



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS  
DE CADENA CORTA (SCFAs) SOBRE LA FUNCIÓN RENAL**

**TESIS**

Que para obtener el título de  
**Química Farmacéutica Bióloga**

**PRESENTA**

**CITLALI METZTLI ROQUE SOTO**

**ASESORA DE TESIS**

**DRA. VICTORIA RAMÍREZ GONZÁLEZ (SNI II)**



**Ciudad Universitaria, CDMX, 2024**



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.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: Plata Ramos María del Consuelo

**VOCAL:** Profesor: Bautista Carbajal Claudia Janet

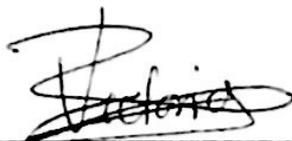
**SECRETARIO:** Profesor: Ramírez González Victoria

**1er. SUPLENTE:** Profesor: Cabrera Muñoz Edith Araceli

**2° SUPLENTE:** Profesor: Franco y Bourland Rebecca Elizabeth

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA EXPERIMENTAL, INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN", CDMX, MÉXICO.**

**ASESOR DEL TEMA:**



**DRA. VICTORIA RAMÍREZ GONZÁLEZ**

**SUSTENTANTE:**



**CITLALI METZTLI ROQUE SOTO**

## Tabla de contenido

<b>1. Resumen</b>	<b>8</b>
<b>2. Introducción</b>	<b>9</b>
<b>2.1. El riñón</b>	<b>9</b>
2.1.1 Generalidades	9
2.1.2. La nefrona	10
2.1.3. Función renal	15
<b>2.2. Lesión renal aguda (LRA)</b>	<b>17</b>
<b>2.3. Fisiopatología de la LRA</b>	<b>19</b>
2.3.1. Cambios morfológicos	19
2.3.2. Cambios en el citoesqueleto y estructurales	20
2.3.3. Disfunción mitocondrial	22
2.3.4. Inflamación	23
2.3.5. Disfunción endotelial	24
2.3.6. Apoptosis y necrosis	26
<b>2.4. Ácidos grasos: ácidos grasos de cadena corta en el tejido renal</b>	<b>29</b>
2.4.1 Ácidos grasos de cadena corta	32
<b>3. Planteamiento del problema</b>	<b>36</b>
<b>4. Hipótesis</b>	<b>37</b>
<b>5. Objetivo General</b>	<b>37</b>
<b>6. Objetivos específicos</b>	<b>37</b>
<b>7. Metodología</b>	<b>38</b>
<b>7.1. Inclusión de animales</b>	<b>38</b>
<b>7.2. Determinación de niveles de cuerpos cetónicos en plasma y orina</b>	<b>40</b>
<b>7.3. Determinación de daño renal mediante estudios bioquímicos</b>	<b>41</b>
7.3.1. Medición de creatinina en suero y depuración de creatinina	41
7.3.2. Cuantificación de nitrógeno ureico en sangre (BUN)	42
7.3.3. Cuantificación de proteínas en orina (Proteinuria)	42
<b>7.4. Determinación H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>43</b>
<b>7.5. Cuantificación de grasa total en riñón. Extracción de Folch</b>	<b>44</b>
<b>7.6. Análisis de Western Blot</b>	<b>44</b>
<b>7.7. Análisis histológico</b>	<b>48</b>
7.7.1. Tinción de Hematoxilina y Eosina (H&E)	48
7.7.2. Inmunohistoquímica	49
7.7.3. Determinación in situ de apoptosis	51

<b>8. Resultados</b>	<b>53</b>
<b>9. Discusión</b>	<b>65</b>
<b>10. Conclusiones</b>	<b>74</b>
<b>11. Referencias</b>	<b>75</b>
<b>1. ANEXO</b>	<b>83</b>

## Índice de Figuras

Figura 1. Sección sagital del riñón .....	9
Figura 2. Segmentos tubulares básicos de la nefrona .....	11
Figura 3. Patrones de expresión de moléculas del complejo de unión apical a lo largo de la nefrona. ....	20
Figura 4. Efecto de la lesión renal aguda en el citoesqueleto y en la polaridad de la membrana apical.....	21
Figura 5. Células endoteliales en el riñón. Características y función .....	25
Figura 6. Vías de la apoptosis.....	27
Figura 7. Vía de $\beta$ -oxidación .....	31
Figura 8. Estructura y fórmula química de los ácidos grasos de cadena corta .....	33
Figura 9. Metodología del proyecto.....	39
Figura 10. Concentración de tiras reactivas de uroanálisis MEDICON .....	41
Figura 11. Reacción de Jaffé .....	42
Figura 12. Ensamble de piezas preparadas y el gel formando un sándwich en el proceso de electrotransferencia .....	47
Figura 13. Determinación del peso en gramos de los animales incluidos.....	53
Figura 14. Cuantificación de cuerpos cetónicos (mmol/L) en A) plasma y B) orina .....	54
Figura 15. Determinación de la función renal. Creatinina sérica.....	55
Figura 16. Tasa de filtrado glomerular, determinado como depuración de creatinina CCr (ml/min) .....	55
Figura 17. Determinación de Nitrógeno ureico en sangre BUN (mg/dL) .....	56
Figura 18. Excreción urinaria de proteínas (mg/24h) .....	56
Figura 19. Producción de radicales libres determinado por la concentración de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en orina (nmol/24h).....	57
Figura 20. Marcador de daño tubular lipocalina 2 (NGAL) en orina. Análisis densitométrico del Western Blot de NGAL.....	58
Figura 21. Imagen representativa del Western Blot de Lipocaína asociada a la Gelatinasa de Neutrófilos (NGAL) y análisis densitométrico .....	59
Figura 22. Determinación de grasa total en el tejido renal expresado como % grasa total/g de tejido renal .....	60

Figura 23. Análisis morfométrico. A) Microfotografías representativas de la tinción de hematoxilina y eosina de todas las ratas de estudio, B) % de daño tubular, C) % de área de luz tubular.....	61
Figura 24. Inmunohistoquímica de la molécula de inflamación IL-1 $\beta$ . A) Microfotografías representativas de cada uno de los grupos de estudio, B) Cuantificación del % área teñida para IL-1 $\beta$ .....	62
Figura 25. Inmunohistoquímica de la molécula de adhesión VCAM-1. A) Microfotografías representativas de cada uno de los grupos de estudio, B) Cuantificación del % área teñida para VCAM1. ....	63
Figura 26. Índice de apoptosis. Microfotografía representativa de la tinción de TUNEL de células apoptóticas de los tejidos de cada grupo de animales de estudio.. .....	64

## Índice de Tablas

Tabla 1. Células del extremo delgado del asa de Henle .....	11
Tabla 2. Células del túbulo proximal .....	13
Tabla 3. Causas de la insuficiencia renal aguda. Clasificación.....	19
Tabla 4. Vías apoptóticas que se activan durante la LRA.....	28
Tabla 5. Soluciones para preparar geles de poliacrilamida para electroforesis .....	46
Tabla 6. Anticuerpos primarios y secundarios acoplados utilizados en el análisis de Western Blot.....	48

## Índice de siglas, abreviaturas y unidades

<b>Abs</b>	Absorbancia
<b>ADP</b>	Adenosín difosfato
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>BA</b>	Butirato alto
<b>BAIR24</b>	Butirato alto con isquemia y reperusión de 24 h
<b>BAIR72</b>	Butirato alto con isquemia y reperusión de 72 h
<b>BB</b>	Butirato bajo

<b>BBIR24</b>	Butirato bajo con isquemia y reperfusión de 24 h
<b>BBIR72</b>	Butirato bajo con isquemia y reperfusión de 72 h
<b>BSA</b>	Albúmina sérica de bovino
<b>BUN</b>	Nitrógeno ureico en sangre
<b>BuNa</b>	Butirato de sodio
<b>C</b>	Control
<b>CCr</b>	Depuración de creatinina
<b>CICUAL</b>	Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales en el Laboratorio
<b>Co-A</b>	Coenzima-A
<b>Cols</b>	Colaboradores
<b>CTE</b>	Cadena de transporte de electrones
<b>DAMPS</b>	Patrones moleculares asociados a daño
<b>dL</b>	Decilitros
<b>FAO</b>	Oxidación de ácidos grasos
<b>h</b>	Horas
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina y eosina
<b>IL-x</b>	Interleucina-x
<b>INCMNSZ</b>	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”
<b>IR</b>	Isquemia reperfusión
<b>IR24</b>	Isquemia reperfusión 24 h
<b>IR72</b>	Isquemia reperfusión 72 h
<b>Kg</b>	Kilogramo
<b>L</b>	Litro
<b>LRA</b>	Lesión renal aguda
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mmHg</b>	Milímetros de mercurio
<b>mmol</b>	Milimol
<b>mg</b>	Miligramos

<b>mtROS</b>	Especies reactivas de oxígeno mitocondriales
<b>NADH</b>	Adenina dinucleótido
<b>NGAL</b>	Lipocaína asociada a gelatinasa de neutrófilos
<b>NNP</b>	Nitrógeno no proteínico
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>nmol</b>	Nanomol
<b>OD</b>	Densidad óptica
<b>OXPPOS</b>	Fosforilación oxidativa mitocondrial
<b>PBS</b>	Buffer fosfato salino
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SCFAs</b>	Ácidos grasos de cadena corta
<b>T.A.</b>	Temperatura ambiente
<b>TCA</b>	Ácido tricarboxílico
<b>TCD</b>	Túbulo contorneado distal
<b>TFG</b>	Tasa de filtrado glomerular
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
<b>VCAM</b>	Molécula de adhesión celular vascular
<b>W. Blot</b>	Western Blot
<b><math>\mu</math>L</b>	Microlitros
<b><math>\mu</math>g</b>	Microgramos
<b><math>^{\circ}</math>C</b>	Grados Celsius

