



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI

**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN
ENFERMEDADES NEFROLÓGICAS**

**NIVEL DE EXPRESIÓN DEL mRNA DEL GEN
DE ALBÚMINA EN LA PROGRESIÓN DE LA
INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA EN UN
MODELO MURINO.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

FLORES ONGAY LUIS ANGEL

Directora de Tesis:

Dra. CARMEN J. MORA VILLALPANDO



MÉXICO D.F.

NOVIEMBRE 2010



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:

Les agradezco de manera especial a mis padres, el Sr. Alejandro Flores Meza y la Sra. Blanca Guadalupe Ongay Arriaga, quienes durante 25 años han sido el pilar de mi desarrollo profesional y el mejor ejemplo a seguir. Les agradezco el confiar en mí y dejarme estudiar esta carrera, les agradezco todos los regaños y castigos que hasta la fecha me han impuesto, puesto que sin ellos esta tesis no se habría realizado; los quiero y los amo.

Le agradezco a mi hermano el Biol. J. Alejandro Flores Ongay por ser el mejor mentor del mundo, por tenerme una paciencia interminable, te admiro y respeto infinitamente. Sabes que puedes contar conmigo cuando sea, sin importar el por qué me necesites, te quiero mucho hermano.

Le agradezco su apoyo incondicional a mi segundo hermano el Sr. Ernesto García Razo, por su amistad y apoyo en momentos difíciles, te agradezco por enseñarme a ser fuerte ante cualquier adversidad

Le agradezco a mis tías Dulce, Esbeyde, Leonor, Magdalena, Patricia, a mis tíos José, Miguel Ángel, a mi ahijado Alexander, a mi tío Marco, a mi prima Alondra y a su esposo Oscar el apoyo para la realización de este trabajo.

Agradezco de manera muy especial a la Dr. Carmen J. Mora Villalpando debido a que este trabajo fue posible gracias a la labor en conjunto con ella, gracias a tu ayuda invaluable, consejos y aportaciones profesionales me permitieron finalizar el presente trabajo, te agradezco la amistad y el tiempo brindado así como los consejos de vida.

Gracias a la M. en C. Carmen Prado por la amistad brindada y por el desarrollo del modelo murino con IRC.

Asimismo, agradezco el apoyo y la colaboración del Dr. José Ramón Paniagua Sierra, la Dr. Marcela Ávila, y a todo el personal de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Nefrológicas del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

También merece una atención muy especial en los agradecimientos la colaboración del Dr. Diego Julio Arenas Arada del la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana del hospital de Especialidades.

Agradezco también a todas las personas que intervinieron en la realización de esta tesis y que durante el tiempo de mi carrera me apoyaron.

Este proyecto fue realizado en la UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN ENFERMEDADES NEFROLÓGICAS con financiamiento de CONACYT por los proyectos:

SALUD-2008-01-87961
SALUD-2009-C01-111941

A todos ustedes muchas gracias

Esta Tesis está dedicada a mis padres

Blanca G. Ongay Arriaga
y
Alejandro Flores Meza

Así como a mi hermano

J. Alejandro Flores Ongay

I. INDICE

INDICE	I
GLOSARIO	III
RELACIÓN DE FIGURAS Y CUADROS	VI
RESUMEN	VII

1 INTRODUCCIÓN

- a. La Enfermedad Renal Crónica en México
- b. Etiología de la Enfermedad Renal Crónica
- c. Características de la Enfermedad Renal Crónica
- d. Clasificación de la Enfermedad Renal Crónica
- e. Cuadro clínico de la Insuficiencia Renal Crónica
- f. Cuadro Bioquímico de la Insuficiencia Renal Crónica
- g. Síndrome MIA en la IRC
- h. Hipoalbuminemia
- i. Albúmina

2 JUSTIFICACIÓN

3 ANTECEDENTES

4 OBJETIVOS

- a. General
- b. Particulares

5 DIAGRAMA DE FLUJO

6 MATERIALES Y MÉTODO

- a. Diseño
- b. Criterios de Inclusión
- c. Criterios de Eliminación
- d. Grupo Control y Modelo IRC
 - i. Grupo Control
 - ii. Grupo IRC
- e. Sacrificio
- f. Cuantificación de Proteínas Totales plasmáticas
- g. Cuantificación de Creatinina plasmática

-
-
- h. Cuantificación de Albúmina plasmática
 - i. Extracción de RNA total de Hígado
 - j. Cuantificación del RNA Total
 - k. Análisis Cualitativo del RNA Total
 - l. Obtención de cDNA (RT-PCR)
 - m. Diseño de Oligonucleótidos para Albúmina y GAPDH
 - n. PRC- Punto Final
 - o. Verificación del producto de PCR
 - p. Purificación del producto de PCR
 - q. Marcaje para secuenciación
 - r. Secuenciación
 - s. PCR-Tiempo Real (QT-PCR)
 - t. Análisis cualitativo del producto de PCR
 - u. Análisis Estadístico

7 RESULTADOS

- a. RNA Total
- b. Proteínas Totales
- c. Creatinina
- d. Albúmina
- e. Cuantificación del mRNA de albúmina
- f. PRC- Tiempo Real (QT-PCR)
- g. PCR Punto Final

8 DISCUSIÓN

9 CONCLUSIONES

10 PERSPECTIVAS

11 BIBLIOGRAFIA

12 ANEXO

II. GLOSARIO

Amortiguador: el amortiguador es un dispositivo que absorbe energía, utilizado normalmente para disminuir las oscilaciones no deseadas de un movimiento periódico o para absorber energía proveniente de golpes o impactos.

Anemia normocítica: problema de salud relacionado con la sangre. Éste es el tipo más común de anemia. Tenerla significa que sus glóbulos rojos son del tamaño normal pero que usted tiene un número bajo de estos.

Anemia normocrómica: Los valores de glóbulos rojos son normales, el tamaño y color son normales, pero la cantidad de hemoglobina esta baja.

Anión gap: Representa la concentración de todos los aniones que no pueden medirse en el plasma.

Aterogenesis: Proceso patológico de origen multifactorial y extraordinaria complejidad, que en esencia está compuesta de dos fenómenos interrelacionados: la aterosclerosis, acumulación focal de lípidos intra y extracelulares, formación de células espumosas y reacción inflamatoria y la esclerosis, endurecimiento cicatrizal de la pared arterial, caracterizado por el aumento del número de miocitos, distrofia de la matriz extracelular y más tardíamente por calcificación, necrobiosis y mayor infiltración inflamatoria.

Debito urinario: Cantidad en peso, de una sustancia eliminada en un tiempo dado, por los riñones.

Dialisis peritoneal: La DP usa su propio peritoneo – una membrana natural que cubre los órganos del abdomen y reviste las paredes abdominales. Esta membrana actúa como un filtro. El peritoneo es una membrana porosa que permite que se filtren de la sangre las toxinas y el líquido.

dNTP: Desoxi- nucleótido- trifosfato

Endotelio: Epitelio plano simple de una sola capa, formado por células endoteliales que recubre el interior de todos los vasos sanguíneos, incluido el corazón donde se llama endocardio.

Etiología: es la ciencia que estudia las causas de las cosas. En medicina (patogénesis) se refiere a las causas que originan una enfermedad.

GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.

Glomerulopatía: Conjunto de enfermedades caracterizadas por la presencia de elementos formes y macromoléculas en la orina con grados variables de insuficiencia renal (IR) (1), producido por pérdida de las funciones normales del glomérulo renal, con manifestación clínica de síndrome nefrótico, síndrome nefrítico, hematuria macroscópica recurrente y alteraciones del sedimento urinario.

Hemodialisis: Método para eliminar de la sangre residuos como potasio y urea, así como agua en exceso cuando los riñones son incapaces de esto (es decir cuando hay un fallo renal). Es una forma de diálisis renal y es por lo tanto una terapia de reemplazo renal.

Hiperfiltración: Incremento en el flujo plasmático de las nefronas.

Hipoalbuminemia: Síndrome nefrótico donde la concentración plasmática de albúmina se encuentra reducida.

Homeostasis hemolítica: Equilibrio en la sangre y sus componentes.

Hormona paratiroidea: Es una hormona proteica liberada por la glándula paratiroides y es el regulador más importante de los niveles de calcio y fósforo en el cuerpo.

Isquemia: sufrimiento celular causado por la disminución transitoria o permanente del riego sanguíneo y consecuente disminución del aporte de oxígeno (hipoxia), de nutrientes y la eliminación de productos del metabolismo de un tejido biológico.

Modelo murino: es un modelo científico en el que se trabaja sobre ratones.

Morbilidad: Número de casos de una enfermedad que aparecen en una población en un cierto período de tiempo.

Mortalidad: Número de muertes debidas a una enfermedad, que aparecen en una población en un cierto período de tiempo.

Natremia: Se refiere a la concentración plasmática de sodio en la sangre humana, el aumento de esta es conocido como hipernatremia y la disminución como hiponatremia ambos son importantes para el metabolismo.

Nefrectomía: consiste en la extirpación de un riñón.

Nefronas: son unidades estructurales y funcionales básicas del riñón, responsable de la purificación de la sangre. Su función principal es filtrar la sangre para regular el agua y las sustancias solubles, reabsorbiendo lo que es necesario y excretando el resto como orina.

Oligo: es un un polimero corto de ácidos nucleicos, de 20 o menos pares de bases.

Ciclo umbral: se refiere al número de ciclos al cual un nivel perceptible de fluorescencia es alcanzado en una RT-PCR tiempo real (Ct).

Oligonucleotidos: son secuencias de ADN o ARN de 50 o menos pares de bases.

Presión coloidosmótica: Presión osmótica debida a las proteínas plasmáticas principalmente conferida por la albúmina al presentar características de un coloide y no permitir la salida del contenido sanguíneo por las paredes del sistema vascular.

Prevalencia: Proporción de individuos de un grupo o una población que presentan una característica o evento determinado en un momento o en un período determinado.

Sepsis: síndrome de respuesta inflamatoria sistémica provocado por una infección grave, altamente sospechada o documentada y caracterizada por lesión generalizada del endotelio vascular (el endotelio se encuentra tapizando el interior de los vasos sanguíneos).

III. RELACIÓN DE CUADROS, FIGURAS E IMAGENES

CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de la ERC

Cuadro 2. Resultados de la expresión del mRNA de albúmina de los grupos IRC y Control

FIGURAS

Figura 1. Concentración de las Proteínas Totales plasmáticas de ratones IRC y Control

Figura 2. Concentración de Creatinina plasmática de ratones IRC y Control

Figura 3. Concentración de albúmina plasmática de ratones IRC y Control

Figura 4. Nivel de Expresión del gen de albúmina en ratones IRC y Control

Figura 5. Curvas sigmoideas del producto de PCR en tiempo real para los estándares de albúmina

Figura 6. Curva estándar de albúmina

Figura 7. Curvas sigmoideas del producto de PCR en tiempo real para los estándares de GAPDH

Figura 8. Curva estándar de GAPDH

Figura 9. Curvas generadas a partir de la QT-PCR de albúmina de ratones IRC y Control

Figura 10. Curvas generadas a partir de la QT-PCR de ratones IRC y Control

Figura 11. Curva de disociación de albúmina de ratones IRC y Control

Figura 12. Curva de disociación de GAPDH ratones IRC y Control

IMÁGENES

Imagen 1. Microcirugía de 5/6 para el desarrollo

-
-
- del modelo IRC**
- Imagen 2. Electroforesis de RNA total extraído de hígado de ratones**
- Imagen 3. Electroforésis de productos de PCR del albúmina en gel de agarosa al 1.5%**
- Imagen 4. Electroforésis de productos de PCR del GAPDH en gel de agarosa al 1.5%**

IV. RESUMEN

La ERC constituye un problema de salud frecuente en la población que genera un alto costo social y económico. Se estima que la IRC afecta del 5 al 10% de la población. Paniagua y Amato (2007) reportan que en México hay una prevalencia de 1,200 personas por millón de habitantes (pmh) con IRC, por lo que en México podrían haber 136,500 casos con necesidad de terapia sustitutiva (hemodiálisis o diálisis peritoneal). Si continúa ésta tendencia se estima que el número de casos de IRC continuará en aumento y para el año 2025 habrá cerca de 212 mil casos. Durante la IRC disminuye la concentración de proteínas negativas de la fase aguda entre ellas la albúmina, proteína que aporta más del 60% del contenido plasmático así como la presión coloidosmótica de la sangre. Se realizó un estudio para determinar el nivel de expresión del gen de la albúmina durante la IRC desde el día 1 al día 70, se observó que los organismos durante los primeros días del estudio presentan una inflamación aguda debido a la cirugía 5/6 sin embargo la hipoalbuminemia no se hace significativa hasta el día 7 y continúa así hasta el día 70. A pesar de que el mRNA de albúmina es el limitante de la traducción de ésta, no se observó una relación proporcional entre el transcrito y la proteína durante la progresión, por lo que creemos que la regulación de la expresión del gen de la albúmina durante la IRC se debe a procesos moleculares complejos.

Palabras Clave: Insuficiencia Renal Crónica, IRC, mRNA, Hipoalbuminemia, Albúmina

1. INTRODUCCIÓN

a. La Enfermedad Renal Crónica en México

La Enfermedad Renal Crónica (ERC) es un problema creciente en todo el mundo y se ha convertido en un problema de salud pública (Zhang, 2008). En las últimas tres décadas (USRDS IPE, 1999; USRAS AD, 1999), como resultado del aumento tanto en la incidencia como la prevalencia se han incrementado los gastos que se requieren para el cuidado de los pacientes con esta enfermedad. En México, la ERC constituye un problema de salud frecuente en la población que genera un alto costo social y económico. Se estima que afecta del 5 al 10% de la población, y que este porcentaje es mayor en adultos de 70 o más años, provocando que esta enfermedad sea una causa importante de morbi-mortalidad. En un estudio realizado en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) Paniagua y Amato en el 2007 reportan que en México hay una prevalencia de 1,200 personas por millón de habitantes (pmh) con esta enfermedad, por lo que en México podrían haber 136,500 casos con necesidad de terapia sustitutiva (hemodiálisis o diálisis peritoneal (Paniagua, 2005; PDTPIRC, 1999).

