de tres fases: Exponencial, lineal y meseta. A diferencia de la PCR- Punto final en este método los datos se toman de la fase exponencial en base a una fluorescencia dada y el número de ciclos, el número de copias es contrastado con un estándar, para la cuantificación de la expresión.

La reacción de qT-PCR contiene todos los componentes que se usan en una PCR convencional a excepción del fluoróforo que se utilice (Sybr Green).

Los datos están dados logarítmicamente, y para la obtención de la expresión se utiliza una fórmula $2^{-\Delta Ct}$ (28).

qT-PCR. CURVA DE CUANTIFICACIÓN.

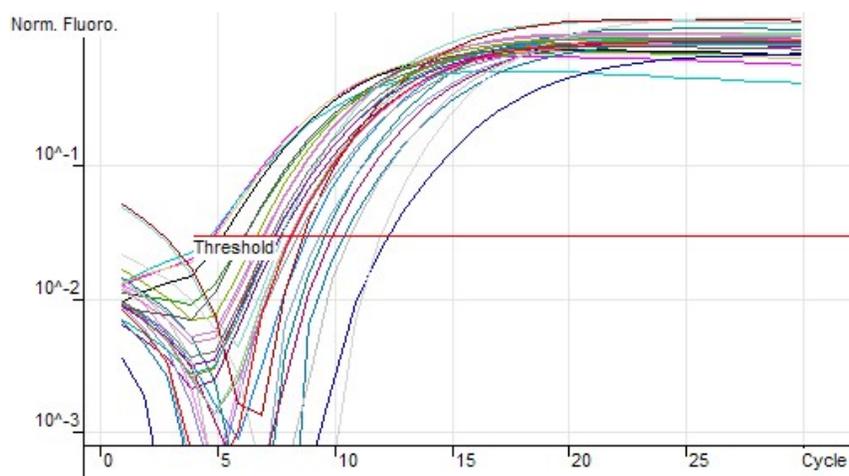


Fig. A3.- qT-PCR. Ilustra cómo es que se muestran los resultados del producto de PCR, en el eje de las ordenadas se da número de ciclos y en el eje de las abscisas la intensidad de la señal fluorescente (Sybr Green). El Ciclo umbral (Threshold) marcado con línea roja es el que se utiliza para el cálculo de la expresión del mRNA.

Los siguientes gráficos muestran los resultados de la expresión del mRNA de albúmina en los grupos de ratones control (RC), ratones con insuficiencia renal crónica (IRC), y ratones sanos con restricción de alimento (RSA).

PCR en Tiempo Real para la cuantificación del mRNA de GADPH

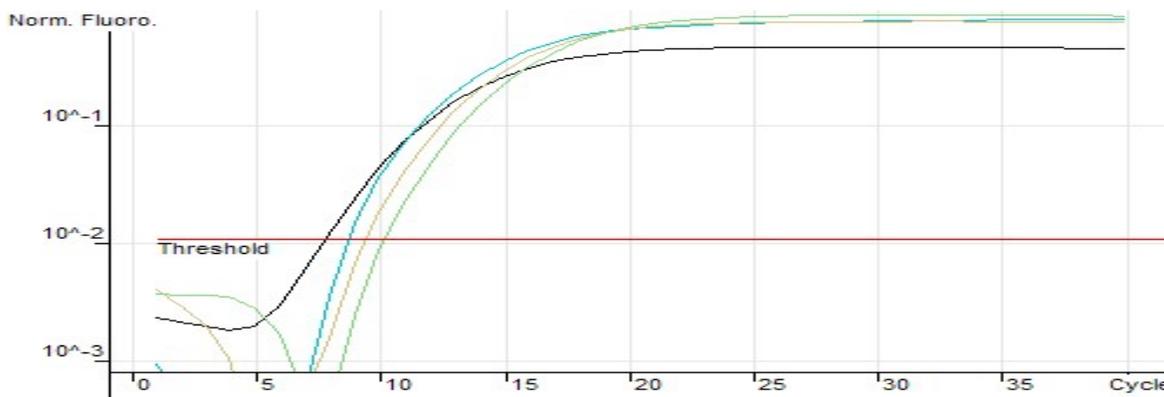


Fig A4.- qT-PCR para el mRNA del gene de GADPH. Se muestra el producto de PCR en tiempo real para GADPH, en el eje de las ordenadas se da número de ciclos y en el eje de las abscisas la intensidad de la señal fluorescente (Sybr Green). El Ciclo umbral (Treshold) marcado con línea roja es el que se utilizó para el cálculo de la expresión del mRNA.