## 1. Resumen

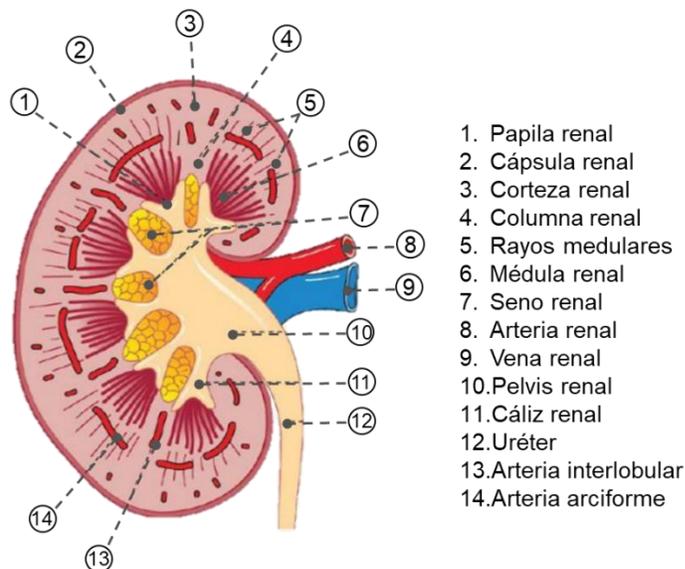
**Antecedentes:** La lesión renal aguda (LRA) es una enfermedad multifactorial que afecta a muchos pacientes hospitalizados alrededor del mundo. Actualmente, no hay cura, sin embargo; se han realizado diferentes intervenciones para reducir su incidencia y mortalidad sin éxito. Se ha descrito que los ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) poseen propiedades citoprotectoras en modelos de daño renal y debido a que la fuente de energía en el epitelio renal son los ácidos grasos, decidimos estudiar si la administración de butirato de sodio mejora el daño inducido por isquemia reperusión (IR) en la rata. **Métodos:** Se incluyeron 63 ratas Wistar macho de 280 gramos (g) de peso, divididas en los siguientes grupos, 1) Control, 2) Butirato de sodio bajo (BB 300 mg/kg), 3) Butirato de sodio alto (BA 800 mg/kg), 4) Isquemia bilateral de 30 min y reperusión de 24 horas (h), IR24, 5) IR72, 6) BBIR24, 7) BBIR72, 8) BAIR24 y 9) BAIR72. Después de 24 o 72h de reperusión los animales se colocaron en jaulas metabólicas para recolectar orina, al finalizar se obtuvo una muestra de sangre y ambos riñones fueron retirados para estudios de histología y biología molecular. **Resultados:** Los resultados mostraron que la dosis BA mejoró parcialmente la función renal a las 24hrs, determinada como creatinina sérica y redujo la cantidad de proteína NGAL en orina después del daño. Todos los tratamientos redujeron el daño estructural determinado por morfometría al disminuir el área de luz tubular, espacio intersticial y daño tubular provocado por la IR. También, se observó que los tratamientos no modifican los niveles de proteinuria, BUN y estrés oxidante. **Conclusiones:** El butirato de sodio profiláctico en un modelo de IR de 30 min en dosis de BA reduce parcialmente el daño funcional tras la LRA determinado por reducción de la CrS y el marcador de daño tubular NGAL. La administración previa de butirato a ambas dosis, disminuyó el área de daño 24 h posteriores a la lesión. Observamos que la dosis de BA favorece la reparación del epitelio tubular y reduce la expresión de VCAM-1 en las células epiteliales a las 72 h post insulto, sin ejercer cambios en la inflamación mediada por IL-1 $\beta$ , ni en la apoptosis celular del tejido.

## 2. Introducción

### 2.1. El riñón

#### 2.1.1. Generalidades

Desde un enfoque anatómico y estructural, los riñones humanos son órganos pares, retroperitoneales con forma ovalada localizados en ambos extremos de la columna vertebral, con un peso aproximado de 160 g (Restrepo C., et al., 2018; Hall J., 2011; Boron W., et al., 2017). El riñón tiene un borde convexo (externo) y cóncavo, el hilio (hacia la línea media). Se compone de dos estructuras, la corteza y la médula. La corteza, macroscópicamente, es oscura y granulosa, mientras que la médula está formada por diversos tejidos en forma de cono denominados pirámides renales cuya base se orienta hacia el borde de la corteza y su punta se designa como vértice o papila renal, la cual



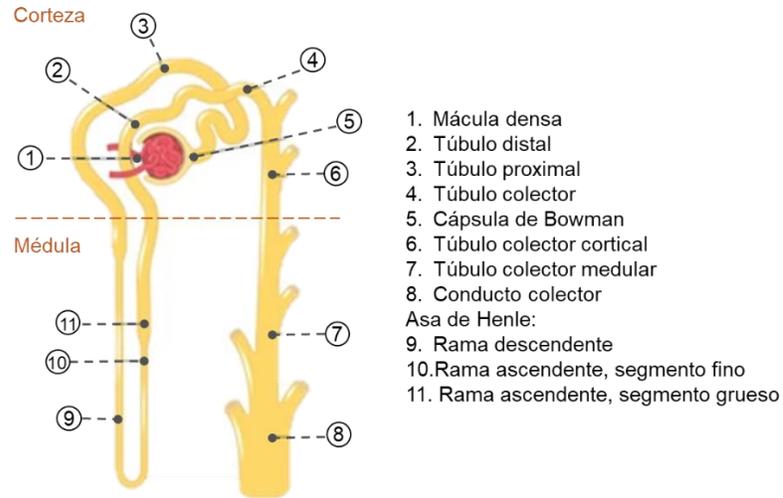
**Figura 1. Sección sagital del riñón. Se observan las estructuras internas del riñón: corteza renal, médula renal, rayos medulares, cáliz, cápsula renal, papila, arterias interlobulares, arterias aciformes. También son visibles la arteria y venal renal. Montalvo C., et al., 2011.**

señala al hilio, borde externo del riñón, mismo que se expande y forma la pelvis renal. Los vértices de cada pirámide están rodeados por cálices menores o extensiones de los cálices mayores que se encuentran en el hilio. Microscópicamente, en la corteza se observan los glomérulos (gránulos rojos), los distintos túbulos (proximal, distal y

colector), y los rayos medulares (continuaciones corticales de las pirámides renales). En la corteza y la médula fluye la sangre a través de la arteria renal, que se ramifica en arterias cada vez más pequeñas denominadas arteriolas aferentes. Cada una de ellas, termina en una unidad de filtración sanguínea que se denomina, nefrona. (Hemstreet G., 1998). El flujo sanguíneo en los riñones comienza con una única arteria renal que se divide en ramas anteriores y posteriores que dan lugar a las arterias interlobares e interlobulares seguidas de las arterias arqueadas o arciformes, éstas a su vez se ramifican en las arterias interlobulares ascendentes o corticales radiales que, de forma perpendicular a la superficie renal, asciende por la corteza, se producen las arteriolas aferentes. Las arteriolas aferentes continúan formando capilares glomerulares que convergen a las arteriolas eferentes (Boron W., et al., 2017; Carracedo J., 2020; Restrepo C., et al., 2018). La sangre entra en la nefrona a través de la arteriola aferente y luego pasa a través del glomérulo. Allí la presión hidráulica generada por el corazón junto con el tono arteriolar aferente y eferente permite la filtración de la sangre. La sangre sin filtrar remanente prosigue su camino por la arteriola eferente con una menor presión hidráulica (~80% menos) y una presión total de oxígeno de ~40-42 mmHg hasta llegar al lecho capilar peritubular, donde los túbulos proximales consumen casi la mitad de oxígeno disponible para generar la energía necesaria para la reabsorción. A partir de ahí la sangre viaja a la médula (25-30 mmHg) seguida de la médula interna (10mmHg) donde las condiciones de hipoxia son cada vez mayores (Clark A., et al., 2020).

### **2.1.2. La nefrona**

La nefrona es la unidad funcional del riñón está compuesta de conductos largos y serpenteantes, cada uno de los cuales desempeña diversas funciones relacionadas con el mantenimiento de los mecanismos homeostáticos del organismo. Cada riñón contiene aproximadamente 1,200,000.00 nefronas (Hemstreet G., et al., 1998), cantidad que se establece durante el desarrollo prenatal, cada una está formada por: 1) glomérulo, 2) túbulo proximal, 3) asa de Henle, 4) túbulo distal, y 5) túbulo colector (Figura 2) y se distribuyen en diferentes áreas a lo largo del riñón, lo que permite su clasificación en nefronas corticales o yuxtamedulares (Tabla 1).



**Figura 2. Segmentos tubulares básicos de la nefrona: glomérulo (cápsula de Bowman), túbulo proximal, asa de Henle (rama ascendente y descendente), túbulo distal, túbulo conector, túbulo colector (cortical y medular). Hall J., 2011.**

**Tabla 1. Células del extremo delgado del asa de Henle. Gartner L., et al., 2008.**

Tipo	Localización	Características
I	Nefronas corticales	Células escamosas sin prolongaciones ni interdigitaciones
II	Nefronas yuxtamedulares, extremo delgado descendente de la zona externa medular	Células escamosas con muchas prolongaciones, fascia ocluyente, plegamientos del citoplasma
III	Nefronas yuxtamedulares, extremo delgado descendente de la zona interna	Células escamosas con menos prolongaciones e interdigitaciones
IV	Nefronas yuxtamedulares, extremo delgado ascendente	Células escamosas con muchas prolongaciones e interdigitaciones, sin plegamientos en el citoplasma basal

1) **Glomérulo:** Está compuesto por un ovillo de capilares anastomosados que se invaginan en la cápsula de Bowman que contiene al espacio de Bowman que es contiguo a la luz del túbulo. En el glomérulo se realiza la filtración glomerular la cual conduce al túbulo proximal por el conducto urinario.

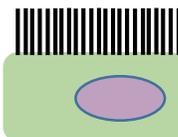
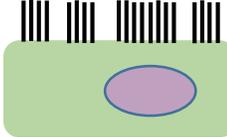
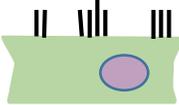
Principal función: Filtración glomerular

2) **Túbulo proximal:** Se encuentra principalmente en la corteza del riñón y consiste en partes contorneadas y rectas, ésta última ocupa su espacio en la médula (Hall A., et al., 2022). El túbulo proximal se puede dividir en tres regiones diferentes denominadas

S1, S2 y S3, que se diferencian en su ultraestructura celular visible con microscopía electrónica (Hall A., et al., 2022), asimismo su posición a lo largo del túbulo varía, teniendo a la región S1 más cerca del glomérulo, en la corteza y a la región S3 desde la corteza y extendiéndose hasta la médula externa (Boron W., et al., 2017); la posición de las regiones se vincula directamente con la cantidad de oxígeno que reciben, siendo que el flujo sanguíneo se distribuye de diferente manera a través de las arterias renales segmentarias. En las regiones S1 y S2 la sangre circula a través de una red capilar peritubular; mientras que, la región S3 se acompaña de unos capilares largos denominados vasos rectos o vasa recta (Aranalde G., et al., 2015).

Por otro lado, las paredes del túbulo proximal están formadas por una monocapa de células epiteliales polarizadas unidas por un conjunto de uniones intercelulares que forman una barrera entre el compartimiento apical o luminal y el compartimiento basal (Hoppensack A., et al., 2014). La superficie luminal de las células del túbulo proximal está constituida por múltiples microvellosidades que forman una estructura cuya morfología permite el aumento del área de superficie y favorece los procesos de reabsorción debido a la mayor superficie de contacto con la sustancia que se absorbe, denominada borde en cepillo. Las células epiteliales están unidas mediante uniones estrechas formando puntos de adhesión entre las células y regulan el movimiento paracelular de iones y moléculas del lado apical al basolateral, además de participar en la polarización de las células epiteliales impidiendo el movimiento libre de lípidos y proteínas a través de la membrana plasmática; también se compone de uniones adherentes y desmosomas (Sanz M., 2020); sin embargo, las células contenidas en cada región difieren entre sí, en la región S1 las células tienen microvellosidades largas, mientras que, en la S2, las microvellosidades son menos y más cortas. Por otro lado, en la región S3 las células tienen forma de cubo, son bajas, con pocas mitocondrias poseen borde en cepillo menos abundante (Tabla 2).

**Tabla 2. Células del túbulo proximal. Editado de Boron W., et al., 2017.**

Región	Características celulares	Imagen
<b>S1</b>	Epitelio cuboidal simple ↑↑↑ Superficie ↑↑↑ Borde en cepillo Microvellosidades largas ↑↑↑ Mitocondrias	 
<b>S2</b>	Epitelio cuboidal simple ↑↑ Superficie ↑↑ Borde en cepillo Microvellosidades medias ↑↑ Mitocondrias	
<b>S3</b>	Epitelio cuboidal simple ↑ Superficie ↑ Borde en cepillo ↑ Mitocondrias	 

Principal función: Realiza la mayor parte de reabsorción del líquido iones como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ , agua asimismo lleva a cabo el transporte y captación de solutos como sodio, glucosa, aminoácidos, lactato, fosfatos, bicarbonato que producen cambios en el metabolismo; también, regula el transporte de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , la excreción de sustancias de desecho, la producción de hormonas y vitaminas, así como la formación de fluido tubular que dará origen a la orina (Boron W., et al., 2017; Hall A., et al., 2022).