Desafortunadamente no existe un registro nacional de los pacientes con ERC en México que nos permita conocer con precisión la magnitud del problema y el grado en que los pacientes afectados se benefician del tratamiento que reciben. Por tal motivo, se encomendó a la UNAM, el diseño y ejecución de un estudio para evaluar la situación de la IRCT a nivel nacional, dicho estudio mostró que en el año 2005 insuficiencia renal crónica terminal fue por si misma, la décima causa de muerte a nivel nacional, dando origen a más de 10 mil fallecimientos. Estos resultados permitieron también estimar que aproximadamente 60 mil personas mas mueren cada año con esta enfermedad, pero se registra alguna otra condición como la causa básica. Por lo anterior, se puede decir que el problema de la ERC terminal ha alcanzado ya

dimensiones alarmantes y las proyecciones elaboradas por la UNAM muestran que el número de casos continuará en aumento y que, si las condiciones actuales persistieran, para el año 2025 habrá cerca de 212 mil casos y se registrarán casi 160 mil muertes relacionadas (Paniagua *et al.*, 2007; Avila *et al.*, 2010; López *et al.*, 2010).

b. Etiología de la Enfermedad Renal Crónica

Esta enfermedad es silenciosa ya que los pacientes pueden ser asintomáticos aún con tasas de filtrado glomerular (FG) muy disminuidas, puede producirse como complicación de enfermedades: metabólicas, hereditarias, congénitas, obstructivas y vasculares donde la Diabetes Mellitus, la Hipertensión Arterial (HTA) y las glomerulonefritis son las principales causas de IRC (CAM, 1995; DeFronzo, 1995; Mc Gregor, 1997); en México la nefropatía diabética ocupa el primer lugar como causante de IRC con 41.1%, seguida por la hipertensión arterial con 11% y en tercer lugar la glomerulonefritis con 6.2 % (Paniagua *et al.*, 1998). Las enfermedades cardiovasculares (CV) son las principales complicaciones en el desarrollo de esta enfermedad y aumentan de 5 a 25 veces la tasa de mortalidad de los pacientes con IRC (Placencia- Maya *et al.*, 2000) en relación a los que no padecen enfermedades CV (Aguiles y Mezzano, 2008).

c. Características de la Enfermedad Renal Crónica

La IRC es un síndrome caracterizado por la disminución lenta, progresiva e irreversible de la tasa de filtración glomerular (TFG), la retención de catabolitos nitrogenados, así como por la perturbación de la homeostasis electrolítica y ácido básica (Paniagua *et al.*, 19998; Martín *et al.*, 1997), que se produce a lo largo de la enfermedad. La naturaleza progresiva de la pérdida de la función renal se debe a cambios hemodinámicos compensatorios a nivel glomerular, fundamentalmente hipertensión e hiperfiltración glomerular en las nefronas remanentes, que al tratar de llevar a cabo su

función y la de las nefronas dañadas éstas pueden comenzar a tener un daño sostenido dando lugar a la glomeruloesclerosis (Mitch, 2004).

d. Clasificación de la Enfermedad Renal Crónica

La clasificación de la ERC se basa en el grado de disminución de la función renal valorada por la TFG. Esta última constituye el mejor método para medir la función renal en personas sanas y enfermas. La TFG varía de acuerdo a la edad, sexo y tamaño corporal. El valor normal en adultos jóvenes es de 120-130 mL/min/1.73 m², el cual disminuye con la edad. Por otro lado, una TFG menor de 60 mL/min/ 1.73m² representa la pérdida de más del 50% de la función renal normal en adultos, y por debajo de este nivel la prevalencia de las complicaciones aumentan (Dehesa, 2008; Soriano, 2004; Levey *et al.*, 2005).

La ERC se divide en cinco etapas que toman como referencia la pérdida de reserva funcional del riñón, The National Kidney Foundation Disease Outcomes Quality Initiative (NKF KDOQI) clasifica a la enfermedad renal crónica en cinco etapas (Soriano, 2004) siendo la quinta etapa la correspondiente a la Insuficiencia Renal Crónica caracterizada por presentar un filtrado glomerular menor a los 15 ml/min/1.73m².

Cuadro 1. Clasificación de la ERC.

Etapa	Descripción	FG (ml/min/1.73 m ²)
1	Daño renal + con FG normal	>90
2	Daño renal + con FG ligeramente disminuida	60-89
3	FG moderadamente disminuido	30-59
4	FG gravemente disminuida	15-29
5	Fallo renal - Insuficiencia Renal Crónica	< 15

* La obtención del FG se realiza mediante la depuración de creatinina.

e. Cuadro clínico de la IRC

El cuadro clínico de la IRC asocia manifestaciones propias de la pérdida de filtración glomerular como la disminución del débito urinario generándose una situación de oliguria (diuresis inferior a 400ml/día) o de anuria (70ml/día) acumulándose en la sangre los productos metabólicos y de desecho que en condiciones normales se eliminan por la orina; los más importantes son catabolitos del metabolismo nitrogenado, como la creatinina y la urea generándose un cuadro urémico. La capacidad del riñón para regular la composición del medio interno también se ve afectada durante la ERC provocando retención hidrosalina, hiperpotasemia y otras diselectrolitemias y acidosis. Durante la etiología de la enfermedad aparecen manifestaciones que reflejan la alteración endocrina renal como anemia y osteodistrofia (Tresguerres, et al. 1999) renal, anemia, disfunción plaquetaria, acidosis metabólica, edema, hiponatremia, hiperfosfatemia e hipertensión entre otras (Stenvinkel, *et al.*, 1999).

f. Cuadro Bioquímico de la IRC

El examen más exacto para valorar la función renal es la depuración de la inulina, sin embargo dado que este examen requiere una serie de condiciones especiales para su realización, se ha utilizado la depuración de la creatinina endógena. Si bien este examen subestima la verdadera filtración glomerular entre 10 y 50%, su facilidad de ejecución permite su uso clínico masivo. Existen otras pruebas que correlacionan mejor la depuración de inulina que la depuración de la creatinina, como las que se realizan con marcadores radioisotópicos (Perrone, 1990).

La concentración de la urea y la creatinina indica indirectamente el nivel de la filtración glomerular, pero lamentablemente observar cambios sobre valores considerados normales en la población, ocurren cuando por lo menos el 50% de la función renal ya

se ha perdido. La creatinina y la urea son productos de degradación, la primera proviene del metabolismo proteico muscular y la segunda del aporte exógeno de proteínas, su relación usual es de 1/20 y esta relación se alterará si es que existiera una situación de un notable consumo muscular (Yee- Moon *et al.*, 2003).

Otras anomalías bioquímicas halladas en la insuficiencia renal crónica son los cambios en la concentración de las proteínas contenidas en la sangre como la disminución en la concentración de la albúmina, transferrina, prealbúmina entre algunas, y el aumento de proteínas como las inflamatorias así como por la disminución del calcio sérico que usualmente se encuentra disminuido por la incapacidad de ser absorbido en el intestino delgado, al fósforo sérico que se encuentra elevado por la incapacidad de ser excretado por el riñón enfermo, al aumento de la hormona paratiroidea, al aumento de la fosfatasa alcalina y al hallazgo de anemia (Yee-Moon, *op. cit.*).

Entre las alteraciones más importantes del equilibrio ácido-base, se suele encontrar una acidosis metabólica, normal en las fases tempranas de la insuficiencia renal. La natremia puede estar disminuida por factores dilucionales y el potasio suele encontrarse elevado en la etapa final de la insuficiencia renal. Es importante también subrayar que el magnesio sérico puede encontrarse discretamente elevado (Schoots *et al.*, 1984; Braunwald *et al.*, 2002).

g. Síndrome MIA en la IRC

Un problema importante durante la IRC es la aparición del síndrome MIA (malnutrition, inflammation and atherosclerosis) y de las enfermedades que conlleva este síndrome. Se sabe que en los pacientes con IRC es común la desnutrición debido a que estos pacientes cursan con peso corporal reducido, un pobre almacenamiento de energía

(tejido graso), pérdida de proteínas somáticas (poca masa muscular) y niveles bajos de proteínas como albúmina, transferrina, pre-albúmina (transtiretina) y otras proteínas hepáticas. La etiología de la desnutrición en la IRC es compleja y puede incluir, pérdida de nutrientes durante la diálisis, pérdida del apetito debido a la molestia abdominal y mala absorción de la glucosa. Mientras que por definición la desnutrición se define como la ingesta deficiente de nutrientes; para definirla clínicamente son necesarias mediciones antropométricas tales como la circunferencia muscular del brazo, el espesor de los pliegues cutáneos y fuerza de agarre de la mano; las pruebas de laboratorio realizadas para determinar el estado nutricional de laboratorio son la cinética de la creatinina, la impedancia bioeléctrica, absorciometría de rayos X de energía dual, la resonancia magnética, tomografías computarizadas, la cuantificación de potasio total y la cuantificación del nitrógeno total. Anteriormente se propuso que la desnutrición en los pacientes con IRC generaba hipoalbuminemia, sin embargo se ha demostrado que la baja ingesta proteica no produce hipoalbuminemia si la IRC no está presente (Kaysen, 1998).

Otro factor que también provoca trastornos en la composición proteica del plasma durante la IRC es la inflamación, una condición clínica permanente en el paciente, este estado inflamatorio en los pacientes con IRC (Stenvinkel *et al.*, 2005) podría ser un efecto de la uremia generada en la enfermedad o por la reducción del filtrado glomerular, que podría incrementar los marcadores inflamatorios al reducir su aclaramiento, esto conlleva haber un fenómeno de respuesta proinflamatoria crónica en los pacientes, expresado en la elevación de la concentración de los reactantes positivos de fase aguda determinados en la práctica clínica por la proteína C reactiva (PCR), así como un aumento en la proteína SAA, fibrinógeno, alfa-1-antitripsina y la fibronectina; no obstante también hay un aumento en las interleucinas proinflamatorias IL-6, IL-1beta, y el factor de necrosis tumoral TNF- alpha (Bataille y Klein, 1992). Al mismo tiempo, estos mediadores inflamatorios también son capaces de inhibir la

síntesis hepática de la albúmina, transtiretina (prealbúmina), y transferrina, proteínas consideradas como reactantes negativos de la fase aguda de la inflamación (Nijstein *et al.*, 1987; Clarke *et al.*, 1991; Clark y Fraser, 1993; Zimmermman *et al.*, 1999; Buch, 2009).

El aumento de las citocinas proinflamatorias (tales como IL-6 y TNF- α), y reactantes de fase aguda (PCR y el fibrinógeno) pueden contribuir en la disminución de la concentración de la albúmina provocando hipoalbuminemia; esta inflamación crónica y el estrés oxidativo producido por la uremia y por la inflamación misma contribuyen al daño endotelial y a la aterogénesis, lo cuál genera aterosclerosis durante la IRC (Ross, 1999). La aterosclerosis es un síndrome caracterizado por el depósito e infiltración de sustancias lipídicas en las paredes de las arterias de mediano y grueso calibre. Provoca una reacción inflamatoria y la multiplicación y migración de las células musculares lisas de la pared, que van produciendo estrechamientos de la luz arterial (Robbins y Cotran, 2010). La modificación del endotelio vascular genera cambios importantes en la homeostasis cardiovascular, ésta acelerada aterosclerosis es la mayor causa de enfermedades cardiovasculares caracterizadas en su mayoría por la hipertrofia de ventrículo izquierdo y de la disfunción sistólica ambas llevando a la falla congestiva cardíaca (Parfrey, 2001).

h. Hipoalbuminemia

La hipoalbuminemia es la disminución de la concentración de albúmina en la sangre menor a 3 g/dL y se considera un factor importante de riesgo de morbilidad y mortalidad (Princen *et al.*, 2003; Ortega *et al.*, 2006) en pacientes con IRC, la hipoalbúmina es de igual forma un predictor de mortalidad cardiovascular (CV) en éstos pacientes, sin embargo en pacientes sin IRC éste factor no tiene una asociación

con enfermedades CV (Lowrie y Lew, 1990; Lowrie *et al.*, 1992; Avram, 1996; Kang *et al.*, 1996; Pérez-Oliva *et al.*, 2009).

El cambio en la concentración de cualquier proteína en el plasma durante la IRC puede ser consecuencia de un cambio en la síntesis de la misma, en su catabolismo o del cambio de la tasa de pérdida de ésta en el hemodializador o en el cambio de la distribución del volumen de la proteína a través de la membrana peritoneal en la diálisis peritoneal (Lowrie y Lew, 1990; Lowrie *et al.*, 1992; Avram, 1996; Kang *et al.*, 1996) sin embargo en investigaciones anteriores se ha determinado que la hipoalbuminemia durante la IRC (Kaysen, 1998; Moshage *et al.* 1987; Ortega *et al.*, 2006; Prinsen, 2003) tiene un origen mas complejo, por lo que aun se desconocen las causas que desencadenen la baja de su concentración.

i. Albúmina

La albúmina es una proteína sintetizada en el hígado. 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 (Phillip *et al.*, 1986). Su concentración plasmática es de 3.7 a 5.3 g/dL en personas sanas. Tiene un peso molecular aproximado de 69 kDa (Gibbs, 1999) y una vida media de 16 a 21 días aproximadamente (Phillip *et al.*, 1986). La albúmina es responsable del 75 al 80% de la presión coloidosmótica del plasma y representa más de 60% del contenido de total de proteínas plasmáticas (Murria *et al.*, 1997.).

El 40% del la albúmina se encuentra en la circulación y el resto en el espacio extravascular, sobre todo en el músculo, la piel y los tejidos intersticiales. Tiene como funciones importantes el transporte de sustancias tanto endógenas como exógenas; transporta ácidos grasos, colesterol, lipoproteínas, fosfoglicéridos, bilirrubina, iones de calcio, hormonas esteroides (estradiol, progesterona, testosterona, aldosterona y

estrona) y aminoácidos, así como numerosos medicamentos como la penicilina, sulfamidas, tetraciclina, barbituratos, digoxina y salicilatos entre otros (Tresguerres *et al.*, 1999; Garc3a- Salcedo 2003).

Por su uso como transportador, la alb3mina es considerada una mol3cula antioxidante del organismo al acoplarse a ella radicales libres, liberados por sepsis, inflamaci3n o isquemia; evita la peroxidaci3n lip3dica y la lesi3n de las membranas celulares (Barzaga *et al.*, 2004).

Se ha reportado que la limitante en la s3ntesis de la alb3mina se debe a los bajos niveles de transcripci3n de la misma, sin embargo a3n se desconocen el comportamiento del mensajero y de la prote3na durante la progresi3n de la IRC (Moshage, 1987).

2. JUSTIFICACI3N

La insuficiencia renal cr3nica constituye un problema de salud frecuente en la poblaci3n, que genera un alto costo social y econ3mico. Durante la etiolog3a de la IRC la concentraci3n de la alb3mina disminuye debido a factores complejos, se ha logrado determinar que los niveles de transcripci3n del gen de alb3mina son los limitantes que determinan la concentraci3n de 3sta en plasma sin embargo se desconocen este proceso durante la progresi3n de la enfermedad.

3. ANTECEDENTES

Lowrie y Law, 1990; Lourie *et al.*, 1992 mencionan que la hipoalbuminemia es un fuerte predictor de muerte en pacientes con hemodi3lisis mientras que Kang, *et al.*, en 1996 lo menciona para personas tratadas con di3lisis peritoneal c3ntinua e incluso

cuando la hipoalbuminemia se presentaba antes del la diálisis según Avram *et al.*, en 1996.

Hiroyashu *et al.*, en 1980 observó la ausencia del mRNA de albúmina en el hígado de ratas analbuminémicas, por lo que concluyen que la concentración del transcrito del gen de la albúmina es la causa determinante en la síntesis de la misma.

Moshage *et al.*, en 1987 investigaron el probable mecanismo molecular de la reducción de la síntesis de albúmina durante la inflamación usando experimentos 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.

Kaysen en 1998 habla acerca de la catálisis de la albúmina durante la IRC y menciona que ésta ocurre a través de un proceso de primer orden lo cuál significa que la proteína de albúmina es catalizada dependiendo de la concentración que hay de ésta en la sangre, por lo que se supondría que al disminuir la concentración de la albúmina en la sangre su catabolismo disminuiría también por lo que de esta forma se provee una forma de protección en el contenido de albúmina cuando su tasa de catálisis se altera.

Stenvinkel *et al.*, en 1999 Estudia la relación entre la aterosclerosis, desnutrición y la inflamación en pacientes con insuficiencia renal crónica, en sus resultados indica que el rápido desarrollo de la aterosclerosis en etapas avanzadas de enfermedad renal crónica es llebado a cabo por la interacción de mecanismos, como la desnutrición, la inflamación así como componentes genéticos.