Curva estándar para la PCR en tiempo Real del mRNA de GADPH

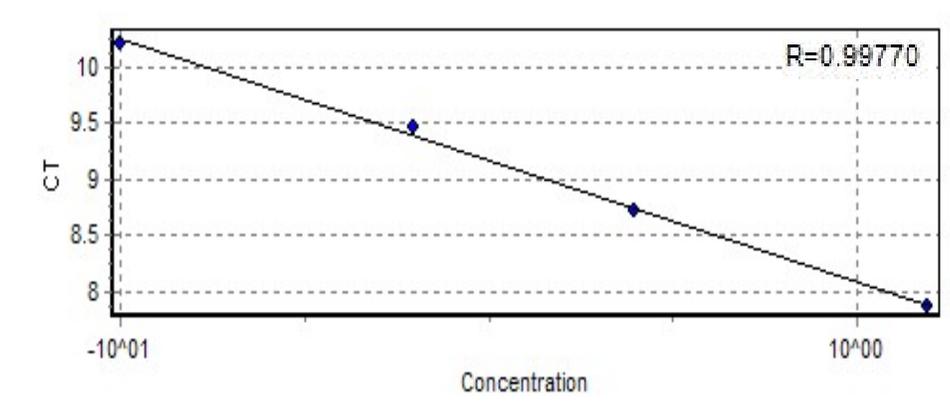


Fig. A5.- Curva estándar de la qT-PCR para el gene GADPH. Gráfico que muestra las diferentes concentraciones de mRNA de GADPH obtenidas de un ratón del grupo control. El factor de correlación obtenido fue de $r=0.99770$

PCR en Tiempo Real para la cuantificación del mRNA de albúmina

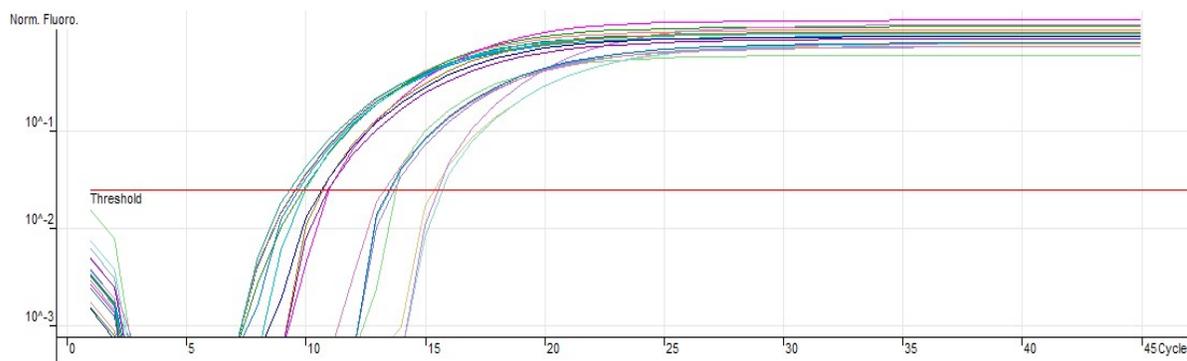


Fig A6.- qT-PCR para el mRNA del gene de albúmina. Se muestra el producto de PCR en tiempo real para albúmina, en el eje de las ordenadas se da número de ciclos y en el eje de las abscisas la intensidad de la señal fluorescente (Sybr Green). El Ciclo umbral (Treshold) marcado con línea roja es el que se utilizó para el cálculo de la expresión del mRNA.