El túbulo proximal requiere altas cantidades de energía en forma de adenosín trifosfato (ATP) para sostener sus funciones ya que aproximadamente el 70% del filtrado glomerular y sus solutos se reabsorben en los túbulos proximales; para satisfacer sus necesidades de energía, el túbulo proximal depende del metabolismo oxidativo mitocondrial a partir de la oxidación de piruvato, aminoácidos y ácidos grasos (Schaub J., et al., 2021; Clark A., et al., 2020; Gao Z., et al., 2022). Por lo tanto, el túbulo proximal y en especial, la región S3, debido a sus características, se convierte en la región más sensible a sufrir daño en condiciones de hipoxia debido a sus altos requerimientos de oxígeno (Asif S., et al., 2011).

3) Asa de Henle: La parte recta del túbulo proximal continúa como el extremo delgado del asa de Henle descendente que está compuesto por células epiteliales escamosas con diferentes características dependiendo de su localización. Tras el extremo descendente se observa una curvatura en horquilla denominada asa de Henle que se une con la parte recta del túbulo distal que es el extremo delgado ascendente del asa de Henle y junto con el extremo delgado descendente forman el segmento fino del asa de Henle. Junto al segmento fino, existe el segmento grueso del asa de Henle que es la continuación de la rama ascendente con la distinción de que la pared del asa se engrosa y se sitúa en la corteza renal, en ésta se localiza una placa de células epiteliales especializadas altas (mácula densa) cuyos núcleos se encuentran muy cercanos entre sí (Carracedo J., et al., 2020; Gartner L., et al., 2008). La mácula densa contiene células con interdigitaciones pronunciadas y múltiples mitocondrias lo que estimula que el intersticio medular sea hiperosmótico (Boron W., et al., 2017).

Principal función: Facilita la formación de un gradiente osmolar en conjunto con los túbulos colectores, que permite que se concentre la orina mediante procesos de absorción de agua y electrolitos. También, en la rama ascendente gruesa, las células secretan la uromodulina o glucoproteína denominada Tamm-Horsfall (THP). La THP es la proteína más abundante en la orina y guarda relación con el aumento de la superficie efectiva de absorción del borde en cepillo de las células de los túbulos proximales (Boron W., et al., 2017; Hemstreet G., 1998; Carracedo J., et al., 2020) además, puede desempeñar cierto papel en la defensa contra bacterias patógenas en el sistema genitourinario (Boron W., et al., 2017).

4) Túbulo distal: El túbulo distal se dispone en la corteza renal y se subdivide en tres regiones empezando en la mácula densa con el túbulo contorneado distal, seguido de un segmento denominado túbulo de conexión y finalizando con el inicio del túbulo colector (Boron W., et al., 2017; Galliano S., 2024; Hall J., 2011). El túbulo contorneado distal (TCD) se localiza en el laberinto cortical y desemboca en un conducto colector de un rayo medular a través de un túbulo colector (Galliano S., 2024). Las células del TCD no presentan borde en cepillo, contienen más núcleos y menos mitocondrias en comparación a las células del túbulo proximal (Aranalde G., et al., 2015).

5) Túbulo colector: Tras el túbulo contorneado distal, a la altura del laberinto cortical empiezan los túbulos colectores (túbulo de conexión, túbulos colectores aciformes) que siguen su camino hacia la médula donde se unen con los conductos colectores. Los conductos colectores se dividen en corticales y medulares, éstos últimos continúan su trayecto hacia el vértice de la pirámide, donde confluyen en conductos colectores más grandes (Galliano S., 2024) denominados conductos papilares o de Bellini (Aranalde G., 2015).

Principal función: el túbulo distal y el sistema de conductos colectores controlan la reabsorción fina y excreción de sales y agua mediante la acción de diferentes hormonas como la angiotensina, aldosterona, arginina y vasopresina, finalmente los túbulos colectores son parte fundamental para el equilibrio ácido base (Boron W., et al., 2017). La funcionalidad de la nefrona esta principalmente enfocada a modificar la concentración del fluido tubular para formar orina como producto final. Sin embargo, la pérdida de nefronas ya sea por lesión, enfermedad o envejecimiento no es un peligro para el correcto funcionamiento renal en el corto plazo.

### **2.1.3. Función renal**

Los riñones son órganos vitales que realizan varias funciones importantes como la formación de orina, el equilibrio de líquidos y electrolitos, la regulación del equilibrio ácido- básico, excreción de productos de desecho, de fármacos y toxinas y secreción de hormonas (renina, eritropoyetina, 1-2, dihidroxi-vitamina D3, prostaglandinas) (Bishop M., 2006).

La capacidad del riñón para mantener la homeostasis es una actividad que refleja ampliamente la función renal debido a que se encuentra estrechamente ligada con la función de los riñones para regular la concentración de agua, la osmolaridad de la orina, la composición de iones inorgánicos, y mantener el equilibrio ácido-base, que en consecuencia, permite a los riñones excretar productos como la urea, ácido úrico y la creatinina. La urea es una sustancia generada de nitrógeno no proteínico (NNP) sintetizada en el hígado y producto del catabolismo de proteínas, el ácido úrico es el producto final del metabolismo de las purinas como la adenina y la guanina y de la descomposición de ácidos nucleicos, así como de la destrucción de tejido. Finalmente,

la creatinina-NNP, es un producto derivado de la creatina la cual se sintetiza en el hígado a partir de arginina, glicina y metionina, posteriormente, ésta es transportada a otro tejido como el músculo, donde se convierte en fosfocreatina, que sirve como una fuente de alta energía, la fosfocreatina pierde ácido fosfórico convirtiéndose en creatina-misma que pierde agua y forma la creatinina-, o en productos finales de la degradación de la hemoglobina (Bishop M., 2006; Carracedo J., et al., 2020). Existen tres procesos básicos renales para que se lleve a cabo su funcionalidad, entre los cuales se encuentran: filtración glomerular, reabsorción tubular y secreción tubular.

### **2.1.3.1. Filtración glomerular**

La filtración glomerular es un proceso sin gasto energético en el que la presión hidrostática de la arteria aferente introduce la sangre al glomérulo donde se encuentra la barrera de filtración compuesta por 3 secciones: 1) Endotelio capilar fenestrado, el cual evita el paso de células y de la mayoría de las proteínas plasmáticas al túbulo renal, generando un "ultrafiltrado" compuesto fundamentalmente por agua y elementos de peso molecular pequeño circulantes en la sangre; 2) la membrana basal glomerular semipermeable misma que presenta una carga eléctrica negativa debido a su composición (colágena tipo IV, V, glicoproteínas y proteoglicanos) que repele a proteínas de tamaño pequeño y otros elementos cargados negativamente que atravesaron la barrera endotelial fenestrada; 3) la membrana podocitaria o diafragma de filtración, que también es parte de la barrera de filtración que impide la salida proteínas en el ultrafiltrado (Boron W., et al., 2017; Hall J., 2011).

### **2.1.3.2. Reabsorción y secreción tubular**

Una vez que el ultrafiltrado sale de espacio de Bowman por el polo urinario, entra al túbulo contorneado proximal en donde se reabsorben diferentes sustancias. La reabsorción tubular es el proceso en que las sustancias pasan, mediante transporte activo y pasivo, del lumen tubular a los capilares peritubulares (Bishop M., 2006). Para permitir la reabsorción de más del 99% de agua filtrada, los túbulos renales establecen un gradiente electroquímico que se da debido al bombeo de sodio y potasio a través de la bomba de sodio potasio (ATPasa) localizada en la membrana basolateral creando una carga intracelular negativa neta que potencian aún más la reabsorción de cationes y

compuestos orgánicos catiónicos (Clark A., et al., 2020). El movimiento de sodio del filtrado a través de la célula tubular y de vuelta a la sangre se utiliza para acoplar el transporte de azúcares filtrados, ácidos grasos, aminoácidos y minerales de vuelta a la sangre. Mientras que, estos solutos regresan a la sangre mediante transportadores, el agua y la urea regresan pasivamente impulsados por la fuerza osmótica.

A medida que el filtrado glomerular pasa por los túbulos renales, éste fluye de forma secuencial a través de sus diferentes partes (el túbulo proximal, el asa de Henle, el túbulo distal, el túbulo colector y, finalmente, el conducto colector) para formar la orina (Hall J., 2011). A lo largo de este recorrido, las concentraciones de minerales, aminoácidos y glucosa son reabsorbidos y retornan a la circulación. En virtud, 67-80% del agua, sodio y cloro; 100% de la glucosa (hasta el umbral renal); 98 a 100% de ácido úrico, casi todos los aminoácidos, las vitaminas, las proteínas y cantidades variables de urea, ácido úrico y iones, como el magnesio, calcio, potasio y bicarbonato, son reabsorbidos por el riñón.

En algunas ocasiones, cuando la concentración de las sustancias filtradas supera la capacidad del sistema de transporte, la sustancia es entonces excretada en la orina. Asimismo, las sustancias y elementos que son innecesarios para el organismo como ion amonio, creatinina y algunos ácidos y bases orgánicos, son secretados desde el plasma capilar peritubular hacia el lumen tubular donde se excretan, además de toxinas y sustancias fisiológicamente no útiles.

Estos procesos de reabsorción y secreción son meramente adaptativos y varían en función de las necesidades fisiológicas. Por lo que, la mayoría de los nutrientes orgánicos como la glucosa y los aminoácidos se reabsorben por completo para mantener o restaurar concentraciones plasmáticas dentro de un rango fisiológico (Hall J., 2011; Bishop M., 2006; Carracedo J., et al., 2020).

## **2.2. Lesión renal aguda (LRA).**

La enfermedad renal se encuentra entre las causas más importantes de muerte e incapacidad en muchos países de todo el mundo (Hall J., 2011). Éstas se dividen en dos categorías principales: la insuficiencia renal aguda y la insuficiencia renal crónica; en donde dependiendo de las características de cada una, se pueden ver afectados diferentes componentes de la nefrona que son esenciales para la función renal, tales

como, los túbulos renales, los vasos renales, los glomérulos y el intersticio renal (Hall J., 2011).

Clínicamente la lesión renal aguda se define como la disminución rápida (horas a semanas), frecuentemente reversible, de la función renal provocando la acumulación de productos nitrogenados como la urea además de la creatinina (Hall J., 2011; Gaínza F., 2023; Miyahira A., 2003; Periz A., et al., 2003). Las principales agresiones tóxicas al riñón que son capaces de causar esta afección son deshidratación, bajo gasto cardiaco (miocarditis, valvulopatía, etc.) cirugía mayor, nefrotoxicidad por tóxicos exógenos (antibióticos, antineoplásicos, antiinflamatorios no esteroideos AINES), o endógenos (pigmentos, uratos, etc.) mordeduras de serpientes y escorpiones, edema, radiación ionizante, medios de contraste, infección por SARsCOV2, isquemia reperusión (IR), síndrome hepatorenal, reacciones de transfusión hemolítica, envenenamiento con metales pesados/solventes, sepsis, hemorragia masiva, quemaduras e insuficiencia cardiaca, entre otras (Bishop M., 2006).