4. OBJETIVOS

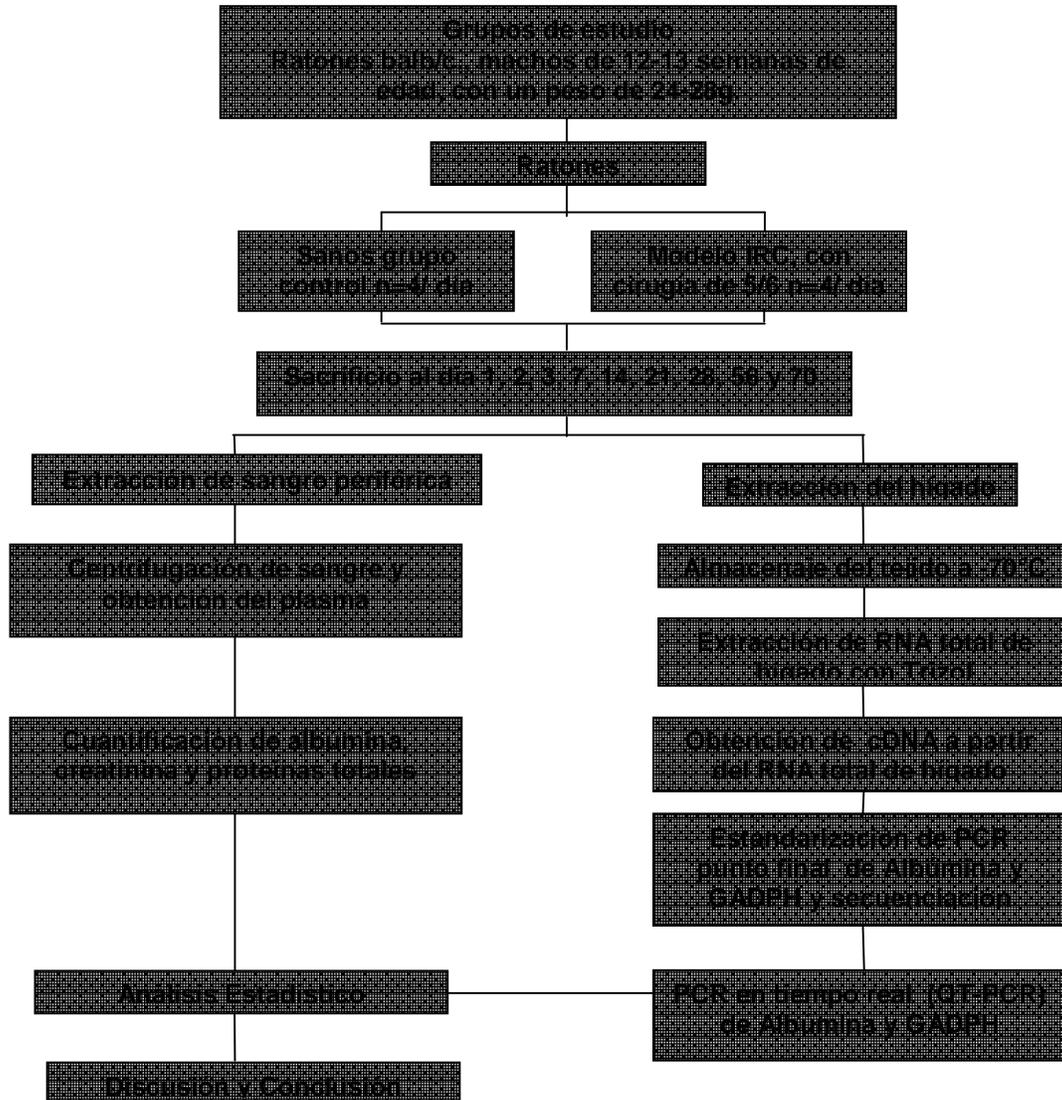
Objetivo General

- Determinar el Nivel de Expresión del mRNA del gene de albúmina durante la progresión de la insuficiencia renal crónica en un modelo murino.

Objetivos Particulares

- Desarrollo de un modelo murino con IRC.
- Cuantificación de la concentración plasmática de albúmina, creatinina y proteínas totales.
- Cuantificar la expresión del transcrito de albúmina por QT-PCR en hígado.
- Conocer el comportamiento del mRNA de albúmina y la concentración de la albúmina plasmática durante la progresión de la IRC.

5. DIAGRAMA DE FLUJO



6. MÉTODOS

a. Diseño

Este trabajo fue experimental, longitudinal y realizado en ratones. Se hizo un seguimiento de 10 semanas, del día 1 hasta el día 70, tanto para el grupo control como para el grupo IRC el intervalo fue: 1, 2, 3, 7, 14, 21, 28, 56 y 70 días; para cada tiempo se formaron subgrupos de 4 animales. Cada grupo de trabajo incluyó 9 subgrupos y en total fueron utilizados 72 animales.

b. Criterios de inclusión:

Ratones balb/C, macho de 12-14 semanas de edad, con 24-28 g. de peso.

c. Criterios de eliminación:

Se eliminaron a todos los ratones con enfermedad o infecciones desarrolladas durante el estudio o aquellos que murieron antes de la fecha señalada para el sacrificio.

d. Grupo Control y Modelo con IRC

i. Grupo control

Como grupo Control se utilizaron ratones de 12 a 14 semanas de edad y con un peso de entre 24g a 28g a los cuáles no se les practicó ningún tipo de tratamiento y a los que se les dio el seguimiento dependiendo del subgrupo al que perteneció cada uno.

ii. Nefrectomía de 5/6

Al modelo con IRC se le realizaron dos cirugías para poder emular la alteración de la función renal e inducirles un estado urémico (Figura 1). En la primera cirugía se le realizó la ablación del riñón izquierdo, se le permitió estabilizarse al organismo una semana y al término de este tiempo se le practicó la segunda cirugía retirándole 2/3 partes del riñón. (Anexo 1).



Imagen 1. Microcirugía de 5/6 para el desarrollo del modelo con Insuficiencia Renal.

e. Sacrificio

Una vez realizada la segunda cirugía y al haber transcurrido el tiempo de seguimiento, los ratones de los dos grupos fueron sacrificados. El sacrificio fue realizado administrando una mezcla de Xilacina-Ketamina 1:1 para anestesiarse a los organismos, posteriormente se extrajo la sangre total con una jeringa heparinizada, se les extrajo el hígado y el tejido fue almacenado a -70°C y la sangre fue centrifugada a $1500\times g$ durante 15 minutos a 4°C para obtener el plasma el cual fue almacenado en tubos eppendorf a -20°C .

f. Cuantificación de Proteínas Totales plasmáticas

Las proteínas totales fueron cuantificadas por espectrofotometría utilizando el equipo "NanoDrop 1000" en el que se colocó $1\mu\text{L}$ de plasma para realizar la cuantificación de la concentración a una longitud de onda de 280nm . (Anexo 2)

g. Cuantificación de Creatinina plasmática

Para la cuantificación de la creatinina plasmática se utilizó el autoanalizador “Hitachi 902”, el cuál utilizó el método del Jaffé cinético reacciona el ácido pícrico con la creatinina, formándose un complejo detectado a una longitud de onda de 505nm. La intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de producto. (Anexo 3)

h. Cuantificación de Albúmina plasmática

Para la cuantificación de la albúmina plasmática se utilizó el autoanalizador “Hitachi 902” por el método de Azul de Bromocresol (BCG), en el que se lleva a cabo la reacción de éste con la albúmina formándose un complejo verde-azul, permitiendo hacer una cuantificación colorimétrica a 570nm. (Anexo 4)

i. Extracción de RNA total de Hígado

La extracción de RNA total se realizó a partir hígado. Se utilizaron 200mg de hígado para realizar la técnica. El hígado fue homogeneizado con Trizol y extraído el RNA con isopropanol, centrifugado, lavado e incubado hasta obtener una pastilla blanquecina o transparente (en donde se encuentra el RNA total) la cuál se reconstituyó con agua DEPC dependiendo de la cantidad de pastilla observada. (Anexo 5)

j. Análisis Cuantitativo del RNA Total

Se realizó la cuantificación del RNA total en el espectrofotómetro “NanoDrop ND-1000”. Se tomó 1µL de cada muestra, y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 260nm, también se obtuvo la lectura entre las longitudes de onda de 260-280 para verificar la pureza del RNA total extraído.

k. Análisis Cualitativo del RNA Total

La integridad del RNA total extraído se verificó mediante la separación electrofororética en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio.

I. Obtención de cDNA (RT-PCR)

El cDNA se produjo mediante la técnica del RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa). Se utilizó oligo dT; la reacción se llevó a cabo con el estuche "SuperScript First-Strand" de "Invitrogen". Se partió de 5µg de RNA total, utilizando un termoblock "Termomixer comfort Eppendoff" para hacer incubaciones a diferentes temperaturas. Posteriormente las muestras se almacenaron a -20°C o fueron utilizadas de inmediato para qt-PCR. (Anexo 6)

m. Diseño de Oligonucleótidos para Albúmina y GAPDH

Se utilizó el programa PRIMER1 para diseñar los oligonucleótidos específicos para llevar a cabo las QT-PCR de albúmina y GAPDH. (Anexo 7)

Los oligos para la PCR del mRNA de Albúmina obtenidos fueron los siguientes:

El oligo sentido. Upalpi con una Tm de 61°C.

5' CCTCTGGCAAATGAAGTGG 3'

El oligo antisentido "Donalpi" con una Tm de 60°C.

5' GAAACACACCCCTGGAAAAAAA 3'.

Oligos utilizados para amplificar los transcritos del gen normalizador GAPDH:

(gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa).

El oligo sentido Gasen con una Tm de 64°C.

5' ATGTGTCCGTCGTGGATCTGA 3'

Oligo antisentido Ganti con una Tm de 63°C:

5' TTGAAGTCGCAGGAGACAACCT 3'

n. PCR-Punto Final

Se realizaron PCR punto final en gradiente para obtener las condiciones óptimas amplificar los mensajeros de albúmina y GAPDH, para verificar el producto se observaron las bandas generadas en geles de agarosa al 1.5% y se determinó la correspondencia de éstas con los tamaños de los fragmentos esperados. (Anexo 8).

Las condiciones óptimas para llevar a cabo las PCR tanto de albúmina como de GAPDH fueron:

Albúmina: Activación de la Taq- 95°C, 3min; Desnaturalización - 94°C 15s;

Hibridación- 59°C, 30s; Extensión- 72°C, 30s.

GAPDH: Activación de la Taq - 95°C, 3min; Desnaturalización - 94°C 15s;

Hibridación - 64°C, 30s; Extensión - 72°C, 30s.

o. Verificación del producto de PCR

Se preparó un gel de agarosa al 1.5% en amortiguador TBE 1x , se cargaron 2µL del producto de PCR con 1µL de amortiguador de carga, 1.5µL de marcador de peso molecular de 50 pb con 1µL de amortiguador de descarga y se dejó correr durante 40 minutos a 70 volts. Al término de la electroforesis se observó el gel en un transiluminador de luz UV para observar el producto

p. Purificación del producto de PCR

La purificación del producto de albúmina se realizó con un estuche de purificación de producto de PCR en gel QIAGEN-QIA QUICK, después de haberse realizado la electroforesis en gel de agarosa al 1.5% fue cortada la banda con el producto amplificado y se pesó en una balanza analítica, fueron colocados 400 mg de gel en un tubo eppendorff de 1.5 ml estéril. Se añadieron 30 µl de Buffer de Solubilización de Gel (L1) por cada 10 mg de gel, se diluyó el gel, se filtró el producto amplificado una vez separado del gel, se lavó y finalmente se eluyó para ser cuantificado en un NanoDrop ND-1000, posteriormente se almacenó el tubo a -20°C. (Anexo 9)

q. 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 Biosystem), 0.16 μ L del iniciador en sentido 5'-3', 5-20ng del producto purificado previamente y agua estéril, para un volumen total de 20 μ L, 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).

r. Secuenciación

Una vez seca la muestra se secuenció en un secuenciador comercial de Applied Biosystem ABI prism – de 16 capilares. (Laboratorio de Bioquímica, Unidad de Biología, Tecnología y Prototipos (UBIPRO). FES - I, UNAM).

s. PCR-Tiempo Real (QT-PCR)

Fue utilizado un termociclador “Rotor Gene-3000” de Tiempo Real de “Corbett Research” para cuantificar el transcrito del gene de albúmina y llevar a cabo las reacciones de PCR Tiempo Real con Syber Green. Como gene normalizador de la expresión del gene de la Albúmina fue utilizado el gene de GAPDH. Se trazó una curva estándar de cinco puntos en cada una de las reacciones de qT-PCR para interpolar los datos de cada muestra y obtener el “ciclo umbral” o Cycle treshold (Ct) correspondiente. (Anexo 10) (Figura 1)

t. Análisis cualitativo del producto de PCR

Para el análisis del producto de PCR se realizaron electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para observar los patrones de las bandas de los productos amplificados y de esta forma verificar que los productos tuvieran el peso molecular adecuado y no hubiera productos inespecíficos. El gel fue preparado con amortiguador TBE 1x; en los pozos del gel se depositaron 7 μ L del producto de PCR más 2 μ L de amortiguador de descarga tipo II, para observar los productos amplificados, y se usó 1.5 μ L de marcador de peso molecular de 50pb "Promega" con 1 μ L de amortiguador de descarga tipo II, para determinar si el peso molecular del producto amplificado fue el adecuado. La electroforesis se hizo durante 40 minutos a 70 volts. Una vez terminado el tiempo de corrimiento, el gel se colocó en el transiluminador para observar las bandas.

u. Análisis Estadístico

Se aplicó la prueba de t-Student para el análisis de los datos.

7. RESULTADOS

a. RNA total

La imagen 2 presenta el gel de agarosa 1% de RNA total extraído de ratones con IRC la digitalización se realizó en un transiluminador "Bio Rad" a una longitud de onda de 340 nm. Se muestran las bandas 28s y 18s visibles en el gel respectivas al RNA ribosomal el cuál forma del 80% al 90% del RNA total. Se puede ver por debajo de las bandas correspondientes al mRNA total, unas bandas más tenues correspondientes a los RNA's pequeños.

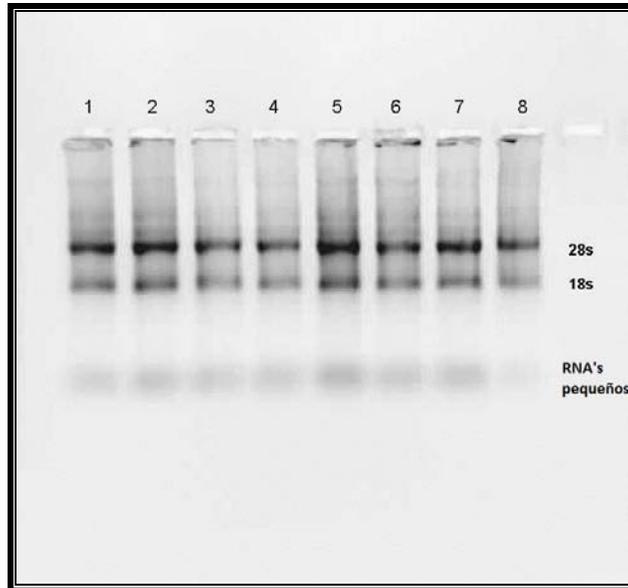


Imagen 2. Electroforesis de RNA total extraído de hígado de ratones. En los carriles 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 se observan las bandas 28s y 18s correspondientes al RNA ribosomal.

b. Proteínas Totales

Los resultados de la cuantificación de las proteínas totales del plasma de los ratones IRC y controles (Fig. 1) variaron durante los 70 días; en el grupo de IRC en los días 1, 2 y 3, la concentración de PT fue mayor respecto a los controles: día 1: 5.06 ± 0.83 g/dL grupo IRC, 2.75 ± 0.2 g/dL control ($p=0.011$); día 2: 6.28 ± 0.94 g/dL IRC, 2.47 ± 0.23 g/dL control ($p=0.007$) y día 3: 4.89 ± 0.44 g/dL IRC y 2.90 ± 0.81 g/dL control ($p=0.046$). En el día 7, la media las PT del grupo control aumentó hasta 4.64 ± 0.37 g/dL siendo ésta concentración la más alta presentada por el grupo control durante los 70 días del estudio mientras que en el día 14 la media del grupo IRC disminuyó hasta 2.38 ± 0.59 g/dL, en ambos casos no hubo diferencia significativa. Las concentraciones continuaron variando hasta el día 70 en donde las medias de ambos grupos no presentaron diferencias significativas, y obteniendo medias de concentración similares. (IRC: 3.54 ± 0.15 g/dL; Control: 3.52 ± 0.25 g/dL).