Curva estándar para la PCR en tiempo Real del mRNA de albúmina

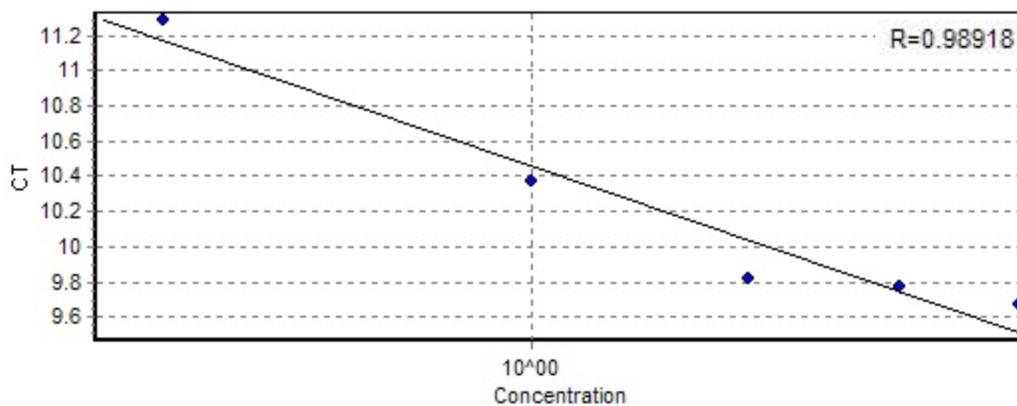


Fig A7.- Curva estándar de la qT-PCR para el gene de albúmina. Gráfico que muestra las diferentes concentraciones de mRNA de albúmina obtenidas de un ratón del grupo control. El factor de correlación obtenido fue de $r=0.98918$.

14.8 MÉTODO DE SANGER

El método de Sanger o de didesoxi, es el más utilizado para secuenciación de ácidos nucleicos, en la que se emplea una estrategia para obtener cadenas de DNA de diferentes tamaños.

La estrategia es mediante nucleótidos “terminadores” de cadena, cuya desoxiribosa carece de otro grupo OH (hidroxilo), en los dos carbonos 2' y 3' (de ahí el término didesoxi). La terminación de la cadena se consigue ya que no se puede generar el enlace fosfodiéster, ya que sin el grupo 3' - OH un didesoxinucleótido no puede intervenir en la continuación de la polimerización del DNA.

Gracias a los nucleótidos terminadores de cadena, se puede detener la síntesis en una base conocida.

El DNA que se quiere secuenciar, se somete a una PCR, asimétrica. La reacción incluye los mismos elementos que para una PCR convencional excepto que, se utiliza un solo iniciador, ya sea el sentido o el antisentido. La mezcla de reacción contiene los cuatro nucleótidos normales, pero también una proporción de cada uno de los cuatro desoxinucleótidos de terminación de cadena marcados con diferente fluoróforo.

Al mezclar didesoxi y desoxinucleótidos aseguramos que la terminación ocurra en cada una de las posiciones apropiadas (29).

14.9 CUANTIFICACIÓN DE ALBÚMINA

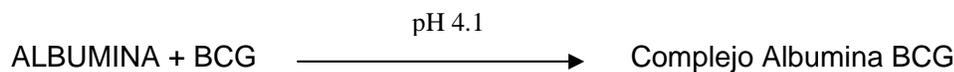
La cuantificación de los parámetros de Albúmina, se realizarón con el método automatizado Hitachi 902 Roche.

ALBUMINA:

Ensayo colorimétrico en punto final

- Muestreo y adición de R1 (buffer)
- Adición de R2 (sustrato) e inicio de la reacción:

Con un valor de pH de 4.1 la muestra de albúmina es de carácter catiónico para se capaz de interactuar con el verde de bromocreasol (BCG), un colorante aniónico, para formar un complejo azul-verde.



La intensidad del color azul – verde es directamente proporcional a la concentración de albúmina y puede ser determinado fotométricamente (30).

REACTIVOS:

- R1 buffer de citrato: 95mmol/L, pH4.1; preservativo
- R2 buffer de citrato: 95mmol/L, pH4.1; verde de bromocreasol: 0.66mmol/L; preservativo.

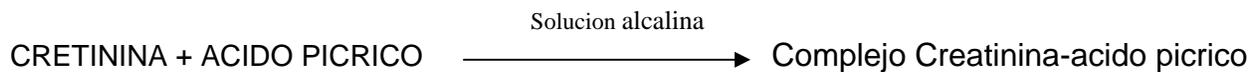
14.10 CUANTIFICACIÓN DE CREATININA

La cuantificación de los parámetros de Creatinina, se realizarón con el método automatizado Hitachi 902 Roche.