Se ha estimado que la LRA tiene alta prevalencia y alta mortalidad. Por ejemplo, en 2013, se realizó una revisión para estimar la incidencia mundial de la LRA, sus etapas de severidad, la mortalidad asociada y la distribución geográfica. El panorama describe que la incidencia de LRA, en pacientes hospitalizados es de 21.6% en adultos y 33.7% en pacientes pediátricos, mientras que, la tasa de mortalidad asociada a LRA es de 23.9% en adultos y 13.8% (Susantitaphong P., et al., 2013). En 2017, se realizó una revisión para estimar la incidencia mundial de la LRA en relación con la economía de América Latina. El panorama describe que la LRA constituye el motivo de consulta más frecuente en los servicios de nefrología. La incidencia varía entre los 2,000 y los 15,000 pacientes/millón de habitantes/año generando impacto en la morbilidad, mortalidad y costos de América Latina (Lombi F., et al., 2017). Se estima que la LRA complica más del 5% de todos los pacientes hospitalizados y afecta hasta una tercera parte de los pacientes que ingresan en unidades de cuidados intensivos.

Las causas de la LRA son diversas y cada una de estas causas se encuentra clasificada de acuerdo a donde se origina el daño; se enlistan a continuación: prerrenal, por disminución significativa del flujo sanguíneo renal; intrínseca o intrarrenal, por

enfermedades que generan una lesión de las estructuras del riñón y posrenal, por la obstrucción del flujo de orina proveniente de los riñones (Porth C., et al., 2020) (Tabla 3).

**Tabla 3. Causas de la insuficiencia renal aguda. Clasificación. Porth C., et al., 2020.**

<b>Prerenal</b>	<b>Intrínseca</b>	<b>Posrenal</b>
Hipovolemia Hemorragia Deshidratación Disminución del llenado vascular Sepsis Insuficiencia cardiaca Exposición a mediadores vasoactivos, fármacos, medios de contraste.	Isquemia renal prolongada Exposición a fármacos nefrotóxicos, metales pesados y solventes orgánicos Insuficiencia renal aguda	Obstrucción ureteral bilateral Obstrucción vesical

En forma global las causas prerrenales e intrínsecas son responsables de entre el 80% y el 90% de los casos de LRA.

### **2.3. Fisiopatología de la LRA**

Durante la LRA, en el riñón pueden observarse cambios a distintos niveles que derivan en alteraciones funcionales y estructurales específicas (Asif S., et al., 2011).

Los mecanismos descritos para la LRA son varios, en la lesión renal por isquemia reperusión una de las principales vías es el agotamiento de las concentraciones de ATP intracelular en las células tubulares y vasculares que resulta en un desequilibrio en las numerosas interacciones que se mantienen entre células endoteliales y epiteliales ocasionando cambios morfológicos y estructurales, inflamación, disfunción endotelial e incluso apoptosis o necrosis (Asif S., et al., 2011; Bonventre J., et al., 2011).

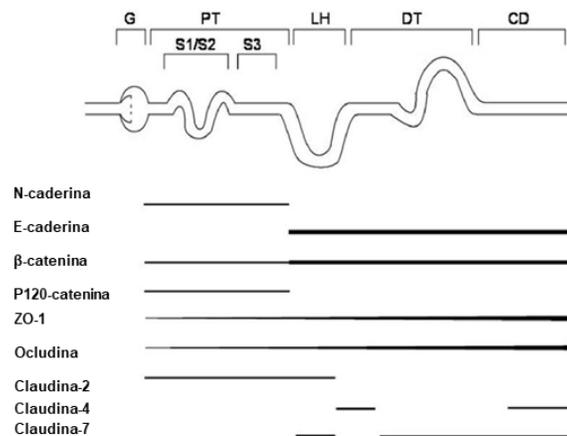
#### **2.3.1. Cambios morfológicos**

Una característica propia de la LRA se da en las células tubulares proximales las cuales, en primera instancia, pierden su borde en cepillo apical. El desprendimiento de este borde conduce a la formación de desechos o descamación unidos a la membrana que más tarde se liberan a la luz tubular. Esta pérdida de células tubulares provoca una dilatación tubular proximal debido a que se exponen áreas de la membrana basal. En conjunto a la descamación de las células tubulares con algunos restos de vesículas, residuos celulares y la uromodulina (Taam Horsfall), se forman moldes granulares que

conforme su acumulación obstruye el lumen del túbulo provocando que la filtración glomerular se detenga (Racusen L., 2001; Aranalde G, 2015).

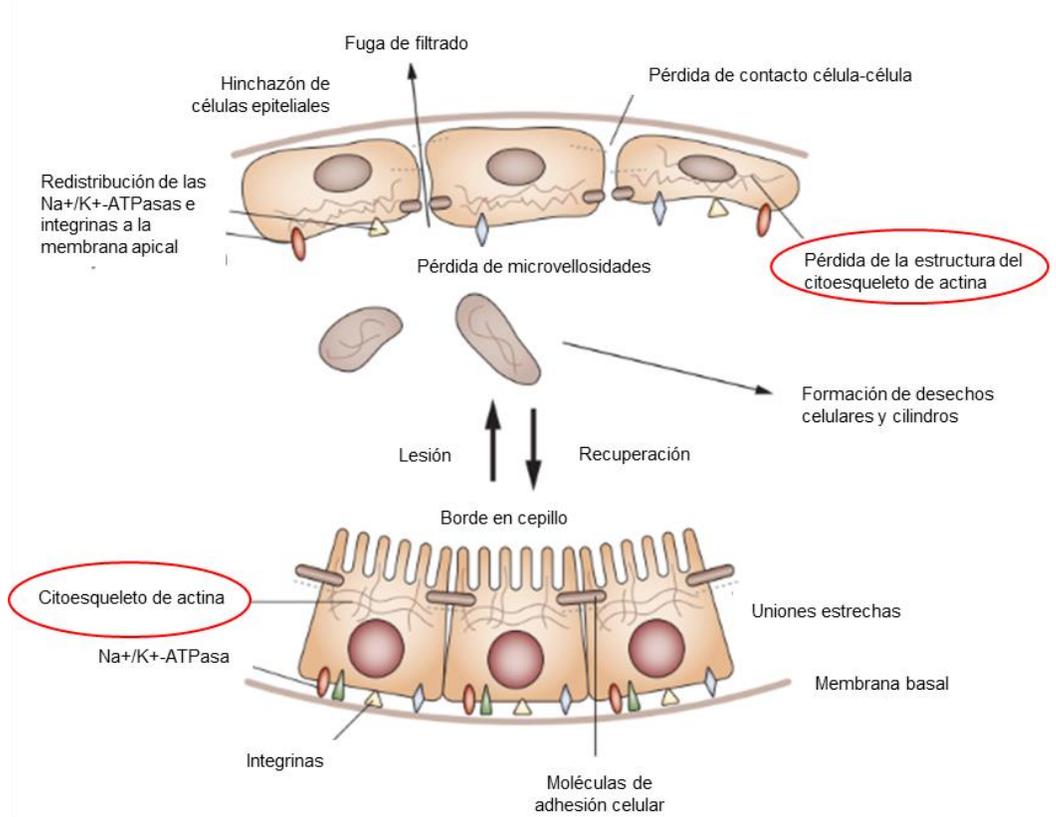
### 2.3.2. Cambios en el citoesqueleto y estructurales

El riñón posee una arquitectura única que le permite llevar a cabo sus funciones. La citoarquitectura de las células epiteliales renales y la forma en que interactúan con la matriz extracelular o con sus vecinos celulares determinan las propiedades específicas de permeabilidad y transporte que se observan en los diferentes segmentos a lo largo de la nefrona (Adler S., et al., 1999; Prozialeck W., et al., 2007). Esta estructura se establece y mantiene a través de complejos de unión que incluyen uniones adherentes, uniones estrechas u oclusivas, uniones comunicantes y desmosomas. Cada unión esta mediada por proteínas integrales de membrana denominadas moléculas de adhesión que forman los contactos físicos necesarios para mantener la estructura (Boron W., et al., 2017; Prozialeck W., et al., 2007). En el riñón, las moléculas de adhesión comúnmente encontradas en las uniones estrechas son las ocludinas, la ZO-1 (Zonula occludens-1) y claudinas. Mientras que, en las uniones adherentes se encuentran las cadherinas principalmente las E- y N-cadherina (Figura 3) (Boron W., et al., 2017; Prozialeck W., et al., 2007; Müller G., et al., 1996). La formación de las uniones adherentes inicia el ensamblaje del citoesqueleto subcortical mediante las proteínas de anclaje (vinculina, catenina  $\alpha$ -actinina) que se conectan con los dominios citosólicos de las cadherinas a una red de filamentos de actina (Boron W., et al., 2017).



**Figura 3. Patrones de expresión de las moléculas de adhesión a lo largo de la nefrona. Prozialeck W., et al., 2007. G: glomérulo; PT: túbulo proximal; LH: asa de Henle; DT: túbulo distal; CD: conducto colector.**

Durante la LRA, el agotamiento de ATP tras la lesión provoca una ruptura de la F-actina apical (Figura 4) debido a la despolimerización mediada por la filamina, la ezrina y tropomiosina, perdiendo la forma helicoidal doble de los microtúbulos y provocando la inestabilidad de la membrana superficial por lo que se pierden las uniones estrechas entre las células esto induce la desorganización de la estructura del citoesqueleto lo que conlleva a la pérdida de las uniones estrechas entre células y pérdida de la función celular (Wagner M., et al., 2008; Oriol-Audit C., 1979).



**Figura 4. Efecto de la lesión renal aguda en el citoesqueleto y en la polaridad de la membrana apical. La LRA daña las células epiteliales, perdiendo la organización de la estructura del citoesqueleto, modificando las uniones estrechas, y ocasionando una pérdida de la regulación de la permeabilidad y en el transporte celular. Ocurrido el daño, las células tubulares proximales pierden el borde en cepillo. Las células descamadas forman cilindros que obstruyen la luz tubular, se pierde el ensamblaje del citoesqueleto compuesto de actina y las bombas de sodio-potasio junto con las integrinas se re-distribuyen en la membrana apical, ocasionando una deformación de la estructura y función de la célula epitelial. Pasado el tiempo, las células pueden regenerarse. Editado de Asif S., et al., 2011.**

De igual manera, tras la disminución de las concentraciones de ATP en la célula, las  $\beta$ -integrinas (moléculas de adhesión) se relocalizan de la membrana basolateral a la membrana apical ocasionando pérdida de la unión de las células epiteliales a la matriz

extracelular subyacente y por lo tanto su desprendimiento, llevando a la formación de desechos celulares y cilindros dentro de la luz tubular. Además, también existe la reducción de la expresión y localización de la cadherina E y la ocludina ZO-1 que se encuentran en los complejos de unión mismos que participan en el transporte paracelular, y tienen funciones específicas en la morfología y polaridad celular, por lo que la pérdida de estas moléculas de adhesión conlleva a la ruptura del esqueleto y a su vez incrementa la permeabilidad paracelular. Aunado a ello, las bombas de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATP que normalmente se encuentran ancladas a la membrana basolateral, se redistribuyen a la membrana apical de la célula tubular proximal ocasionando un transporte bidireccional de  $\text{Na}^+$  y agua. En consecuencia, se aumenta la concentración de sodio en el filtrado y por lo tanto se reduce la tasa de filtrado glomerular (Asif S., et al., 2011; Ramírez V., 2022).