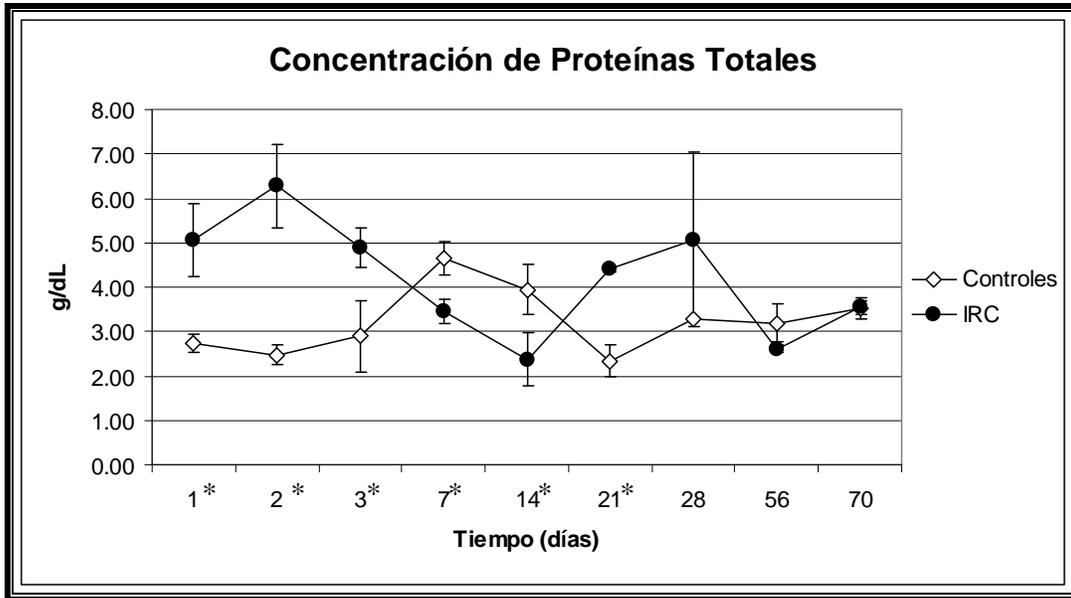


Figura 1. Concentración de las Proteínas Totales plasmática de ratones IRC y controles durante. Eje de las X = g/dL, eje de las Y= Tiempo (días).

*p significativa cuando < 0.05

c. Creatinina.

En los primeros 7 días, el grupo IRC mostró una media de creatinina plasmática por encima del grupo control (Fig. 2), día 1: IRC: 0.74 ± 0.15 mg/mL; Control: 0.24 ± 0.01 (p=0.008) ; día 2: IRC: 0.84 ± 0.20 mg/mL; Control: 0.27 ± 0.04 mg/dL (p=0.009); día 3: IRC: 0.74 ± 0.22 mg/dL; Control: 0.22 ± 0.02 mg/dL (p=0.023) y día 7: IRC: 0.80 ± 0.04 mg/dL; Control: 0.27 ± 0.14 mg/dL (p=0.126). En los días 14 y 21 no hay diferencias significativas entre los dos grupos; en los días 28 y 56 las medias de la concentración de creatinina plasmática registraron un aumento a: 0.50 ± 0.08 mg/dL p=0.008 y 0.55 ± 0.07 mg/mL p<0.0001 respectivamente; en el día 70 la media del grupo IRC disminuyó a 0.31 ± 0.03 mg/mL presentando diferencia significativa en relación al grupo control 0.15 ± 0.04 mg/dL (p=0.007).

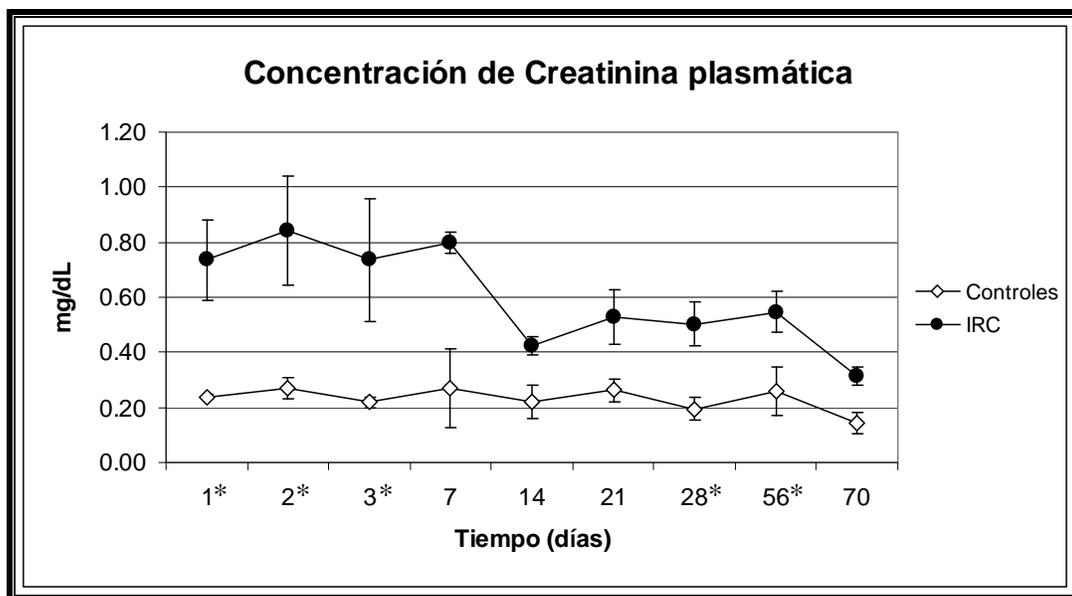


Figura 2. Concentración de Creatinina plasmática (mg/dL) de ratones IRC y control a lo largo del tiempo. Eje de las X = mg/dL, eje de las Y= Tiempo (días).

*p significativa cuando < 0.05

d. Albúmina.

Los resultados de la concentración de la albúmina plasmática (Fig. 3) muestran disposición a la disminución en relación al grupo control, aunque del día 1 al 7 no hay diferencias significativas (día 1: IRC: 1.7 ± 0.05 g/dL, Control: 1.85 ± 0.19 g/dL, $p=0.220$; día 2: IRC: 1.58 ± 0.30 g/dL, Control: 1.99 ± 0.09 g/dL, $p=0.081$; día 3: IRC: 1.64 ± 0.08 g/dL, Control: 1.96 ± 0.19 g/dL, $p=0.055$; día 7: IRC: 1.58 ± 0.12 g/dL, Control: 2.61 ± 0.33 g/dL, $p=0.122$); como se observa no hay variaciones acentuadas en IRC en ese lapso. Del día 14 al 70 estas diferencias se hacen significativas (día 14: IRC: 1.40 ± 0.08 g/dL, Control: 2.47 ± 0.38 g/dL, $p=0.27$; día 21: IRC: 1.37 ± 0.03 g/dL, Control: 2.89 ± 0.61 g/dL, $p=0.48$; día 28: IRC: 1.65 ± 0.46 g/dL, Control: 2.44 ± 0.24 g/dL, $p=0.25$; día 56: IRC: 1.13 ± 0.07 g/dL, Control: 1.96 ± 0.02 g/dL, $p<0.0001$; día 70: IRC: 1.49 ± 0.18 g/dL, Control: 2.20 ± 0.35 g/dL, $p=0.043$).

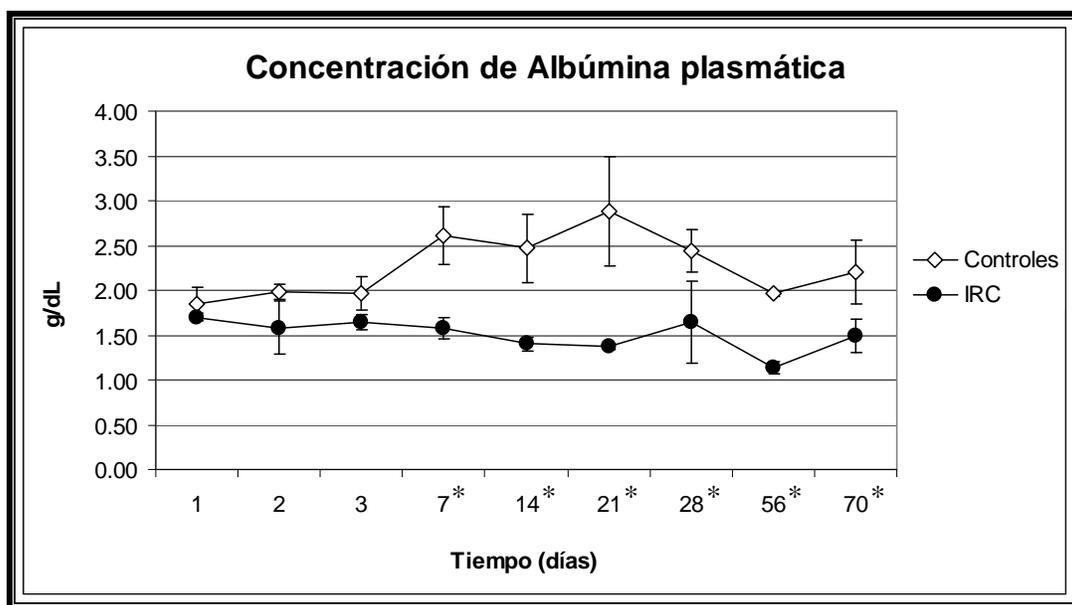


Figura 3. Concentración de Albúmina plasmática (g/dL) de ratones IRC y controles. Eje de las X = g/dL, eje de las Y= Tiempo (días).

*p significativa cuando < 0.05

e. Cuantificación del mRNA de Albúmina.

Los resultados de la cuantificación del mensajero del gene de albúmina de hígado del grupo IRC (Fig. 4) muestran un comportamiento variable del día 1 al 14, (día 1: 4.88 ± 0.9 unidades relativas de expresión (UR) al día 14 (11.03 ± 2.98 UR); pero después del día 14 hasta el día 70 se observa una tendencia hacia la disminución.

La tendencia del mRNA de albúmina del control también tuvo un comportamiento variable sin embargo no hubo diferencia significativa entre los grupos; la más alta en relación al nivel de expresión del gene de albúmina la presentó el día 7 el grupo control con 31.55 ± 1.03 UR y la media más baja en el mismo grupo la registró el día 28 con 24.88 ± 2.84 UR.

En el grupo IRC la concentración de mRNA mostró diferencias significativas en todos los tiempos en relación al grupo control (Ver cuadro 2), así como entre el valor del día 70 respecto al día 1 del grupo IRC (día 1 IRC: 4.88 ± 0.89 UR, día 70: 2.26 ± 1.39 UR, $p= 0.030$), y entre el día 70 del grupo IRC respecto al día 1 del grupo control (día 70: IRC: 2.26 ± 1.39 UR; día 1: Control: 28.44 ± 0.85 UR, $p<0.001$).

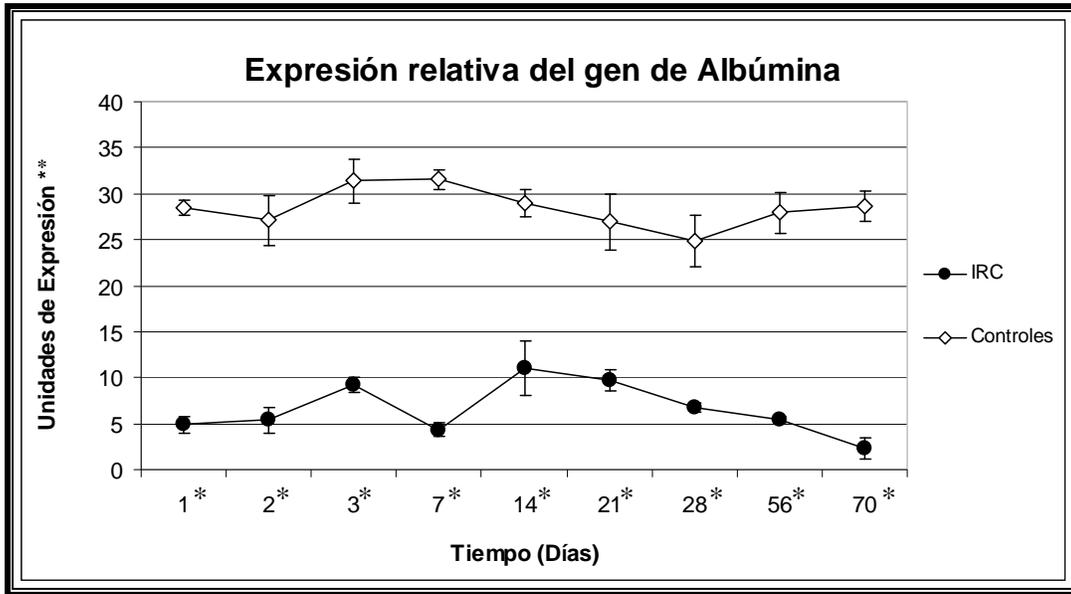


Figura 4. Nivel de Expresión del gen de albúmina (UR) en ratones IRC y controles a lo largo del tiempo.

**Unidades Relativas en relación al gen normalizador GAPDH.

*p significativa cuando < 0.05

Cuadro 2. Resultados de la expresión del mRNA de albúmina de los grupos IRC y controles.

Día	Expresión del mensajero (Media en UR*)		Desv. tip.	*p
	IRC	Control		
1	4.88229025	28.4451398	1.30686	0.001
2	5.41867834	27.0791965	3.88964	0.002
3	9.21384551	31.3875701	1.99637	0.000
7	4.35854956	31.547967	1.84313	0.000
14	11.0329716	28.9106832	4.2837	0.004
21	9.67411583	26.9220906	3.09972	0.002
28	6.75099033	24.8830893	3.04457	0.001
56	5.48493648	27.9235871	2.26189	0.000
70	2.26203238	28.6260582	2.6241	0.000

*Unidades Relativas en relación al gene normalizador GAPDH.

*p significativa cuando < 0.05

En la cuadro 2 se muestran los días de progresión de la IRC, las medias de los valores de expresión correspondientes a IRC y controles, la desviación típica y las diferencias significativas obtenidas del análisis estadístico con la prueba de t.

f. PCR Tiempo Real (QT-PCR)

En la imagen 5 se observan las curvas sigmoideas de albúmina generadas a partir de la señal de fluorescencia emitida por el Sybr Green durante el proceso de la qT-PCR, se muestran diferentes concentraciones de cDNA y sus diferentes señales en el eje de las abscisas (St1: 2ng/μL; St2: 0.2ng/μL; St3: 0.02ng/μL; St4: 0.002ng/μL; St5: 0.0002ng/μL) y el número de ciclos transcurridos en el eje de las ordenadas, lo anterior se realizó para la obtención de la curva estándar en QT-PCR e interpolar el Ct (Cycle-Threshold) de las muestras problema de albúmina y así calcular la concentración del mRNA de albúmina de las muestras de ratones IRC y control. En la imagen 6 se muestra la curva generada con un pool de mRNA de ratones control, con una correspondencia de $r=0.99526$ y una eficiencia de 1.91.