CREATININA:

Ensayo cinético colorimétrico

- Muestreo y adición de R1 (hidróxido de sodio)
- Adición de R2 (ácido picrico) e inicio de la reacción:



En solución alcalina, la creatinina con el ácido picrico forma un complejo de color naranja. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de creatinina y puede ser determinado fotométricamente (31).

REACTIVOS:

- R1 hidróxido de sodio: 0.20 mol/L
 - R2 ácido picrico: 0.20mmol/L
-
-

14.11 EVALUACIÓN GLOBAL SUBJETIVA

Debido a la dificultad de evaluar el estado nutricional en las personas, se ha desarrollado una técnica denominada Evaluación global subjetiva (SGA). La SGA está estrechamente correlacionada con otras mediciones objetivas y subjetivas del estado nutricional y tiene además un alto valor predictivo. La SGA es un procedimiento fácil de aprender y aplicar. Una de las ventajas es que no requiere pruebas adicionales de laboratorio. Se utilizan dos fuentes de información: la historia clínica y la exploración física.

La SGA es una escala semicuantitativa que toma como base 5 criterios:

- 1.- cambio del peso en los últimos 6 meses
- 2.- cambio en la ingesta diaria
- 3.- síntomas gastrointestinales de más de 2 semanas de duración (anorexia, náuseas, vómitos, diarreas)
- 4.- deterioro en la capacidad funcional y exploración física para detectar pérdida de la grasa subcutánea (ojos hundidos, piel colgante alrededor de los ojos y en mejillas, pliegues en tríceps y bíceps)
- 5.- pérdida de la masa muscular (depresión alrededor de las sienes, hipotrofia de los músculos deltoides, músculos ínter óseos de la mano, músculos del cuádriceps, y pantorrilla) clavícula prominente y edemas (sacros, maleolares) (32).

Los 4 primeros se puntúan como A (normal), B (leve-moderada alteración) y C (alteración severa).

La exploración física, se puntúa como 0 (normal), 1 (leve pérdida), 2 (pérdida moderada) y 3 (pérdida severa).

De la valoración global, se obtienen 3 grados de estado nutricional:

- 1.- A (estado nutricional correcto)
 - 2.- B (desnutrición leve-moderada)
 - 3.- C (desnutrición severa)
-

14.12 NFK GUÍAS K/DOQI

Las guías clínicas prácticas fueron desarrolladas para proveer un plan de acción clínico integrado para el manejo de problemas complejos durante todo el curso de la enfermedad renal crónica. En las guías, las etapas de la enfermedad renal crónica son definidas de acuerdo a las Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification, and Stratification (K-DOQI). La población objetivo de estas guías es adultos (18 y más) con enfermedad renal crónica.

Las guías están basadas en una revisión sistemática de literatura, la última actualización se realizó en Enero del 2001. En la formulación de las guías, las bases racionales y evidencias fueron echas explícitamente. Cuando todos los componentes del razonamiento para la guías fueron basados en evidencia publicada, las guías fueron clasificadas como "evidencia". Cuando no existió una evidencia definitiva o la evidencia fue considerada inconclusa, fueron clasificados como "opinión". Como resultado, de las 111 recomendaciones hechas en estas guías, cerca de una tercera parte fueron basadas en evidencias y dos terceras partes fueron basadas en opinión. Está distribución es verdadera si uno considera las recomendaciones hechas para los pacientes con enfermedad renal crónica renal en etapa 3 y 4 o aquellas en etapa 5 los cuales están ya en diálisis.

De acuerdo a las K-DOQI, la enfermedad renal se clasifica en 5 etapas en base a la filtración glomerular (5):

ETAPA	DESCRIPCIÓN	FG (ml/min)
1	daño renal y con normal o elevado filtrado glomerular	mayor o igual a 90 mL/min
2	daño renal con mediana disminución del filtrado glomerular	60 – 89 mL/min
3	moderado disminución del filtrado glomerular	30 – 59 mL/min
4	severa disminución del filtrado glomerular	15 – 29 mL/min
5	falla renal	15 mL/min (o diálisis)

14.13 JAULA METABÓLICA

Se muestra la Jaula Metabólica para ratones con Cat. No. 650-0311 que se utilizó en el estudio, para poder obtener los registros de alimento y agua que ingirieron los animales experimentales de los grupos control y urémicos, para así controlar la ingesta al grupo con restricción de alimento.