### **2.3.3. Disfunción mitocondrial**

Las mitocondrias son orgánulos intracelulares esenciales en la producción de ATP. También, controlan la muerte celular, la inflamación y las concentraciones de calcio  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Las mitocondrias son dinámicas y se adaptan continuamente a los requisitos celulares a través de la biogénesis, mitofagia, fusión y fisión para mantener una masa de mitocondrias que funcione de manera óptima dentro de la célula. La intermisión de estos procesos puede causar disfunción mitocondrial (Fontecha-Barriuso M., et al., 2022; Clark A., et al., 2020). La disminución del funcionamiento de las mitocondrias es un trastorno sustancial de la lesión tubular renal ya que las células tubulares proximales son las más abundantes en mitocondrias y su consumo de oxígeno es mayor debido a que reabsorben la mayor parte del ultrafiltrado glomerular (Fontecha-Barriuso M., et al., 2022; Clark A., et al., 2020). Estas células dependen del metabolismo oxidativo: oxidación de ácidos grasos  $\beta$  (FAO) y la fosforilación oxidativa mitocondrial (OXPHOS) para generar grandes cantidades de ATP, a través de la cadena de transporte de electrones (CTE) (Fontecha-Barriuso M., et al., 2022; Clark A., et al., 2020). Los electrones que son liberados a la CTE reaccionan con oxígeno y permiten la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), ésta formación comienza con el anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) que es convertido a peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) por la acción de la enzima superóxido dismutasa, a su vez, el peróxido de hidrógeno puede ser reducido a agua por la acción

de enzimas como la catalasa o bien, a ácido hipocloroso (HClO) por acción de la mieloperoxidasa (Fontecha-Barriuso M., et al., 2022; Hernández L., 2017).

Se sabe que la isquemia-reperfusión produce cambios estructurales en las mitocondrias como la reducción de su tamaño, el cambio a un perfil redondo y un citoplasma simplificado plano (Lan R., et al., 2016); también, interrumpe el flujo natural de electrones a través de la membrana mitocondrial interna mediante complejos enzimáticos en la CTE con la posterior caída del potencial de la membrana que afecta de manera negativa la permeabilidad selectiva y conlleva a la hinchazón de las mitocondrias. Posteriormente, se elimina el daño generado mediante la fisión y se suprimen de forma segura las mitocondrias lesionadas a través de la mitofagia. Dependiendo del grado de la lesión, puede ocurrir una fisión excesiva, también llamada fragmentación mitocondrial en donde se da la liberación de contenido mitocondrial que en consecuencia potencia la inflamación y la muerte celular, misma que también está asociada con la producción de especies reactivas de oxígeno mitocondriales (mtROS) que promueven la inflamación (Clark A., et al., 2020; Fontecha-Barriuso M., et al., 2022).

Luego de la LRA, las células del túbulo proximal comienzan a regenerarse, en el que a medida que se des-diferencian, algunas células logran volver a su estado normal, mientras otras adjudican una estructura simplificada con alteraciones mitocondriales que en consecuencia perturban el metabolismo energético, aumentando la glucólisis y la expresión de enzimas glucolíticas y de fosforilación inhibitoria de la piruvato deshidrogenasa (PDH) lo que conlleva a que los túbulos se vuelvan atróficos (Lan R., et al., 2016).

#### **2.3.4. Inflamación**

La inflamación es una respuesta normal del organismo frente a la infección, la lesión o el estrés de tejidos y consiste en el reclutamiento y activación de células del sistema inmunitario innato (Moreno M, 2016). Tras la lesión en el riñón por isquemia reperfusion, el epitelio tubular lesionado libera numerosas moléculas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF  $\alpha$ ), la interleucina (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, ligando de quimiocina C-C (CCL2) y CCL5, el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y la proteína activadora de neutrófilos 78 (ENA-78) (Bonventre J., et al., 2011) que ayudan a iniciar la

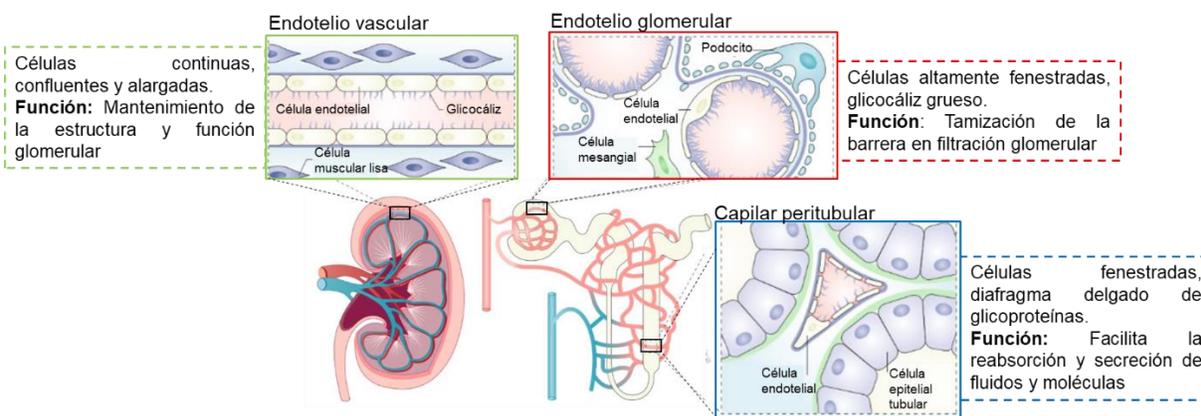
respuesta del sistema inmune, reclutando neutrófilos, monocitos/macrófagos, células dendríticas (CDs), células Natural Killer (NK) y células NKT propiciando la inflamación. Aunado a ello, las células epiteliales tubulares expresan diversas moléculas de reconocimiento como los receptores tipo Toll (TLR), tipo NOD (NLR), entre otros, que contribuyen a regular el grado de lesión (Moreno M., 2016; Bonventre J., et al., 2011). Los receptores TLR4 y TLR2 expresados en las células epiteliales tubulares renales (Asif S., et al., 2011) se activan tras reconocer los patrones asociados a daño (DAMPs) generados en la isquemia, lo que inicia una respuesta proinflamatoria liberando citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión y co-estimuladoras (Moreno M., 2016; Bonventre J., et al., 2011), lo que atrae aún más células inflamatorias. Entre esas células inflamatorias, se encuentran los neutrófilos que son los primeros en acumularse en el sitio de daño (Wu H., et al., 2007) principalmente en la red capilar peritubular de la médula externa (Bonventre J., et al., 2011) los neutrófilos juegan un papel clave en la respuesta inmune innata como células con poder fagocítico que al llevar a cabo su función, resulta en el llamado estallido respiratorio, en el cual, con la finalidad de destruir lo que el neutrófilo ha fagocitado, produce ROS, especies reactivas de nitrógeno, proteasas, mieloperoxidasa (MPO) y citocinas, lo que posteriormente conduce a la reducción en la integridad epitelial tubular y de las células epiteliales, la citotoxicidad, la degranulación y al aumento de permeabilidad vascular, exacerbando el daño (Bonventre J., et al., 2011; Moreno M., 2016; Ryoun H., et al., 2009). Otra célula inflamatoria que juega un papel importante tanto en la inmunidad innata como en la inmunidad adaptativa, son los macrófagos, que al igual que los neutrófilos poseen poder fagocítico y al activarse generan citocinas como IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL8, IL-12, TNF- $\alpha$  que pueden estimular la actividad de otros leucocitos (Asif S., et al., 2011; Ryoun H., et al., 2009); sin embargo, hay varios estudios recientes que implican a los macrófagos en la fase de recuperación de la LRA inducida por isquemia reperusión (Bonventre J., et al., 2011; Ryoun H., et al., 2009; Vinuesa E., et al., 2007).

### **2.3.5. Disfunción endotelial**

El endotelio es un órgano dinámico que constituye la monocapa interna de las células que recubren los vasos. Las células endoteliales tienen diversas funciones, entre ellas, conservar el tono y permeabilidad vascular a través de la síntesis de vasodilatadores

óxido nítrico (NO), sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S), prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), vasoconstrictores (endotelina, prostaglandina A<sub>2</sub>) y mediante el control de la proliferación de células lisas vasculares (VSMC) y la angiogénesis a través del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), la angiopoyetina (Ang) y el factor inducible por hipoxia (HIF); mantienen el balance de la inflamación a través de la síntesis de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM1), proteína de adhesión celular vascular 1 (VCAM1), entre otros; la regulación del flujo sanguíneo, hemostasia y coagulación a través de la síntesis de factores procoagulantes (tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), factor tisular) y anticoagulantes para promover un ambiente antitrombótico; también juegan un papel clave en la regulación de la activación del complemento y el estrés oxidativo y el reclutamiento y tráfico de leucocitos (Asif S., et al., 2011; Jourde-Chiche N., et al., 2019).

En el riñón, las células endoteliales difieren en su estructura, función y transporte dependiendo del entorno en el que se encuentren (Figura 5). Por ejemplo, las células endoteliales peritubulares son células fenestradas, cubiertas por un diafragma delgado de glicoproteínas; estas células facilitan la reabsorción y secreción de fluidos y moléculas de las células tubulares adyacentes (Jourde-Chiche N., et al., 2019).



**Figura 5. Células endoteliales en el riñón. Características y función. Editado de Jourde-Chiche N., et al., 2019.**

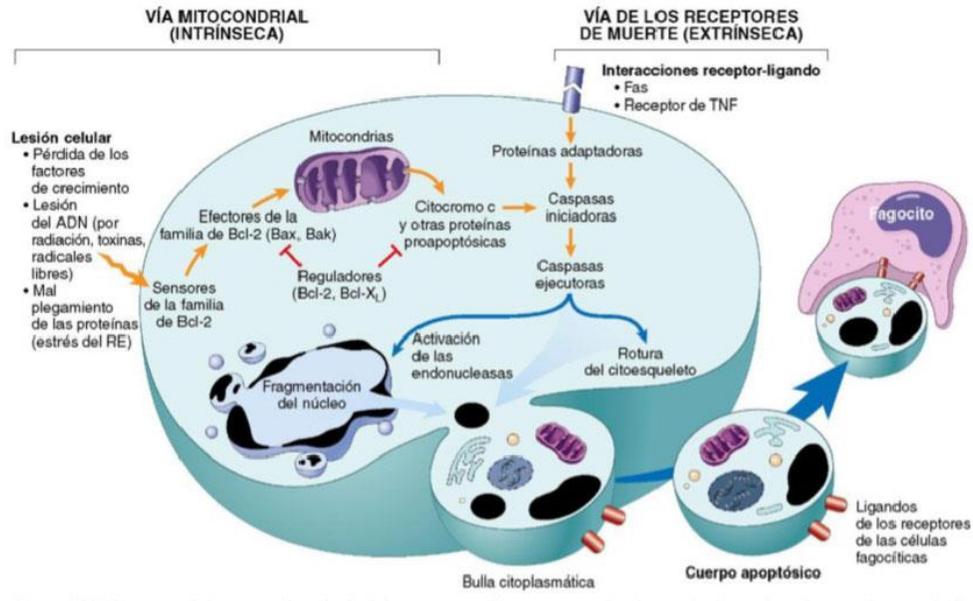
Tras la lesión isquémica, las células endoteliales sufren cambios fenotípicos que disminuyen la regulación de las moléculas protectoras como la trombomodulina, la proteína C reactiva y los niveles de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) que induce la vasoconstricción y la agregación plaquetaria, como resultado se crea un ambiente hipercoagulante que daña a las células endoteliales, las células dañadas sufren

apoptosis lo que conlleva a la amplificación de la cascada de coagulación. Simultáneamente, la lesión aumenta la expresión de genes que codifican proteínas de superficie celular (E-selectina) y la expresión de moléculas de adhesión (VCAM1, ICAM1) que permiten la unión de leucocitos activados tras la activación de los receptores inflamatorios (Gupta A., et al., 2009; Jourde-Chiche N., et al., 2019); éstas uniones adherentes junto con la alteración de las uniones estrechas intercelulares, la pérdida de la monocapa endotelial y el citoesqueleto de actina, la descomposición de la matriz perivascular, las alteraciones en la integridad de las uniones adherentes de la microvasculatura renal y la pérdida de ciertas células endoteliales, modifican la regulación endotelial incrementando la permeabilidad microvascular (Sutton T., et al., 2003).