En la imagen 7 al igual que en la imagen 8 de albúmina se muestra las curvas generadas a partir de la fluorescencia emitida por el Syber Green de una reacción de qt-PCR de GAPDH y al igual que para la reacción de albúmina se generó la curva a partir de un pool de mRNA total de ratones controles para traspolar los Ct de las curvas sigmoideas de las muestras de los ratones IRC y control como se observa en la imagen 7, con una correspondencia de $r=0.99964$ y eficiencia de 1.91.

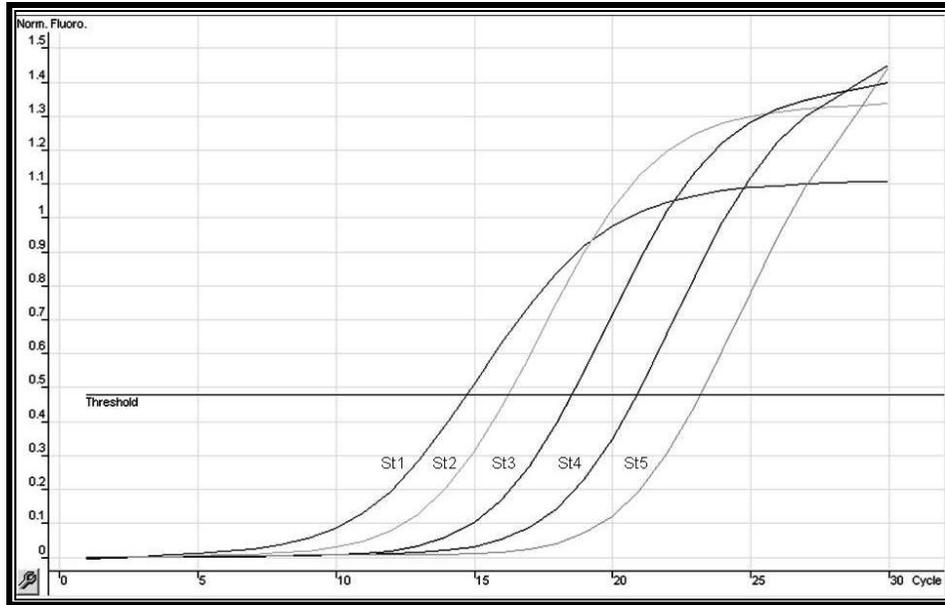


Figura 5. Curvas sigmoideas de el producto de PCR en tiempo real para los estándares de albúmina (St1= 2 ng/μL, St2= 0.2 ng/μL, St3= 0.02 ng/μL, St4= 0.002 ng/μL y St5= 0.0002 ng/μL). En el eje de las ordenadas se observa el número de ciclos que han transcurrido y en el eje de las abscisas se observa la fluorescencia producida por el Sybr Green. Se muestra el Ciclo Umbral (Threshold) establecido en la fase exponencial de la reacción de la lectura más precisa.

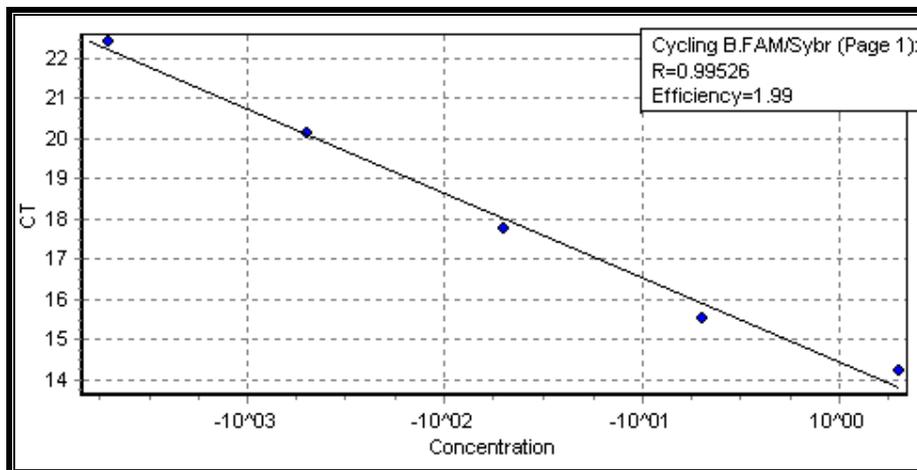


Figura 6.- Curvas estándar de albúmina, generada a partir de los estándares en diferentes concentraciones de cDNA control (2; 0.2; 0.02; 0.002; 0.0002 todas en ng/μL).

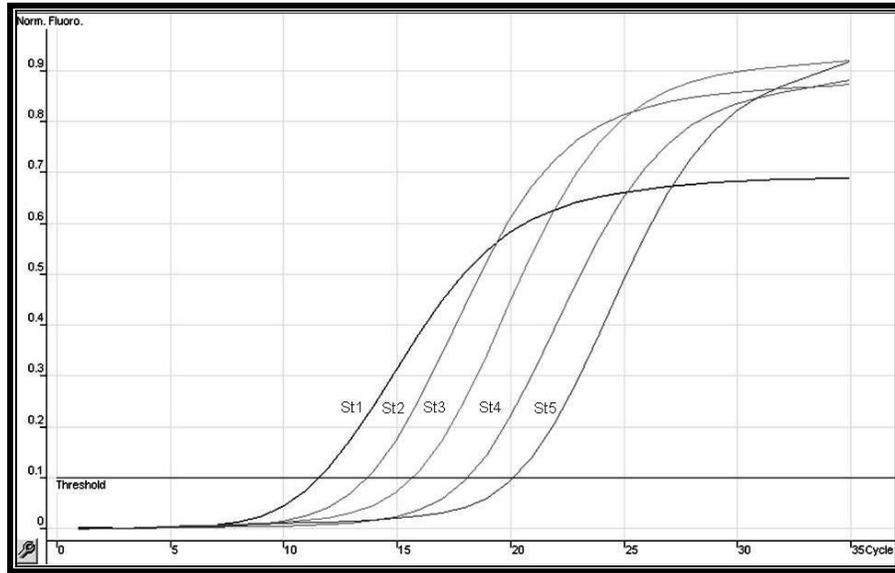


Figura 7. Curvas sigmoideas del producto de PCR en tiempo real para los estándares de GAPDH (St1= 2 ng/μL, St2= 0.2 ng/μL, St3= 0.02 ng/μL, St4= 0.002 ng/μL y St5= 0.0002 ng/μL). En el eje de las ordenadas se observa el número de ciclos que han transcurrido y en el eje de las abscisas se observa la fluorescencia producida por el Sybr Green. Se muestra el Ciclo umbral (Threshold) establecido en la fase exponencial de la reacción de la lectura más precisa.

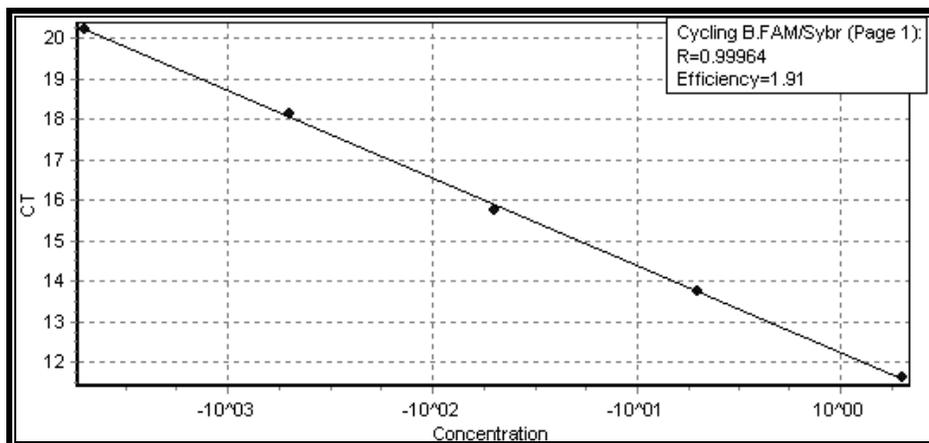


Figura 8. Curva estándar de GAPDH, generada a partir del cDNA en diferentes concentraciones (2; 0.2; 0.02; 0.002; 0.0002 todas en ng/μL) partir de un pool de mRNA total de ratones controles.

En la Imagen 9 se muestran las curvas generadas a partir de la señal emitida por la señal del fluoróforo al realizarse la reacción de PCR – Tiempo real de albúmina, cada curva corresponde a una muestra de mRNA de ratón, en la imagen 8 se observa que entre el ciclo 9 y 11 la señal comienza a aumentar la concentración del mRNA hasta llegar a la fase exponencial entre los ciclos 11 y 15 donde posteriormente se comienza a crear las asíntotas o fase Plateau y la señal del fluoróforo se mantiene constante en relación al tiempo.

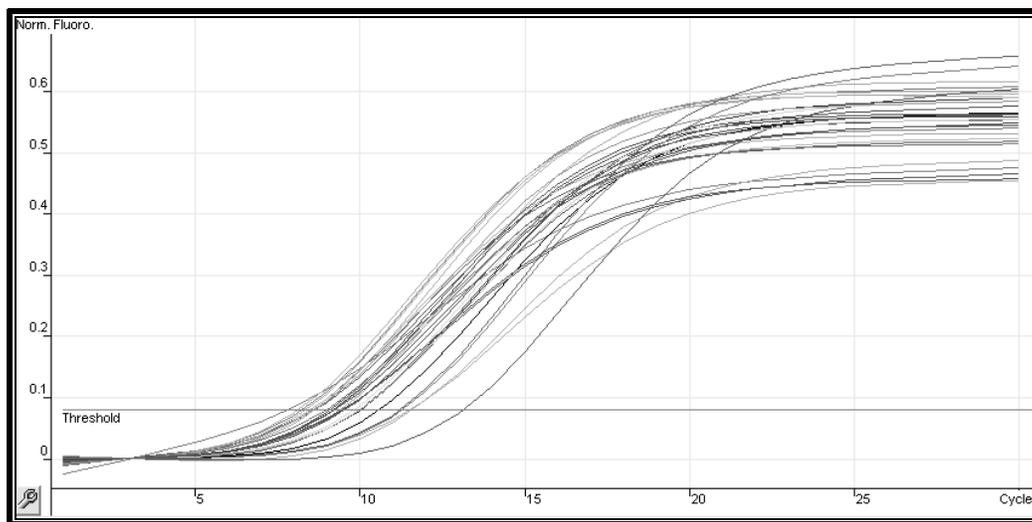


Figura 9. QT-PCR de albúmina de ratones IRC y control, en el eje de las ordenadas se observa la señal emitida por el fluoróforo durante los ciclos transcurridos mostrados en el eje de las Y. Se muestra el Ciclo Umbral (Threshold) obtenido con la curva estándar para el cálculo del Ct de cada muestra.

En la Figura 10 al igual que la imagen descrita anteriormente, se muestran las curvas producidas por la señal del fluoróforo al producirse la reacción de PCR-Tiempo real para GAPDH, en la imagen se observa el aumento de la concentración de mRNA de GAPDH desde el ciclo 7, entre el ciclo 16 al 25 la concentración del mRNA aumenta hasta llegar a la fase Plateau entre los ciclos 21 y 25 donde la señal del fluorófono ya no aumenta.

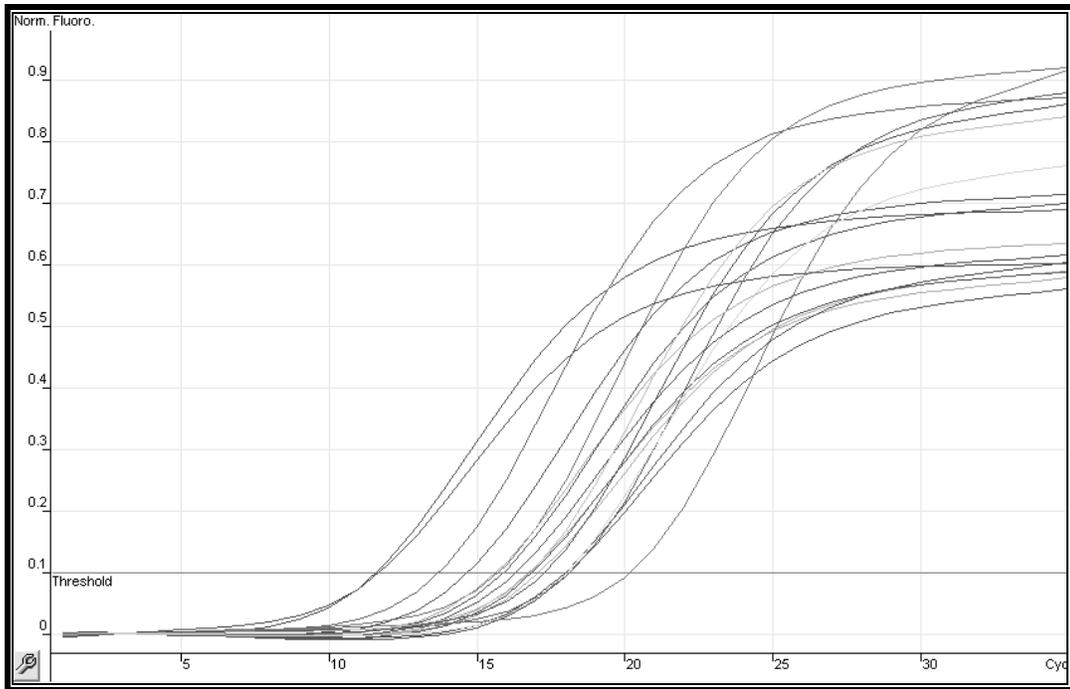


Figura 10 QT-PCR de GAPDH de DNA de ratones IRC y control, en el eje de las X se observa la señal emitida por el fluoróforo (Sybr Green) durante los ciclos transcurridos mostrados en el eje de las Y y el Theshold obtenido con la curva estándar para el cálculo del Ct de cada muestra.

En la Figura 11 se ilustran las curvas de disociación del mRNA del gene de albúmina, donde se observa que el producto amplificado es único en todas las muestras, ya que presentan la misma temperatura de desnaturalización representada en la imagen como Bin C= ~84.5°C.

La temperatura de desnaturalización se observa en los picos máximos de la imagen y se puede apreciar que entre los intervalos de temperatura representados en la imagen como Bin A= 83°C a Bin B= 89°C, no hay picos en diferentes temperaturas de desnaturalización a los presentados por el mRNA de albúmina, lo cuál demuestra que no hubo productos inespecíficos o diferentes al mRNA de albúmina. Cabe señalar que

la intensidad de la señal emitida por el fluoróforo y la intensidad del pico generado está en proporción a la cantidad de producto generado.