Fig. A8.- Jaula Metabólica. Se muestra la presentación de la jaula metabólica que se utilizó para el presente trabajo.

COMPONENTES DE LA JAULA METABOLICA PARA RATONES

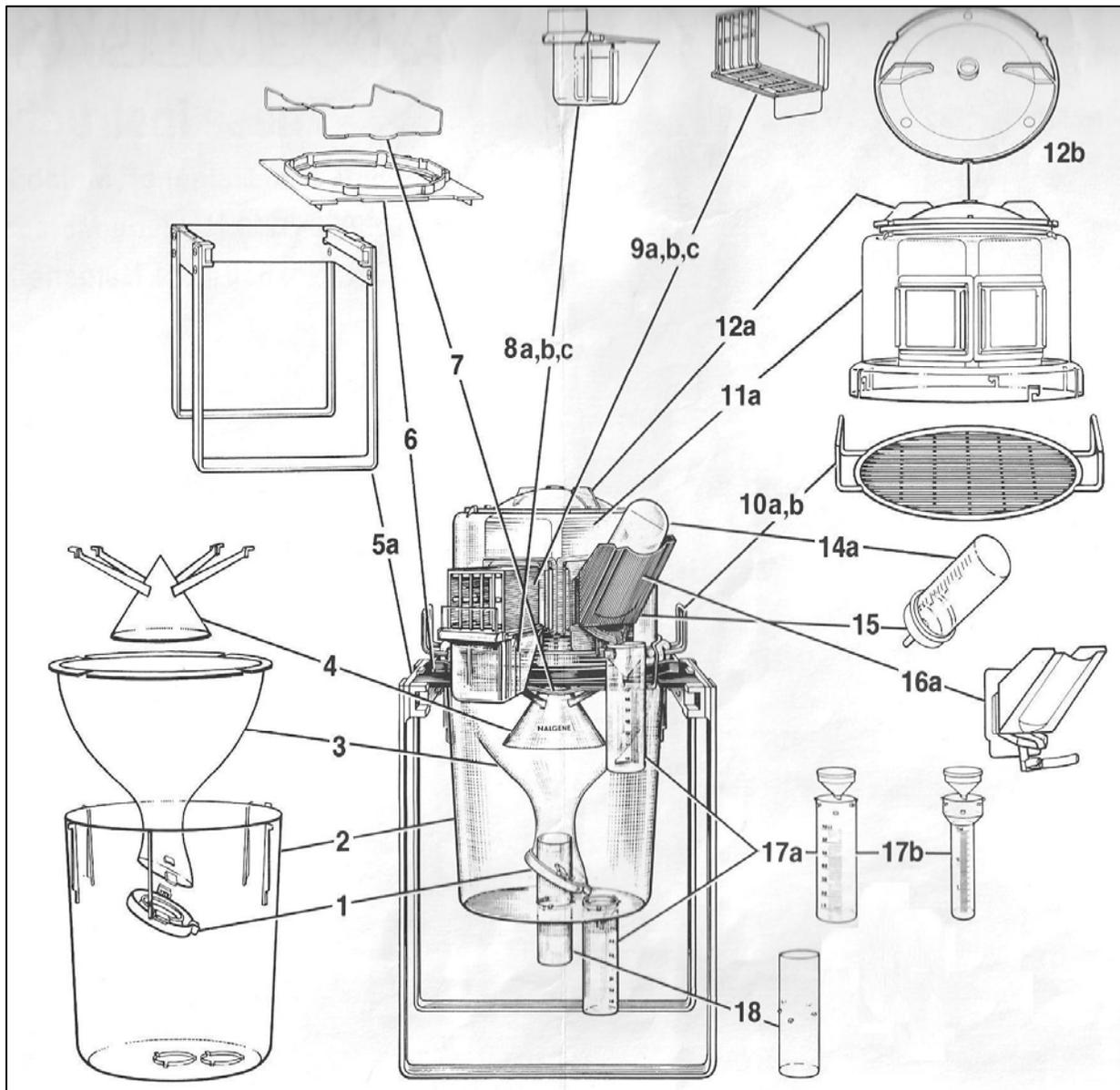


Fig. A9.- Componentes de la Jaula Metabólica. Se ilustran cada uno de los componentes de la jaula metabólica utilizada, para ratones.