La combinación de la adhesión leucocitaria, la activación continua de la inflamación, la coagulación, y el cambio en la permeabilidad conduce a una extrema disfunción de las células endoteliales en donde la función microvascular se ve comprometida llevando a la disfunción del epitelio tubular y finalmente la del órgano (Asif S., et al., 2011).

#### **2.3.6. Apoptosis y necrosis**

Después de la isquemia, las células epiteliales sufren lesiones que, dependiendo de la gravedad de las mismas, las células tendrán la capacidad de recuperar su estructura y función o si la lesión es muy grave, sufrirán apoptosis o necrosis.



**Figura 6. Vías de la apoptosis. Muerte celular programada, es inducida por dos vías de señalización: vía intrínseca (activada por la liberación de factores pro-apoptóticos mitocondriales) y vía extrínseca (activada por receptores de membrana asociados a muerte). Mitchel R., et al., 2017.**

La apoptosis es la muerte celular programada dependiente de energía, en donde las células se destruyen condensando el material nuclear y citoplasmático para formar cuerpos apoptóticos que son rápidamente fagocitados sin desencadenar reacciones de inflamación (Jordan J., 2003; Lieberthal W., et al., 1998). Las vías apoptóticas pueden ser intrínsecas (mitocondriales) o extrínsecas (receptor de muerte) (Figura 6) y se llevan a cabo mediante la activación de diversas moléculas efectoras o iniciadoras (Tabla 4). La vía intrínseca o mitocondrial se activa principalmente por estrés promoviendo la salida desde el espacio intermembrana de la mitocondria del citocromo C al citosol, en donde se une a la proteína Apoptosis protease-activating factor-1 (Apaf-1) y ocasiona la activación de la enzima caspasa-9. Este mecanismo es controlado por la familia de proteínas Proto-oncogen del linfoma de los linfocitos B (Bcl-2) como Bax o Bak ya que regulan la permeabilidad mitocondrial y la liberación del citocromo C (García M., et al., 2003). Con respecto a la vía extrínseca, ésta se activa mediante la unión de algunos polipéptidos pertenecientes a la familia del factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ), tales como FAS y FADD, que al unirse a sus receptores señalizan la muerte celular lo que provoca la pérdida del potencial de membrana y su desestabilización (García M., et al., 2003; Abbas A., et al., 2021). Durante la isquemia reperfusión, las dos vías apoptóticas se

activan, siendo reguladas por las concentraciones de las proteínas pro-apoptóticas como son la proteína asociada a BCL-2(BAX), el agonista de la proteína de muerte asociada a BCL-2 (BAD), y agonista de muerte BH3(BID) y las anti-apoptóticos como la proteína de Bcl2 (Tabla 4) (Edelstein L., et al., 2003; Rodriguez I., et al., 1997). De igual manera, el factor de transcripción NFκB y la proteína p53, tienen un rol importante en la activación de inflamación y la apoptosis durante la isquemia, ya que el factor de transcripción pro-apoptótico central p53 se puede activar por hipoxia (Kelly K., et al., 2003).

**Tabla 4. Vías apoptóticas que se activan durante la LRA. Receptores, moléculas efectoras y factores/genes reguladores. Editado de Rodriguez I., et al., 1997.**

<b>Vías apoptóticas</b>	
<b>Intrínseca</b>	<b>Extrínseca</b>
Familia Bcl2 Citocromo C Caspasa-9	FAS, FADD TNFα Caspasa-8
<b>Factores moduladores de la apoptosis</b>	
<b>Factores externos</b>	<b>Factores genéticos</b>
A) Estimulantes de la apoptosis Citocinas (TNFα, TGF-β, IL-1β) Receptores transmembrana (receptor FAS, rTNF) B) Supresores de la apoptosis Factores tróficos de crecimiento (IL3, IL-4, IL-6, CSF, EGF)	A) Genes estimulantes de la apoptosis p53, lpr, Bax, Bcl-x <sub>s</sub>  B) Genes supresores de la apoptosis Bcl-2, Bcl-x <sub>L</sub>

Bcl2: proteína de célula B de linfoma; FAS: proteína dependiente de citotoxicidad, CD95 o proteína apoptótica-1; FADD: proteína con dominio de muerte asociado a Fas; TNFα: Factor de Necrosis Tumoral α; p53: gen de supresión tumoral p53; NFκB: factor de transcripción kappa B; TGF-β: factor de crecimiento transformante beta; IL-1β: interleucina 1 beta; rTNF: receptor de TNF; IL3: interleucina 3; IL-4: interleucina 4; IL-6: interleucina 6; CSF: Factor estimulante de colonias e granulocitos; EGF: factor de crecimiento epidérmico; lpr: receptores de inositol 1,4,5-trifosfato; Bax: proteína asociada a Bcl-2; Bcl-x<sub>s</sub>: linfoma de células B extra chico; Bcl-x<sub>L</sub>: linfoma de células B extra grande.

Finalmente, la necrosis es un mecanismo controlado de muerte celular que se caracteriza por la liberación rápida del material citoplasmático y nuclear de la célula en el lumen o el intersticio tras la pérdida de la integridad de la membrana por la anterior hinchazón celular (Lieberthal W., et al., 1998; Rodríguez I., et al., 1997). El mecanismo de las células necrosadas durante la isquemia comienza con la depleción de ATP llevando a una lesión mitocondrial y detiene la fosforilación oxidativa reduciendo el ATP e incrementando la cantidad de ROS desestabilizando las proteínas del citoesqueleto son necesarias para mantener la adhesión intercelular y las interacciones intracelulares (Galli F., et al., 2005).

En resumen, durante la isquemia, se presenta una disminución de flujo sanguíneo renal provocando una depleción de ATP; que conlleva a la generación una lesión estructural en las células epiteliales tubulares renales (Díaz de León M., et al., 2017). Sin embargo, se sabe que el principal segmento afectado durante la lesión renal aguda es el túbulo proximal, principalmente la región S3. En donde, se produce una pérdida del borde en cepillo, induciendo un cambio en la polaridad de las células lo que resulta en la disfunción de los mecanismos de transporte de moléculas energéticas, solutos y nutrientes; aunado a ello, el desacople de la cadena respiratoria induce la formación de radicales libres (ROS), incrementando el estrés oxidante y la liberación del citocromo c, esto conducirá a la apoptosis. Otra de las consecuencias de esta alteración, es la descamación de células y cilindros tubulares causando obstrucción tubular y el incremento de la presión intraluminal; también, inducen la activación de la cadena inflamatoria, hay aumento de moléculas quimio atrayentes e infiltración de macrófagos y neutrófilos, dando paso a la dediferenciación celular, lo que a su vez activará procesos de diferenciación y reparación para las células parcialmente dañadas de 24 hasta 72 h posteriores al daño (Yu S., et al., 2020; Pickkers P, et.al, 2021; Kwiatkowska E., et al., 2021; Li Y., et al., 2020; Lupusoru M., et.al, 2021; Vaidya V., et al., 2008).

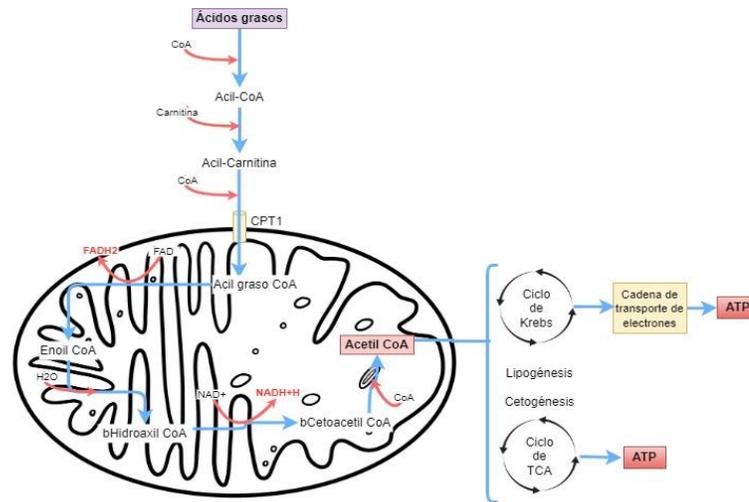
#### **2.4. Ácidos grasos: ácidos grasos de cadena corta en el tejido renal**

Los ácidos grasos son compuestos anfipáticos que poseen una cadena hidrocarbonada (extremo no polar) con un grupo carboxilo terminal (extremo polar). Los ácidos grasos difieren entre sí, por la longitud de su cadena y por el número y la posición de sus dobles enlaces. (Campbell M., et al., 2004; Nelson D., et al., 2009).

Los ácidos grasos ejecutan un papel de suma importancia en los tejidos de los mamíferos, ya que son combustibles ricos en energía, con un aproximado de 9 kcal/g como contenido energético, que se almacenan en grandes cantidades en las células en forma de triacilglicéridos (Nelson D., et al., 2009). Los ácidos grasos cubren hasta el 40% de las necesidades totales de energía en el hombre (Nelson D., et al., 2009) siendo el combustible preferido en el metabolismo del tejido adiposo, músculo cardiaco, músculo esquelético en reposo e hígado (Brandan N., et al., 2014). También, bajo condiciones normales, el riñón es el segundo órgano después del hígado en metabolizar el lactato,

ácido carboxílico (Bellomo R., 2002), esto debido a que el riñón es un órgano altamente metabólico que contiene más mitocondrias por peso que cualquier otro órgano (Clark A., et al., 2020) y requiere una gran cantidad de ATP para mantener su función de filtración-reabsorción (Gao Z., et al., 2022). El mayor consumo de ATP se da en el túbulo proximal de la nefrona, que se encuentran en la corteza renal en la que hay un alto suministro de oxígeno y densa concentración de mitocondrias, por lo que las células tubulares a pesar de utilizar varias vías y diferentes fuentes de combustible para producir ATP, la energía se crea a través del metabolismo aeróbico sin la participación esencial de la glucólisis (Clark A., et al., 2020); siendo la  $\beta$ -oxidación la que produce los sustratos para el ciclo de Krebs la vía preferida para la generación de ATP (Gao Z., et al., 2022; Clark A., et al., 2020). La oxidación de los ácidos grasos se realiza en la matriz mitocondrial y procede por eliminación sucesiva de unidades de dos carbonos en forma de acil-coenzima A (CoA). Cada escisión de dos carbonos requiere de una secuencia de reacción de cuatro pasos llamada  $\beta$ -oxidación (Campbell M., et al., 2004). La  $\beta$ -oxidación es el proceso central de catabolismo de los ácidos grasos y dependen de la acción tanto de los peroxisomas como de las mitocondrias (Fransen M., et al., 2017; Gao Z., et al., 2022). Los ácidos grasos se transforman a acil-CoA, gracias a la activación de acil-coenzima A sintetasa, de ahí el acil-CoA es transportado por la carnitina palmitoil transferasa 1 (CPT1) que se encuentra en la membrana externa de las mitocondrias, catalizando la síntesis de acil-carnitina a partir de acil-CoA graso y carnitina. Posteriormente, la acil-carnitina entra a la matriz mitocondrial con la ayuda de la translocasa carnitina-acilcarnitina y acil-carnitina y se transforma nuevamente en acil-CoA bajo la acción de carnitina acil-transferasa II. Ya en la membrana interna mitocondrial la acil-CoA sufre una oxidación por flavina adenina dinucleótido (FAD) mediada por la acil-CoA deshidrogenasa, seguida de una hidratación mediada por enoil-CoA hidratasa que da como resultado  $\beta$ -hidroxiacil-CoA. Por último, esta molécula sufre una oxidación por la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido en su forma oxidada ( $\text{NAD}^+$ ) con una tiolisis por CoA subsecuente. Como resultado se obtiene acetil-CoA, nicotinamida adenina dinucleótido reducida (NADH) y dinucleótido de flavina-adenina reducido ( $\text{FADH}_2$ ) (Figura 7) (Gao Z., et al., 2022). El acetil-CoA entra al ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) para someterse a la oxidación mitocondrial (Schaub J., et al., 2021). De igual manera el

acetil-CoA sirve como sustrato en el ciclo de Krebs, lipogénesis y cetogénesis. Mientras que el NADH y FADH<sub>2</sub> generado tanto en la β-oxidación como en el ciclo de Krebs y el ciclo del ácido tricarboxílico, son esenciales en la cadena de transporte de electrones que genera un potencial electroquímico que se utiliza para impulsar la fosforilación de ADP a ATP (Schaub J., et al., 2021).