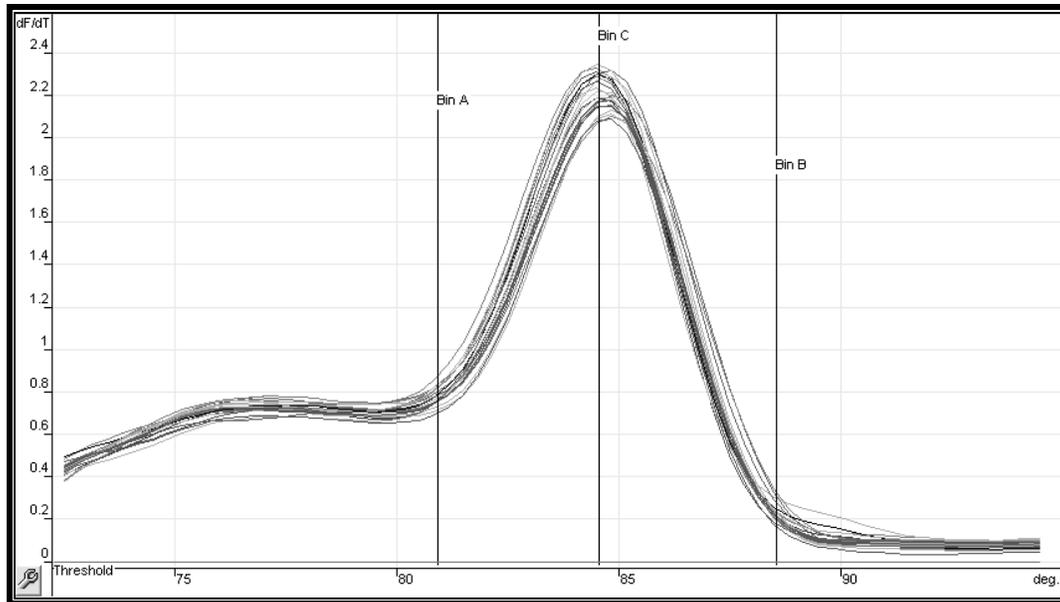


Figura 11. Curva de disociación del mRNA del gen de albúmina generados a partir de qT-PCR. Donde el eje de las ordenadas muestra la temperatura en °C que progresa en relación al tiempo, mientras que el eje de las abscisas muestra la dF/dT que es la proporción del incremento de la fluorescencia respecto al incremento del tiempo.

En la Figura 12 puede observar la curva de disociación del mRNA del gene de GAPDH en donde se muestra que el producto de PCR-Tiempo real es único en todas las muestras debido a que la desnaturalización se presentan a la misma temperatura representada en la imagen por Bin C= 90.5°C.

Respecto a la curva de disociación del mRNA del gene de GAPDH, entre Bin A= 87°C a Bin= B94°C tampoco se generaron productos inespecíficos o diferentes a los del mRNAs analizados; al igual que en la imagen anterior, los picos máximos de las curvas están en proporción a la concentración de producto generado.

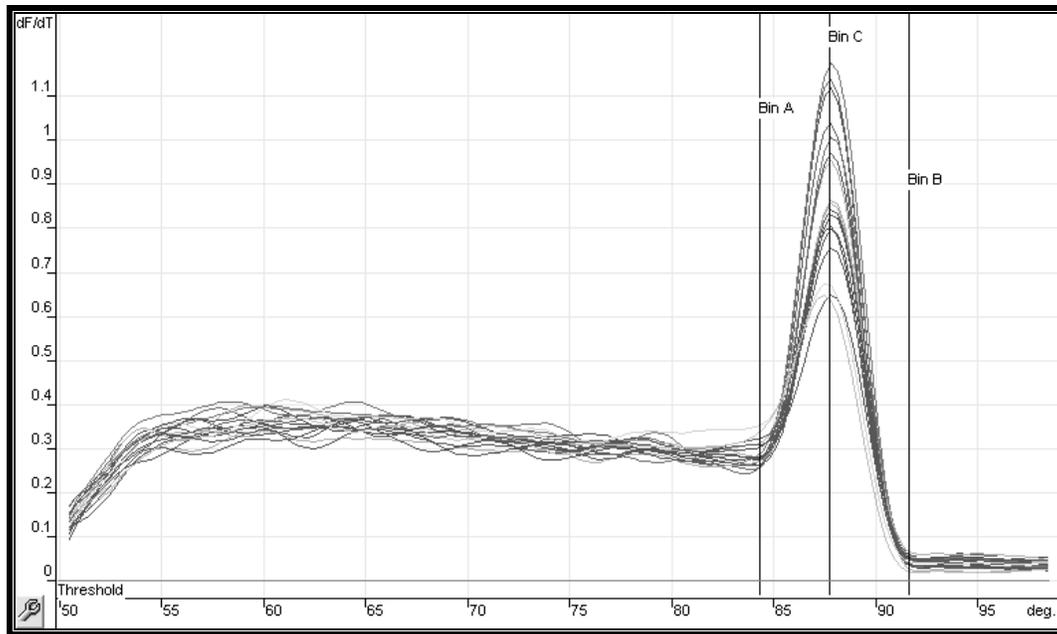


Figura 12. Curvas de disociación del mRNA del GAPDH. Se muestra el producto de qT-PCR de GAPDH. Donde el eje de las ordenadas muestra la temperatura en °C que progresa en relación al tiempo, mientras que el eje de las abscisas muestra la dF/dT que es la proporción del incremento de la fluorescencia respecto al incremento del tiempo.

g. PCR Punto Final

En la imagen 2 se observan los productos de PCR punto final de albúmina, en las columnas 2, 3 y 4 se muestran las bandas de los productos obtenidos al término de la reacción; el peso esperado de la banda de albúmina es de 135pb y de acuerdo al marcador de peso molecular las bandas de los carriles antes mencionados coinciden con el tamaño de fragmento esperado.

En la imagen 3 se observa el producto de PCR punto final de GAPDH, donde al igual que en el gel de albúmina se puede ver que el los producto obtenido al término de la reacción con respecto al marcador de peso molecular concuerda con el peso esperado para el fragmento de GAPDH de 142pb.

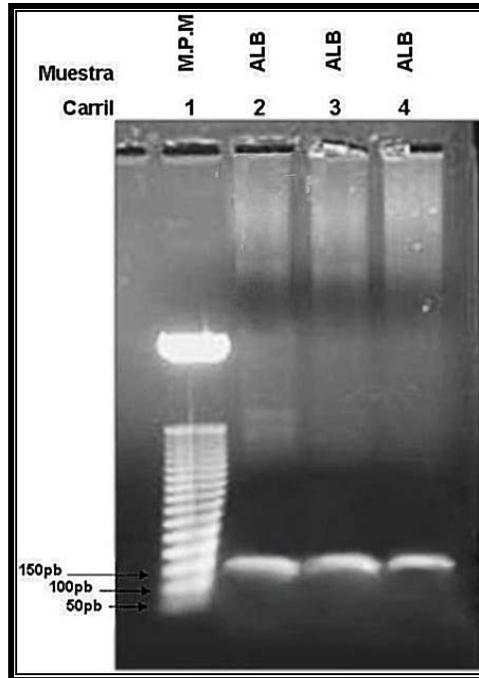


Imagen 3. Electroforesis de productos de PCR de albúmina en gel de agarosa al 1.5%, carril 1:M.P.M.; carril 2, 3 y 4: producto de PCR de muestras de ratón.

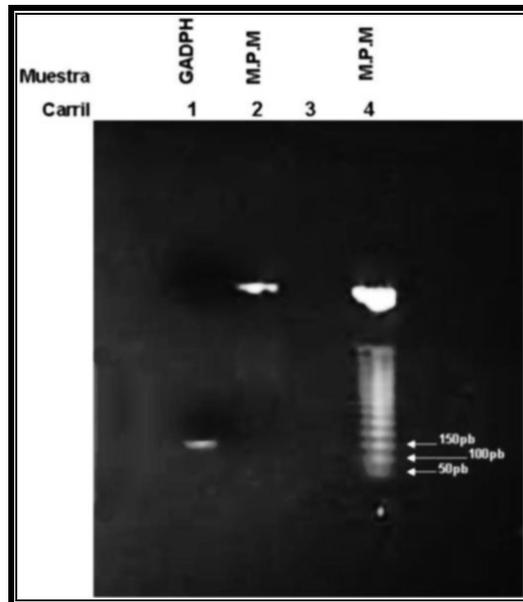


Imagen 4. Electroforesis de productos de PCR de GAPDH en gel de agarosa al 1.5%, carril 1: producto de PCR de muestras de ratón; carril 2: M.P.M., 3: vacío; carril 4:

M.P.M.

8. DISCUSIÓN

Los resultados de la concentración de las PT durante los primeros 3 días del estudio se ven significativamente aumentados en relación al grupo control, en los días siguientes las concentraciones fluctúan tanto en el grupo IRC como en el control (Fig. 2). La elevación de la concentración en los primeros 3 días posiblemente se debe a la nefrectomía de 5/6 practicada en los ratones para inducir la IRC, debido que al ser éste un tratamiento invasivo se altera la fisiología del organismo provocando el aumento de proteínas proinflamatorias; éstos resultados coinciden con los reportados por Jennings G. *et al.*, (1992), quien encontró el mismo comportamiento de las PT plasmáticas al realizar un estudio en ratas con diversas dietas proteicas e induciéndoles inflamación con turpentina. En los días siguientes al día 14, tanto las PT como la creatinina tienen un comportamiento fluctuante, hasta que a los 70 días las PT plasmáticas como se observa en la gráfica se mantienen estables y en concentración similar a la del grupo control.

Durante los 70 días de duración del experimento, la concentración de la creatinina plasmática (Fig. 3) en ratones con IRC fue significativamente mayor al grupo control, poniendo en evidencia la función renal disminuida la cuál está relacionada con la pérdida de la masa renal al llevarse a cabo la cirugía de 5/6 como lo reporta Kren S. y Hostetter T. en 1999, quienes utilizan el mismo parámetro para medir el daño renal en su estudio acerca del curso del modelo de riñón remanente en ratón.

Como se sabe la falla renal a la que se sometieron los ratones IRC tiene como consecuencia la adaptación de las nefronas remanentes para poder llevar a cabo el filtrado glomerular de las nefronas perdidas. Platt R. en 1952 demostró que la remoción del 80% de la masa renal en ratas desencadena un mecanismo adaptativo para compensar la pérdida funcional de las nefronas; lo que genera una hiperfiltración

en los glomérulos restantes al igual que Brenner y cols. en 1982. En nuestro modelo observamos que del día 14 al 70 hay una concentración de creatinina concordante con el modelo de Platt.

Con los resultados obtenidos en este experimento en relación a la concentración de la albúmina plasmática se puede observar que en el grupo IRC las concentraciones de la proteína durante los 7 días iniciales del experimento se mantienen inferiores en relación al grupo control pero sin presentar una diferencia significativa entre los grupos, el resultado de éstos primeros días no tiene un comportamiento inversamente proporcional entre la proteína de albúmina y la creatinina como el reportado por Pérez O. *et al.*, en 2009 debido a que en éstos 7 primeros días la concentración de creatinina plasmática (Figura 3) es tres veces mayor a la presentada por el grupo control, sin embargo la concentración de la albúmina no disminuye significativamente como en los días posteriores, esto podría deberse a que aún hay albúmina plasmática en el organismo de los ratones con IRC debido a que la vida media de la proteína es de alrededor de 16 y 21 días como lo reporta Pérez- Santos en el 2009 en su artículo acerca de los sustitutos plasmáticos en terapia intensiva y como también lo hace Mezzano S. y Aros C. en el 2005 en su estudio en la clasificación, mecanismos de progresión y estrategias de renoprotección en la enfermedad renal crónica, con lo anterior se explica el que el descenso en la concentración de albúmina plasmática sea significativa hasta el día 14.

Desde el día 14 hasta el día 56 comienza a haber una relación en el comportamiento de la creatinina y albúmina plasmáticas de los grupos IRC, como se puede observar en las Figuras 3 y 4; la concentración de la albúmina presente en el plasma desciende de forma constante presentándose una hipoalbuminemia estadísticamente significativa, reportada en trabajos sobre pacientes con insuficiencia renal crónica como el realizado por Kang S, y cols. en 1996, Berthil *et al.*, en 2003 y Ortega M. *et al.*,

en el 2006, donde reportan la mortalidad y morbilidad que aumenta al disminuir la concentración de albúmina en éstos pacientes. Al igual que lo encontrado por Romero T. en 2009 en su estudio con ratones con IRC y dieta alimenticia, la disminución en la concentración de la albúmina plasmática en el grupo IRC a los 56 días presentó significancia estadística con respecto a su grupo control; sin embargo en el día 70 la concentración plasmática de la albúmina del grupo IRC aumenta en relación al día 56, este resultado es posible que se deba a una ligera hemólisis detectada en los ratones IRC, ésta hemólisis propicia la interferencia de la hemoglobina en la lectura de la albúmina, pues presenta absorbancia en la misma longitud de onda (570nm) lo que resulta en una sobreestimación de la cuantificación de la albúmina plasmática.

En relación a los resultados encontrados en el nivel de expresión del mRNA del gene de albúmina durante el experimento, el grupo IRC mostró durante los 70 días de progresión una expresión menor en relación al grupo control estadísticamente significativa; a pesar de haber una relación entre la baja concentración de mRNA de albúmina y la baja concentración de la albúmina plasmática como lo observado por Moshage H. en 1987, debido a que durante el tiempo de progresión de la IRC, los niveles del transcrito y las concentraciones de la proteína plasmática no se presentan una tendencia directamente proporcional como se observa en las Figuras 4 y 5 durante la progresión de la IRC y como lo encontrado por Sakuma *et al.* en 1987 en su investigación acerca de la disminución de la transcripción del mRNA de albúmina en ratas con dieta baja en proteínas y como también lo hace Straus D. y Takemoto C en 1990 en su estudio endocrinológico en ratas donde midieron la expresión del gene de albúmina bajo condiciones de restricción alimenticia lo cuáles tampoco encuentran una relación proporcional entre la proteína plasmática y el nivel de mRNA de albúmina.

9. CONCLUSIONES

El modelo desarrollado de IRC fue reproducido en esta cepa BalbC.

La concentración de las PT plasmáticas durante la IRC se ve afectada durante la progresión de la enfermedad en este modelo.

La concentración de albúmina plasmática en el grupo IRC es inversamente proporcional al tiempo de progresión de la enfermedad.

Durante el desarrollo de la IRC en nivel de concentración del mRNA de albúmina es limitante de la síntesis de la proteína, a pesar de esto, no existe una correlación entre la concentración del mRNA y la concentración de la proteína plasmática.

10. PERSPECTIVAS

Se deben estudiar los procesos moleculares pre y post transcripcionales que pudieran tener un efecto en la regulación de la concentración de mRNA del gen de albúmina o alterar su función o estructura para poder ser traducido.

11. BIBLIOGRAFÍA

Aquiles, J., S. Mezzano. 2008. Daño vascular en la enfermedad renal crónica Vascular damage in chronic kidney disease. Revista médica de Chile. versión impresa ISSN 0034-9887. *Rev. Méd. Chile.* v.136 n.11 Santiago nov.

Ávila-Palomares, P., M. López-Cervantes, L. Durán-Arenas. 2010. Estimación del tamaño óptimo de una unidad de hemodiálisis con base en el potencial de su infraestructura. *Salud pública Méx* . 2010. [cited 2010 Sep 01] ; 52(4): 315-323. Available from: http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342010000400007&lng=en. doi: 10.1590/S0036-36342010000400007.

-
-
- Avram, M., P. Fei, L. Bonomini, N. Mittman, R. Loutoby, D. Avram, J. Chattopadhyay. 1996. Predictors of survival in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients: A five years prospective study. *Perit. Dial. Int.* 16(Suppl 1): S190-194.
- Avram, M., P. Goldwasser, M. Erroa, P. Fein. 1994. Predictors of survival in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients: The importance of prealbumin and other nutritional and metabolic markers. *Am. J. Kidney. Dis.* 23: 91-98.
- Barzaga L., A. Gladis. 2004. Reemplazo de volumen: Coloides (I). *Rev. Cubana Pediatr.* vol.76, n.2 [citado 2010-10-02], pp. 0-0 . Disponible en: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75312004000200006&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0034-7531.
- Bataille, R., B. Klein. 1992. C-reactive protein levels as a direct indicator of interleukin-6 levels in humans in vivo. *Arthritis Rheum.* 35: 982-984
- Braunwald, E., A. Fuci, D. Kasper, S. Hauser, D. Longo, J. Jameson. 2002. Harrison Principios de Medicina Interna. McGraw-Hill-Interamericana de España. México, D.F. 15ª edición. Vol. II. 3262pp.
- Brenner, B., T. Meyer, t. Hostetter. Dietary protein intake and the progressive nature of kidney disease: the role of hemodinamically mediated glomerular injury in the pathogenesis of progressive glomerular sclerosis in aging, renal ablation, and intrinsec renal disease. *N. Engl. J. Med.* 1982; 307: 652-9.
- Cases, A., José R. J. González, P. Gutiérrezc, A. Gilarranzd, C. Garrido. 2010. Prevalencia de insuficiencia renal crónica en pacientes de alto riesgo o con enfermedad cardiovascular. *Rev. Esp. Cardiol.* 63(2):225-8
- Clark G., C. Fraser. 1993. Biological variation of acute phase proteins. *Ann. Clin. Biochem.* 30:373-376.
- Clarke, R., L. Daly, K. Robinson, E. Naughten, S. Cahalane, B. Fowler, I. Graham. 1991. Hyperhomocysteinemia: An independent risk factor for vascular disease. *N. Engl. J. Med.* 24:149-155.

Coordinación de Atención Médica. Programa para la detección y tratamiento temprano del paciente con insuficiencia renal crónica. Dirección de Prestaciones Médicas.

Danielski, M., T. Tkizler, E. McMonagle, J. Kane, L. Pupim, J. Morrow. 2003. Linkage of hypoalbuminemia, inflammation, and oxidative stress in patients receiving maintenance hemodialysis therapy. *Kidn. Blood Press. Res.* 26 (3): 185-91.

DeFronzo, R. 1995. Diabetic nephropathy: Etiologic and therapeutic considerations. *Revista Diabetes.* 3: 510-564.

Dehesa, E. 2008. Enfermedad renal crónica; definición y clasificación. El residente. Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Vol. III Número 3-2008: 73-78

Gibbs, J., Cull, W., Henderson, W., Daley, J., Hur, K., Khuri, S. Preoperative serum albumin levels as a predictor of operative mortality and morbidity. *Arch. Surg.* 134: 36-42.

García-Salcedo J., J. Batarse-Bandak, L. Serrano-Gallardo, M. Rivera-Guillén. 2003. Albúmina sérica y mortalidad en ancianos hospitalizados. *Bioq.* ISSN (Versión impresa): 0185-5751

Hiroyasu, E., O. Mitsuko, S. Shigeaki, S. Takashi, N. Sumi. 1980. Absence of albumin mRNA in the liver of analbuminemic rats . Biochemistry Division, National Cancer Center Research Institute and Department of Chemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 77, No. 6, pp. 3215-3219.

Kang, S., K. Kwon, H. Noh, H. Parl, I. Lee, K. Choi, I. Lee, K. Choi, H. Lee, D. Han. 1996. Serum albumin as a predictor of morbidity and mortality in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients: Single center experiences in over 700 patients. *J. Am. Soc. Nephrol.* 7: 1450.

Kaysen, G. 1998. Biological basis of hypoalbuminemia in ESRD. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1998 Dec; 9(12): 2368-76.

Kaysen, G. 1998. Biological basis of hypoalbuminemia in ESRD. *Kidney Int.* 9: 2368–2376

-
-
- Levey, A., K. Eckardt, Y. Tsukamoto, Y. 2005. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global outcomes (KDIGO). *Kidney. Int.* 67: 2089-2100.
- López, M; M. Rojas, L. Tirado, L. Durán, R. Pacheco, A. Venado, J. Moreno, F. Franco, M. Villanueva, R. Abrantes, F. Becerra, M. Rodríguez. 2010. Estudio de insuficiencia renal crónica y atención mediante tratamiento de sustitución informe final. Secretaria de Salud Pública. Unidad de Proyectos Especiales de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible en internet: http://www.dged.salud.gob.mx/contenidos/dged/descargas/ponencias_2a_sem/5_Lopez.pdf
- Lowrie, E., N. Lew. 1990. Death risk in hemodialysis patients: The predictive value of commonly measured variables and an evaluation of death rate differences between facilities.. *Am J. Kidney. Dis* 15: 458-482.
- Lowrie, E., N. Lew, W. Huang. 1992. Race and diabetes as death risk predictors in hemodialysis patients. *Kidney Int. Suppl* 38: S22-S31.
- Mac Gregor, J. 1997. Insuficiencia renal crónica. *Med. Int. Mex.* 1997; 3: 2-22.
- Marinkovic, S., G. Jahreis, G. Wong, H. Baumann. 1989. IL-6 modulates the synthesis of a specific set of acute phase plasma proteins in vivo. *J Immunol*; 142: 808-812.
- Martín, A., D. Rodríguez-Puyol, M. Praga. 1997. Nefrología clínica. Madrid: Editorial Panamericana: 528-545.
- Mezzano, A., E. Aros, E. Claudio. 2005. Enfermedad renal crónica: clasificación, mecanismos de progresión y estrategias de renoprotección. *Rev. méd. Chile*, v. 133, n. 3. Disponible en <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872005000300011&lng=es&nrm=iso>. Accedido en 10 oct. 2010.
- Mitch, W. 2004. Treating diabetic nephropathy - Are there only economic issues? *N. Engl. J. Med.* 351: 1934-6.

-
- Moshage, H., M. Janssen, J. Franssen, M. Hafkenscheid, and H. Yap. 1987. Study of the molecular mechanism of Decreased liver Synthesis of Albumin in Inflammation. The American Society for Clinical Investigation, Inc. 79. 1635-1641.
- Nijstein, M., E. De Groot, H. Ten Duis. 1987. Serum levels of interleukin 6 and acute phase response. *Lancet*, 2: 921
- Ortega, M., J. Martínez, G. Gamarra. 2006. Mortalidad en los pacientes con falla renal crónica durante los primeros 90 días de terapia con hemodiálisis. *Act. Méd. Col.* VOL. 31 N° 1.
- Paniagua, R., A. Ramos, R. Fabian, J. Lagunas and D. Amato. 2007. *Perit. Dial. Int.* 27:405–409.
- Paniagua, R., D. Amato. 1998. Prevalencia de la insuficiencia renal crónica en la población derechohabiente del Instituto Mexicano del Seguro Social. 1:153-170.
- Paniagua, R., R. Alfonso., F. Rosaura., L. Jesús., y A. Dante. 2005. Prevalence of chronic kidney disease in an urban Mexican population. *Kidney Int. Suppl.* (97):S11-7.)
- Parfrey, P. 2001. Is renal insufficiency an atherogenic state? Reflections on prevalence, incidence and risk. *Am. J. Kidney. Dis.* 37: 154–156
- Pérez-Oliva, J., J. Martínez, F. Gutiérrez, Ma. Raola, O. Benítez. Proteína C reactiva elevada e hipoalbuminemia: síndrome complejo; malnutrición microinflamación crónica, aterosclerosis; significado pronóstico en pacientes hemodializados. *Rev. haban. cienc. méd.* Ciudad de La Habana, v. 8, n. 1. Disponible en <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2009000100023&lng=es&nrm=iso>. Accedido en 1 oct. 2010.
- Pérez-Santos F. 2009. Hematología y Hemoterapia, Cuidados Intensivos y Cuidados Críticos. Disponible en: <http://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articulos/1576/3/Articulo-de-revision.-Sustitutos-plasmaticos-en-terapia-intensiva>. Accedido en 2 de Octubre 2010.
- Perrone, R., T. Steinman, G. Beck, C. Skibinski, H. Royal, M. Lawlor, L. Hunsicker. 1990. Utility of radioisotopic filtration markers in chronic renal insufficiency: simultaneous comparison of 125I-iothalamate, 169Yb-DTPA, 99mTc-DTPA, and inulin. The

-
-
- Modification of Diet in Renal Disease Study. *Am. J. Kidney. Dis.* 1990 Sep;16(3):224-35.
- Phillip, P., S. Minghetti, D. Ruffner, S. K. Wun-Jing, D. Dennis, W. James S. Hawkins, G. Wanda, S. Beattie y D. Achilles. 1986. Molecular Structure of the Human Albumin Gene Is Revealed by Nucleotide Sequence within 911-22 of Chromosome 4". *J. Biol. Chem.* The American Society of Biological Chemistry. Printed in U.S.A..Vol. 261, No. 15.
- Plascencia-Maya R, L. García, E. Rodrigo-Jiménez. 2000. Morbilidad y mortalidad en pacientes con diálisis peritoneal. *Med. Int. Mex.* 16 (4):169-173.
- Platt, R. 1952. Structural and functional adaptation in renal failure. *Biol. Med. J.* i; 1372-7.
- Prinsen, B., T. Rabelink, J. Beutler, G. Kaysen, J. De Boer, W. Boer, E. Hagen, R. Berger, D. De Sain-Van. 2003. Increased albumin and fibrinogen synthesis rate in patients with chronic renal failure. *Kid. Int.* 64, 1495–1504.
- Robbins y Cotran. 2010. Pathologic Basis of Disease, Professional Edition, 8th ed.
- Romero, T. C. Mora, R. Paniagua, D. Arenas. 2009. Influencia de la desnutrición en los niveles de albúmina sérica y de su transcrito en hígado en un modelo de ratón urémico. Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Nefrológicas. Hospital de Especialidades. IMSS.
- Ross, R. 1999. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 340: 115–126.
- Sakuma, K., T. Ohyama, K. Sogawa, K. Fujii-Kuriyama, Y. Matsumura. 1987. Low protein-high energy diet induces repressed transcription of albumin mRNA in rat liver. *J. Nutr.* 117: 1141-1148.
- Schoots, A., F. Mikers, C. Cramers, R. De Smet, S. Ringoir. 1984. Uremic toxins and the elusive middle molecules. *Neph.* 38: 1-8.
- Soriano, S. 2004. Definición y clasificación de los estadios de la enfermedad renal crónica. Prevalencia. Claves para el diagnóstico precoz. Factores de riesgo para enfermedad renal crónica. *Nefro.* 24(Suplemento 6): 27-34.

-
-
- Stenvinkel, P., M. Ketteler, R. Johnson. 2005. Interleukin-10, IL-6 and TNF- α : important factors in the altered cytokine network of end-stage renal disease—the good, the bad and the ugly. *Kidney Int.* 67:1216-1233.
- Stenvinkel, P., O. Heimbürger, F. Paulter, U. Diczfalusy, T. Wang, L. Berglund, y T. Jøgestrand. 1999. Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure. *International Society of Nephrology.* 55. 1899-1911.
- Straus, D., C. Takemoto. 1990. Effect of dietary protein deprivation on insulin-like growth factor (IGF)-I and -II, IGF binding protein-2, and serum albumin gene expression in rat. *Endocrinology* 127: 1849-1860.
- Tresguerres, J., A. Vander, J. Sherman, D. Luciano, 1999. *Fisiología Humana.* 2° Edición. McGraw Hill Interamericana. España. pp. c286- c378- c447.
- United States Renal Data System: Incidence and prevalence of ESRD. II. United States Renal Data System. 1999 Annual Data Report. *Am J Kidney Dis* 34 (Suppl 1):S40–S50.
- United States Renal Data System: International comparisons of ESRD therapy. XII. United States Renal Data System. 1999 Annual Data Report. *Am. J. Kidney.* 34 (Suppl 1):S144–S151.
- Yee-Moon, A., J. Wang, C. Wai-Kei, W. Mei, M. Man-Mei, L. Siu-Fai, P. Kam-Tao y J. Sanderson. 2003. Is a Single Time Point C-Reactive Protein Predictive of Outcome in Peritoneal Dialysis Patients? *J. Am. Soc. Nephrol.* 14: 1871–1879.
- Zhang, Q. y D. Rothenbacher. 2008. Prevalence of chronic kidney disease in population-based studies: Systematic review. *Biol. Med. C. Public Health.* 2008 Apr 11; 8:117
- Zimmermann, J., Herrlinger, S., A. Pruy, T. Metzger, C. Wanner. 1999. Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 55:648-658.

12. ANEXO

1. Modelo de ratón IRC

a. Nefrectomía de de 5/6.

Esta técnica se realiza en dos cirugías.

- 1.1 Isquemia del riñón izquierdo. Se deben usar ratones adultos jóvenes o que tienen de 12 a 14 semanas de edad y con un peso de entre 24g a 28g para que puedan soportar de mejor forma la intervención quirúrgica. S
- 1.2 Se le inyecta xilacina como relajante muscular y ketamina para anestesiarlo completamente.
- 1.3 Se sujeta el organismo en una meza de disección y se cubre con un camp estéril.
- 1.4 Se realiza un corte ventral sin afectar ningún órgano del animal.
- 1.5 Cuidadosamente se sacan de la cavidad abdominal los intestinos para poder exponer el riñón izquierdo
- 1.6 Se procura retirar el tejido adiposo de la vena y arterias renales.
- 1.7 Se coloca una grapa en la vena renal y se cortan 2/3 partes de riñón (las 2/3 partes superiores, y se deja la parte inferior la cuál está conectada con la vena renal) haciendo un corte transversal en el riñón y dejando una forma circular para no afectar a la vena renal.
- 1.8 El riñón se cubre con epiplón para impedir el sangrado, así las plaquetas comienzan coagularse, 5min después se retira la grapa de la vena renal.
- 1.9 Se introduce de nuevo el riñón, los intestinos y se procede a cerrar el peritoneo y la piel.

- 2.1 Nefrectomía unilateral del riñón derecho. Esta segunda cirugía se le practica al ratón una vez que se le permitió estabilizarse durante una semana de la

primera cirugía. Se realizan los mismos pasos para preparar al organismo para la cirugía.

2.2 El corte para esta segunda intervención es en la misma zona de la primera cirugía.

2.3 De nuevo se sacan los intestinos (manteniéndolos húmedos con una gasa con solución salina) y se expone ahora el riñón derecho.

2.4 Se retira el tejido adiposo de la vena y arterias renales.

2.5 Se le hacen dos ligaciones separadas sobre la vena y arteria renal con sutura y también dos ligaciones separadas en el uréter, estas ligaciones tienen el propósito de impedir el flujo de sangre en el caso de las ligaciones de la vena y arteria renal y el flujo de la orina en el caso de las ligaciones del uréter.

2.6 Se corta entre las ligaciones de la vena y arteria renal entre las ligaciones del uréter para separar totalmente el riñón derecho.