**Figura 7. Vía de β-oxidación. Representación del metabolismo de ácidos grasos a través de la β-oxidación.**

Cada ciclo de β-oxidación produce una molécula de acetil-CoA, una de NADH y una FADH<sub>2</sub>. El metabolismo adicional del ciclo del TCA de 1 acetil-CoA produce 10 moléculas de ATP, que junto con la oxidación de NADH y FADH<sub>2</sub>, produce un total de 14 moléculas de ATP (Schaub J., et al., 2021). El número de moléculas de acetil Co-A que se produce es igual a la mitad del número de átomos de carbono en el ácido graso original (Campbell M., et al., 2004).

A pesar de que cualquier tipo de ácido graso puede utilizarse como precursor de la β-oxidación, durante la isquemia, se acumulan productos de hidrólisis como lactato, β hidroxibutirato y citrato (Jouret F., et al., 2016). Siendo que, a falta de oxígeno, los ácidos grasos de cadena corta (SCFAs), y otros productos de desecho como los cuerpos cetónicos son empleados como fuente de energía de las células tubulares (Denoon T., et al., 2020).

### 2.4.1 Ácidos grasos de cadena corta

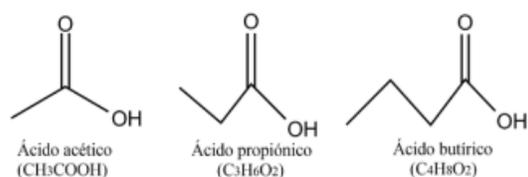
Los ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) son ácidos monocarboxílicos con una cadena que consta de uno a seis átomos de carbono saturados. Entre los principales SCFAs se encuentran: lactato, piruvato, propionato, acetato, el ácido isobutírico, butírico, isovalérico, valérico y caproico. Siendo los más estudiados, el ácido propiónico, ácido acético y ácido butírico (Figura 8) (Mateos M., et al., 2021).

Los SCFAs se pueden encontrar como ácidos grasos libres en el tracto gastrointestinal, principalmente en el colón, pero también se encuentran en el intestino, en el hígado y en el riñón (Manrique D., et al., 2017) y son producidos mediante vías metabólicas a partir de la fermentación de polisacáridos por bacterias anaerobias. La fibra insoluble es el carbohidrato que genera en mayor cantidad SCFAs debido a su alta capacidad de fermentación. Sin embargo, los almidones resistentes son el mayor sustrato de producción de ácido butírico (Patindol J., et al., 2010). Por otro lado, los oligosacáridos también se consideran, aunque en menor proporción, sustratos de SCFAs (Macfarlane S., et al., 2003). La producción de SCFAs es un proceso dinámico y complejo que incluye varias vías enzimáticas, y varía de acuerdo al consumo de alimentos en la dieta, la composición de la microbiota y el tiempo del tránsito intestinal. En general, se produce un aproximado de 600 mmol/L/día de SCFAs en el intestino y una pequeña cantidad de ellos se encuentra en forma no ionizada, lo que permite que atraviesen la barrera epitelial; el resto, y la mayoría, se encuentran en forma ionizada y precisan de transportadores especializados para su absorción como lo son el transportador de monocarboxilatos 1 (MCT-1), de monocarboxilatos 2 (MCT-2), el transportador de monocarboxilatos acoplado a sodio 1 (SMCT-1), el transportador de monocarboxilatos acoplado a sodio 2 (SMCT-2) (Agudelo O., et al., 2016; Dave R., et al. 2015; Iwanaga T., et al., 2006; Mateos M., et al., 2021). Estos transportadores se expresan a lo largo del tracto gastrointestinal, incluyendo el intestino delgado y el ciego, en el riñón, el cerebro y la retina (Agudelo O., et al., 2016; Ganapathy V., et al., 2008).

SMCT1 y SMCT2 pertenecen a la familia de proteínas SLC5A llamados SLCA5A8 y SLCA5A12, respectivamente. SMCT1/SLCA5A8 está localizado en la membrana apical de las células epiteliales del tracto intestinal y del túbulo proximal en la región más distal S3

(Ganapathy V., et al., 2008; Frank H., et al., 2008). Sus principales funciones son la absorción de SCFAs en el colón, la reabsorción de lactato y piruvato en el riñón, y la captación celular de lactato y cuerpos cetónicos en las neuronas. Mientras que, SMCT2/SLC5A12 se encuentra en el túbulo proximal principalmente en la zona S1 y S2 (Ganapathy V., et al., 2008).

Por otro lado, los MCT1 y MCT2 pertenecientes a la familia SLC16A se localizan en la membrana basolateral de las células epiteliales y promueven la salida de monocarboxilatos para ser incorporados al torrente sanguíneo. MCT1 se expresa en el segmento S1 del túbulo proximal mientras que MCT2, se localiza en el asa de Henle y túbulo distal (Ganapathy V., et al., 2008).



**Figura 8. Estructura y fórmula química de los ácidos grasos de cadena corta**

A los SCFAs se les relaciona con diversas funciones, además del aporte de energía a células a nivel gastrointestinal, muestran la capacidad de influir en la producción de células T helper, anticuerpos, citocinas y contribuyen al mantenimiento de la homeostasis de la mucosa intestinal y de la glucosa (Agudelo O., et al., 2016; Cigarran G., et al., 2017). También, muestran efectos de protección sobre la metabolización de la energía lo que se considera factor importante para el tratamiento o prevención de enfermedades metabólicas. En cuanto a efectos antiinflamatorios, los SCFAs también muestran efectividad al inhibir a las células inmunes proinflamatorias (macrófagos M1 y los neutrófilos), reduciendo así la producción de citocinas proinflamatorias, al activar a las células anti-inflamatorias (macrófagos T reguladores y M2) (Mateos M., et al., 2021).

Recientemente, se ha demostrado que los SCFAs poseen propiedades antiinflamatorias en diferentes modelos metabólicos, lo que sugiere que podrían participar en la regeneración del riñón en condiciones de daño. Khan S y Jena G en un estudio en 2014 encontraron que al administrar dosis altas de butirato de sodio (BuNa) (500 mg/kg/día)

en roedores con nefropatía diabética, los marcadores de daño renal (BUN y creatinina) disminuían, así como el daño estructural y la fibrosis (Khan S., et al., 2014). En 2019, se realizó un estudio con un modelo de nefropatía por adriamicina en donde se observó que disminuyó la proteinuria preservando la función del podocito tras la alimentación de los animales con un compuesto de almidón de maíz con alto contenido de amilosa que contenía 15% de butirato unido a la fibra durante 8 semanas (Felizardo R., et al., 2019).

En el modelo de daño renal agudo la administración de  $\beta$ -hidroxibutirato o butirato de sodio se han asociado con reducción parcial de daño funcional y estructural, además con reducción de la inflamación y el índice de apoptosis y piroptosis 24 h después de ocurrido el daño (Wei T., et al., 2014; Zheng Y., et al., 2019). Resultados similares han sido observados con la administración de acetato en durante LRA inducida por sepsis (Al-Harbi N., et al., 2018). Adicionalmente hay evidencia que la administración de cuerpos cetónicos o sus análogos mejoran el daño estructural en modelos de fibrosis renal, como lo es la administración de ácido aristolóquico (Novitskaya T., et al., 2014)

Estudios anteriores en nuestro laboratorio muestran que posterior a la LRA se activan mecanismos de reparación y de progresión del ciclo celular desde las 6 hasta transcurridas 24 h de la lesión, de igual forma observamos que la LRA indujo reducción de la expresión de proteínas transportadoras (iones y moléculas energéticas) (Kim TM., et al., 2011). Estos resultados muestran que la administración de SCFAs podrían ser una herramienta terapéutica útil en el manejo de LRA u otras patologías renales.

Debido a que la LRA no tiene cura o un tratamiento estándar, durante un par de décadas se han empleado diferentes estrategias para su prevención y tratamiento, que van desde métodos conservadores como el hidratar a los pacientes y verificar el mínimo incremento de la creatinina sérica o marcadores de daño tubular como son Kim-1 y lipocaína asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL), hasta la administración de fármacos que eviten o reduzcan la falla como antioxidantes, antagonistas del sistema renina angiotensina aldosterona, antiinflamatorios, control de electrolitos séricos, e incluso compuestos bioactivos derivados de plantas como polifenoles, fitoestrógenos entre otros, sin embargo, estos trabajos sólo muestran resultados en donde se reestablece o previene parcialmente la LRA (Díaz de León M., et al., 2017; Ramírez V. et al., 2022) por

lo que es necesaria la búsqueda de nuevos tratamientos. Es probable que los SCFAs, que son la fuente de energía de las células renales, puedan prevenir o reducir la LRA; aún no se conoce si una única dosis de ácidos grasos (butirato de sodio) podría tener efectos sobre la función renal después de un evento de LRA, y aún no se sabe si podrían participar en el restablecimiento de la función y arquitectura del tejido renal después de 24 y hasta 72 h posteriores al daño cuando se activan los procesos de reparación (White K., et al., 2023; Güler M., et al., 2023; Amarasiri S., et al., 2023; Paes A., et al., 2023).

### **3. Planteamiento del problema**

Las causas de la LRA son diversas y su incidencia muy alta en el mundo, ésta incluso, puede incrementarse en aquellos pacientes en unidades de cuidados intensivos, las causas varían desde: ingerir fármacos nefrotóxicos como antibióticos o medios de contraste, por la depleción de volumen, la presencia de enfermedades metabólicas y cardiovasculares, deshidratación, presencia de sepsis, someterse a una cirugía mayor e incluso a un trasplante de órganos. Bajo condiciones de daño las células epiteliales activan mecanismos de reparación y proliferación celular, priorizando la reparación, postergando los mecanismos que permitan mantener el balance energético. Debido a que las células del epitelio del tubular son capaces de producir, transportar y emplear a los SCFAs como fuente energética en condiciones normales y de estrés, estamos interesados en comparar los efectos de la administración de una dosis única alta o baja de butirato de sodio 24 h previo a la lesión renal aguda, respecto al daño y a la expresión de las proteínas involucradas en su transporte y señalización, así como en su capacidad de regeneración del epitelio tubular.