2.7 Se introducen los intestinos a la cavidad abdominal y se vuelve a suturar al organismo.

2. Cuantificación de Proteínas Totales.

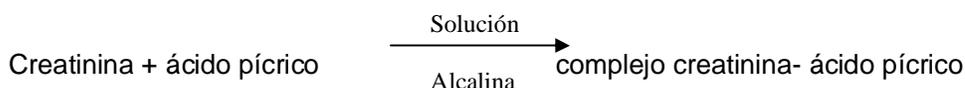
Se utilizó un equipo "NanoDrop 1000" el cual mide la concentración de sustancias químicas utilizando haciendo incidir en ellas un haz de luz, registrando la transmitancia y obteniendo la absorbancia de la muestra, ésta medición se basa en la Ley de Beer y Lambert o simplemente Ley de Beer que establece que la concentración de una sustancia es directamente proporcional a la cantidad de energía radiante absorbida por la sustancia, o inversamente proporcional al logaritmo de la energía radiante transmitida por la sustancia. El equipo utilizado para llevar a cabo la cuantificación de las PT cuenta con un sistema de retención de la muestra por medio de tensión superficial, cuya propiedad le permite hacer cuantificaciones de muestras muy concentradas (hasta 200 veces más concentradas a las utilizadas regularmente), un

cable de fibra óptica (receptor) está incrustado dentro de un pedestal y que a su vez está conectado a un espectrómetro de matriz lineal CCD. Un segundo brazo el cuál lleva fibra óptica, proyecta un haz de luz proveniente de una lámpara de xenón y utilizando un espectrómetro conectado al pedestal analiza la luz que pasa a través de la muestra. El instrumento es controlado por software desde una PC, y los datos se almacenan en archivos de texto (*. twbk).

3. Cuantificación de Creatinina por método de Jaffé

El método de cuantificación se basa en la reacción de Jaffé descrita por Popper y cols. así como por Selig y Wüst y modificada por Bartels y cols. En comparación con el método original según Jaffé, la reacción modificada es más sensible y más precisa. El principio de la reacción es un ensayo colorimétrico, en el cual la adición de hidróxido de sodio y ácido pícrico forman un complejo resultando una solución alcalina:

- Muestra y adición de R 1 (lejía de sodio)
- Adición de R 2 (ácido pícrico) e inicio de la reacción:



En solución alcalina, la creatinina forma con el picrato un complejo de color amarillo-naranja. Su intensidad cromática directamente proporcional a la concentración de creatinina se mide fotométricamente. En determinaciones empleando el rate-blanking se minimizan las interferencias por bilirrubina. Las muestras de suero o plasma contienen proteínas que reaccionan inespecíficamente en el método Jaffé. Para obtener valores correctos, los resultados para suero y plasma deben corregirse por 0,3 mg/dL ó 26 µmol/L. Ya que las muestras de orina no contienen proteínas inespecíficas, esta corrección lleva a un error de medición en el intervalo J 1%.

4. Cuantificación de Albúmina por método de BCG (Bromo Cresol Verde)

Este procedimiento está basado en las propiedades de albúmina de unirse a colorantes, en este caso con el BCG. La absorbancia de BCG a 630nm incrementa al unirse con la albúmina y es proporcional a la concentración de albúmina presente en el suero.

- Muestra y adición de R1 (95mmol/l, pH 4,1; conservante)
- Adición de R2 (95 mmol/l, pH 4,1; verde de bromocresol: 0,66 mmol/l; conservante) e inicio de la reacción:

Con un valor pH de 4,1 la albúmina tiene un carácter suficientemente catiónico para formar un compuesto con el colorante aniónico verde de bromocresol (BCG) formando un complejo azul verdoso.



La intensidad cromática del color azul verdoso es directamente proporcional a la concentración de albúmina y se mide fotométricamente.

5. Extracción de RNA total de hígado con Trizol

5.1 Homogeneización de tejidos.

Homogeneizar las muestras de tejido en un 1ml De Trizol (.2mg de tejido) y colocar las muestras en hielo. Todo se realiza bajo condicione estériles y realizar el corte del tejido con ayuda de nitrógeno líquido o hielo seco. El corte se puede realizar en un mortero estéril.

5.2 Fase de separación.

Colocar las muestras una vez homogeneizadas en tubos eppendorf (realizarlo en hielo) y dejar incubando 5min. a temperatura ambiente para que se disocien completamente los complejos nucleoproteicos. Añadir 0.2ml. de cloroformo (frío) por cada ml. De Trizol utilizado en la homogeneización. Tapar bien los tubos y agitarlos vigorosamente durante 15seg. E incubar 5min. a temperatura ambiente.

Centrifugar las muestras a 12,000 rpm 15min a 4°C. Después de la centrifugación la muestra se separa en una fase roja fenol-cloroformo, una interfase y una fase acuosa superior incolora donde se contiene el RNA.

5.3 Precipitación del RNA.

Transferir la fase acuosa a un tubo eppendorf limpio. Añadir alcohol isopropílico (frío) .5ml. por 1ml de Trizol usado. Incubar las muestras a -70°C durante 1 hora o 24h. a -20°C. Centrifugar a 12,000rpm 10min. a 4°C el RNA precipitado es generalmente invisible antes de la centrifugación, forma un gel sobre las paredes y fondo del tubo.

5.4 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, mezclar con la mano y centrifugar a 8,000rpm. 5min a 4°C. Repetir este paso.

5.5 Resuspensión 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. Finalmente disolverlo en agua inyectable (de 50 a 100microlitos) el voúmen dependerá de la cantidad de RNA observada en el tubo. Almacenar a -70°C.

6. Obtención de cDNA

En un tubo de 1.5ml se combina el primer (50 μ M de oligo (dT)₂₀), RNAsy dNTP Mix y se ajusta el volumen a 12 μ L con agua DEPC.

Componentes	Cantidad
Primer	1 μ L
RNA	X μ L
10mM dNTP Mix	2 μ L
DEPC-Agua tratada	Hasta 12 μ L

Se desnaturaliza el RNA y se hace la primera incubación a 55 ° C por 5min y después se pone en hielo (opcional)

Agitar en el vórtex el cDNA 5x Buffer Síntesis por 5seg. justo antes de usarse.

Preparar el Master Mix en hielo y agitar en un vórtex ligeramente

Componentes	1 Reacción	10 Reacciones
5x cDNA Síntesis Buffer	4 μ L	40 μ L
0.1M DTT	1 μ L	10 μ L
RNAsa OUT 40 U/1 μ L	1 μ L	10 μ L
Termo Script RT	1 μ L	10 μ L

Pipetear 8 μ L de Master Mix de reacción en cada uno de los tubos en hielo.

Transferir la muestra a un termociclador a 55°C durante 60min para la síntesis de cDNA e incubar como se señala a continuación.

Sacar la reacción del termociclador y ponerlo en hielo, finalizar la reacción incubando a 85°C por 5min.

Añadir 1 μ L de RNA H e incubar a 37°C por 20min (opcional).

El cDNA sintetizado en la reacción puede ser usado inmediatamente en una PRC.

7. Diseño de Oligonucleótidos.

Fueron diseñados los oligonucleótidos siguiendo las siguientes especificaciones para ello:

-
-
- 7.1 Ser de 16-30 nucleótidos, lo cuál confiere especificidad por una secuencia única, incluso con una plantilla de inicial tan compleja como el ADN genómico humano.
 - 7.2 Que contenga aproximadamente igual número de cada nucleótido.
 - 7.3 Evitar secuencias repetitivas o regiones que contengan tramos con la misma secuencia de nucleótidos ya que esto puede dar lugar al deslizamiento de la cartilla en la plantilla
 - 7.4 Evitar secuencias de tres o más guaninas o citosinas en el extremo 3', esto podría provocar uniones del oligonucleótido a regiones no requeridas cuando existen regiones ricas de GC.
 - 7.5 No ser capaz de formar estructuras secundarias debido a la complementariedad interna.
 - 7.6 No contener secuencias en el extremo 3' que le permita hibridarse con él mismo, o con otro oligonucleótido contenido en la PCR, esto provocaría la formación de dímeros de oligonucleótidos.

8. PCR- Punto final

La reacción en cadena de la polimerasa, cuyas iniciales en inglés son PCR ("polymerase chain reaction"), es una técnica que fue desarrollada por Kary Mullis a mediados de los años 80. Con esta metodología se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN específico, incluso en presencia de millones de otras moléculas de ADN. Como su nombre indica, se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa que es capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Sus únicos requerimientos son que existan nucleótidos en el medio que son la materia base para fabricar el ADN (los nucleótidos de adenina, timina, citosina y guanina), y una pequeña cadena de ADN que pueda unirse a la molécula que queremos copiar para que sirva como cebadora (el cebador,

en inglés "primer"). La sensibilidad de la técnica de PCR es muy alta pero presenta algunos inconvenientes, como son que no es una técnica cuantitativa y una relativamente alta probabilidad de obtener falsos positivos por contaminación. Para solventar este último problema se ha de optimizar la secuencia de los cebadores, así como la temperatura precisa para que estos se unan al ADN en la localización correcta y realizar una adecuada manipulación de los reactivos.

Los reactivos y condiciones utilizadas para realizar la reacción son las siguientes:

Reactivos para PCR		
	Albúmina	GAPDH
	1 Reacción (μ L)	1 Reacción (μ L)
Síntesis Buffer 10x	2.5	2.5
MgCl ₂	1.5	1.5
dNTP Mix 10mM	1	0.5
Oligo sentido	1	1.5
Oligo antisentido	1	1.5
DMSO 10%	1	1
Taq Polimerasa	0.25	0.25
cDNA	2	2
Agua DEPC	14.75	14.25
Total de Reacción	25	25

*Los oligonucleótidos para Albúmina fueron sentido Upalpi y antisentido Donalpi y para GAPDH fueron sentido Gasen y antisentido Ganti.

Las condiciones para llevar a cabo las reacciones fueron:

	Albúmina		GAPDH	
	Temp °C	Tiempo	Temp °C	Tiempo
Hold	95	3min	95	3min
Desnaturalización	94	15s	94	15s
Hibridación	59	30s	64	30s
Elongación	72	30s	72	30s

9. Purificación del Producto de PCR

La purificación del producto de albúmina se realizó con un estuche de purificación de producto de PCR en gel QIAGEN–QIA QUICK, después de haberse realizado la electroforesis en gel de agarosa al 1.5% fue cortada la banda con el producto amplificado y se pesó en una balanza analítica, fueron colocados 400 mg de gel en tubo eppendorff de 1.5 ml estéril. Se añadieron 30 μ l de Buffer de Solubilización de Gel (L1) por cada 10 mg de gel; posteriormente se continuó con:

9.1 Solubilización del gel: Se incubó a 50 °C por 15 minutos, cada 3 minutos se mezcló ligeramente para asegurar la dilución del gel. Una vez disuelto el gel se realizó una incubación por 5 minutos más.

9.2 Filtración 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 g durante 1min. Por último se descarto el filtrado.

9.3 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.

9.4 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.

9.5 Elución del DNA: se descarto 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.

10. PCR Tiempo Real.

PCR en tiempo real o PCR cuantitativa es una variación de la técnica de PCR estándar que se utiliza para cuantificar DNA o mRNA en una muestra. Usando oligos o primers de secuencia específica, el número relativo de copias de una determinada secuencia de DNA o RNA se puede determinar. Se utiliza el término relativo ya que esta técnica permite la comparación unidades relativos de copias entre los tejidos, organismos o genes diferentes como el gene de la Albúmina como en el caso del presente trabajo siendo normalizado con un gen constitutivo, el gen de GAPDH.

La cuantificación de la concentración de DNA o mRNA se logra mediante el uso de sondas especiales la cual lleva adherida una molécula fluorescente y otra molécula llamada "quencher" de tal forma que sólo cuando la sonda es desplazada de su sitio por acción de la ADN polimerasa la molécula fluorescente se libera de la acción del "quencher" y emite fluorescencia al ser iluminada con un láser. Otro método de detección es utilizando fluoróforos que emiten señal lumínica solo cuando logran acoplarse a secuencias de doble cadena, como en el caso del fluoróforo utilizado para este trabajo; el Sybr Green, emite fluorescencia únicamente al estar acoplado a una secuencia de doble cadena, permitiendo cuantificar la concentración de dicho DNA o mRNA teniendo en cuenta que la concentración será directamente proporcional a la emisión de señal lumínica del Sybr Green.

Un elemento clave para que la qT-PCR tenga mayor precisión es la curva estándar, curva que en este trabajo se realizó con cinco puntos. La curva se realizó de la siguiente manera:

Punto de la Curva	Una vez preparado el Master Mix se le agrega	Concentración del cDNA
1	2 μ L de cDNA directos del cDNA pool*	2 μ g/ μ L
2	2 μ L de cDNA diluido del Tubo 1	0.2 μ g/ μ L
3	2 μ L de cDNA diluido del Tubo 2	0.02 μ g/ μ L
4	2 μ L de cDNA diluido del Tubo 3	0.002 μ g/ μ L

5	2 μ L de cDNA diluido del Tubo 4	0.0002 μ g/ μ L
---	--------------------------------------	-------------------------

Tubo	Preparación
1	2 μ L de cDNA pool + 8 μ L de Agua DEPC
2	2 μ L del Tubo 1 + 8 μ L de Agua DEPC
3	2 μ L del Tubo 2 + 8 μ L de Agua DEPC
4	2 μ L del Tubo 3 + 8 μ L de Agua DEPC
5	2 μ L del Tubo 4 + 8 μ L de Agua DEPC

*El pool de RNA Total se hizo con ocho muestras de RNA Total de ratones control, este pool fue tomado como un control para llevar a cabo solamente la curva estándar en la qT-PCR.

Los reactivos y condiciones utilizadas para realizar la qT-PCR son las siguientes:

Reactivos para PCR		
	Albúmina	GAPDH
	1 Reacción (μ L)	1 Reacción (μ L)
Síntesis Buffer 10x	2.5	2.5
MgCl ₂	1.5	1.5
dNTP Mix 10mM	1	0.5
Oligo sentido	1	1.5
Oligo antisentido	1	1.5
DMSO 10%	1	1
Taq DNA Pol. 5U/ μ L	0.25	0.25
SYBR Green 25X	0.25	0.25
cDNA	2	2
Agua DEPC	14.5	14
Total de Reacción	25	25

*Los oligos para Albúmina fueron sentido Upalpi y antisentido Donalpi y para GAPDH fueron sentido Gasen y antisentido Ganti.

Las condiciones para llevar a cabo las reacciones fueron:

	Albúmina		GAPDH	
	Temp °C	Tiempo	Temp °C	Tiempo
Hold	95	3min	95	3min
Desnaturalización	94	15s	94	15s
Hibridación	59	30s	64	30s
Elongación	72	30s	72	30s

Tanto la reacción de la Albúmina con la del GAPDH fueron realizadas con 30 ciclos.

El cálculo de la expresión relativa del mRNA de albúmina se realizó con el Ct calculado por el software del Rotor Gene-3000 el cuál detecta la señal que emite el fluoróforo Sybr Green al unirse a las secuencias de doble hélice conforme se van amplificando éstas en cada uno de los ciclos de la reacción, ésta señal es directamente proporcional a la cantidad de secuencias amplificadas en la muestra, éstos datos a su vez se traspolan a una curva estándar de cinco puntos y finalmente se ajusta la eficiencia y la R de la curva por medio del Threshold. Se obtuvo también el Ct del gene constitutivo GAPDH, con el cuál se normalizó la expresión del gen de la albúmina aplicando la siguiente fórmula:

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

El nivel de expresión está dado en unidades relativas debido a que el cálculo se realiza cotejando la expresión del gen de albúmina contra la expresión del gen constitutivo GAPDH, por lo tanto no hay unidades.

Una vez realizada la reacción de PCR Tiempo Real, para verificar que hubo sólo un producto amplificado o que no se generaron productos inespecíficos se observan las curvas de disociación.

Con los resultados del cálculo de la normalización $2^{-\Delta\Delta Ct}$, se les hizo una prueba estadística de t de student para medias relacionadas con el programa SPSS 18.

a