#### **4. Hipótesis**

La administración de una única dosis de butirato de sodio en concentración alta o baja modificará el daño funcional y estructural inducido por un proceso de LRA (isquemia reperfusión bilateral de 30 min) en la rata, así como favorecerán cambios en las vías de regeneración celular como, diferenciación, inflamación, estrés oxidante y proliferación después de 72 h de ocurrido el insulto.

#### **5. Objetivo General**

Conocer el efecto dosis dependiente de butirato de sodio sobre la lesión renal aguda en un modelo de isquemia reperfusión de 30 minutos (min) en la rata (IR de 30 min) 24 h posteriores al daño y determinar si participa en la activación de la reparación de la función y estructura renal después de 72 h de ocurrido el daño.

#### **6. Objetivos específicos**

1. Determinar si dosis baja 300mg/Kg/día o alta 800mg/Kg/día de butirato de sodio modifica el daño renal inducido por isquemia reperfusión bilateral.
2. Cuantificar parámetros bioquímicos y fisiológicos renales, así como marcadores de daño renal en plasma y orina (Creatinina sérica, depuración de creatinina, proteinuria, BUN y marcador de daño renal NGAL).
3. Determinar el estado de óxido/reducción por medición de peróxido de hidrógeno en orina.
4. Determinación del daño estructural por análisis morfométrico tras la tinción de H&E.
5. Determinar los marcadores de inflamación y reparación celular como son IL1 $\beta$  y VCAM a través del análisis de inmunohistoquímica.
6. Determinar el índice de apoptosis con la ayuda del ensayo de TUNEL.

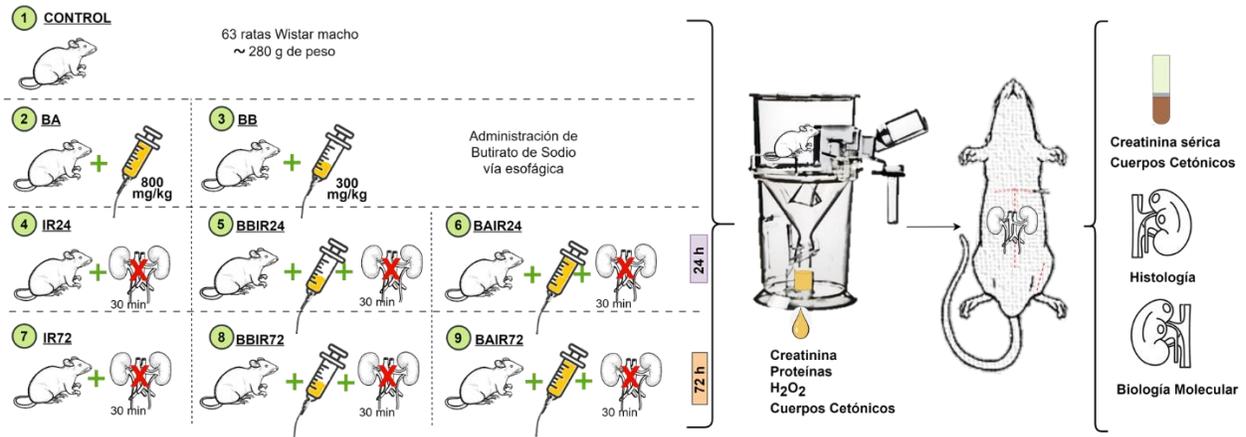
## **7. Metodología**

### **7.1. Inclusión de animales.**

Este proyecto fue aprobado por el comité de bioética institucional del INCMNSZ con el número CICUAL-CEX-2054-22-25-1.

Se incluyeron 63 ratas Wistar macho de 250 g-280 g de peso se dividieron en 9 grupos aleatoriamente (Figura 9).

- 1) Control o falsamente operado (sham).
- 2) Grupo que recibió butirato a una dosis baja de 300 mg/kg (BB) y evaluado 24 h después.
- 3) Grupo que recibió una dosis alta de 800 mg/Kg de butirato (BA) y evaluado 24 h después.
- 4) Isquemia Reperusión (IR) bilateral 30 min por colocación de un clip de aneurisma en ambos pedículos renales con 24 h de reperusión (IR24).
- 5) IR bilateral 30 min por colocación de un clip de aneurisma en ambos pedículos renales con 72 h de reperusión (IR72).
- 6) Grupo administrado con una dosis única baja de butirato de sodio (300 mg/Kg/día) 24 h previas a la IR30 con 24 h de reperusión (BBIR24).
- 7) Grupo administrado con una dosis única baja de butirato de sodio (300 mg/Kg/día) 24 h previas a la IR30 con 72 h de reperusión (BBIR72).
- 8) Grupo administrado con una dosis única alta de butirato de sodio (800 mg/Kg/día) 24 h previas a la IR30 min con 24 h de reperusión (BAIR24).
- 9) Grupo administrado con una dosis única alta de butirato de sodio (800 mg/Kg/día) 24 h previas a la IR30 min con 72 h de reperusión (BAIR72).



**Figura 9. Metodología del proyecto.**

Administración de butirato de sodio vía oral: Se utilizó una solución stock de butirato de sodio (250 mg/ml). Los animales recibieron la dosis de butirato vía oral 24 h previas al procedimiento quirúrgico (336  $\mu$ L y 900  $\mu$ L a los animales que recibieron la dosis baja o alta, respectivamente) mediante una cánula rígida cuidando que ésta entrara con facilidad en la boca del animal, sin presencia de resistencia, jadeos o ahogamiento (Kim TM., et al., 2011).

Procedimiento de isquemia reperforación bilateral:

En condiciones de asepsia, los animales fueron colocados en una máquina de anestesia para roedores (Kent Scientific Somno Suite) empleando una dosis de isoflurano al 5% para inducción. Una vez bajo anestesia los animales fueron rasurados del área abdominal y se colocaron en una cama homotérmica, monitoreando su temperatura mediante una sonda rectal. Con una dosis de mantenimiento del 1.5-2% de anestesia durante el procedimiento, se realizó una incisión media abdominal, exponiendo ambos riñones, induciendo la isquemia por la colocación de un clip no traumático de micro aneurisma en ambos pedículos renales durante 30 min. Transcurrido el tiempo los clips fueron removidos, verificando la reperforación visualmente por cambios en la coloración del tejido renal. Posteriormente los animales se suturaron con seda USP 3-0, se les administró analgesia vía subcutánea (Meloxicam 2 mg/Kg/día) para evitar dolor y se dejaron evolucionar 24 o 72 h. A las ratas falsamente operadas solo se les realizó laparotomía y sutura con seguimiento por 24 h.

Después de su recuperación los animales fueron colocados en jaulas metabólicas de manera individual para la recolección de orina por aproximadamente 18 h, donde tuvieron libre acceso a agua.

Procedimiento de eutanasia.:

Previo a la eutanasia los animales se anestesiaron con una dosis de pentobarbital. Se colocaron en una mesa termo regulada y se procedió a realizar una incisión no invasiva en la pata del animal de modo que la arteria femoral estuviera expuesta para la toma de muestra de sangre, posteriormente, uno de los riñones fue extraído y separado macroscópicamente en corteza y médula renal y congelado inmediatamente a  $-80^{\circ}\text{C}$  para estudios de biología molecular, mientras que el otro fue perfundido con solución amortiguadora de fosfatos tibia y posteriormente retirado para ser fijado en una solución de formaldehído al 10% para estudios histológicos y moleculares (Kim TM., et al., 2011). La orina recolectada de cada animal individual se dividió en alícuotas de aproximadamente 2 mL, una de las muestras de cada rata fue utilizada inmediatamente para la medición de cetonas, mientras que las demás se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posteriores análisis bioquímicos y moleculares.

El volumen de sangre se extrajo de la arteria femoral del animal bajo anestesia y se recolectó en tubos que contenían heparina para evitar su coagulación. Enseguida, las muestras se centrifugaron a 15000 rpm durante 8 min para aislar el plasma, se separó por pipeteo y las muestras aisladas de plasma se dividieron en alícuotas de 2 mL, una de las muestras de cada rata fue utilizada inmediatamente para la medición de cetonas y el resto se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso posterior.

## **7.2. Determinación de niveles de cuerpos cetónicos en plasma y orina**

Teniendo las muestras de orina y plasma, se procedió a realizar la cuantificación de cetonas en ambos mediante tiras reactivas de uroanálisis (MEDICON) exponiendo la tira aproximadamente 40 segundos a la orina o al plasma y tras un corto tiempo de espera, se forma un complejo colorido que es capaz de compararse con una escala de lectura predeterminada (Figura 10).



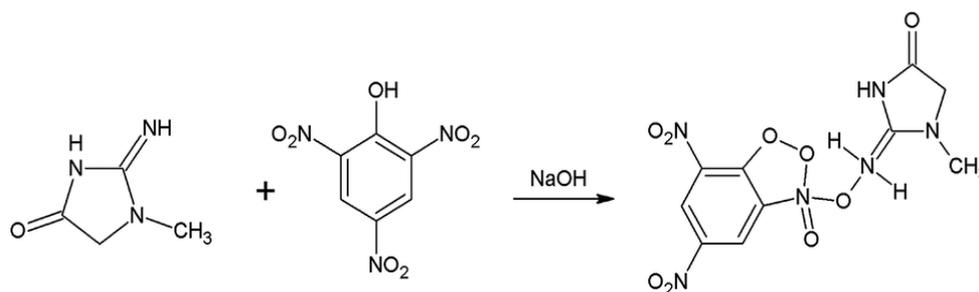
**Figura 10. Escala de lectura de concentración de cetonas (0, 0.5, 1.5, 4, 8 y 16 mmol/L) de tiras reactivas de uroanálisis MEDICON. La intensidad de color de la tira tras ser sumergida en orina se compara con el cuadro para determinar la concentración de cetonas.**

La prueba se basa en la reacción específica del nitroprusiato sódico y glicina con el ácido acetoacético y la acetona en un medio alcalino para formar el complejo de color violeta (Campuzano M., et al., 2007).

### **7.3. Determinación de daño renal mediante estudios bioquímicos**

#### **7.3.1. Medición de creatinina en suero y depuración de creatinina**

Una vez recolectada la orina y el suero, para determinar los valores de creatinina, se realizó una determinación colorimétrica empleando un estuche comercial Bio Assays que se rige mediante el método Jaffé (Figura 11) mismo que utiliza el ácido pícrico como sustrato en medio alcalino para formar un complejo con la creatinina que presenta un color amarillo-rojo. Para medir su concentración se utilizó una curva estándar de creatinina con concentraciones de 0.2, 0.4, 0.6, 1, 2, 3, 4, 6, 8 y 10 mg/dL partiendo de un stock de 50 mg/dL. Se realizaron diluciones 1:20 de cada muestra de orina y se procedió a colocar en el plato de microensayo de ELISA 30  $\mu$ L de la dilución de orina o de muestra de plasma de cada una de las ratas por duplicado, enseguida se agregaron 200  $\mu$ L de la mezcla de reacción, misma que se preparó 1:1 de reactivo A (hidróxido de sodio 1.69%, EDTA 0.05%) y reactivo B (ácido pícrico 0.50%, dimetil sulfoxido 20%, polisorbato 20 0.20%). Se incubaron a temperatura ambiente y se realizó la medición de su absorbancia al minuto y a los 5 min a 510 nm.



**Figura 11. Reacción de Jaffé. La creatinina reacciona con el ácido pícrico en medio alcalino produciendo el cromóforo.**

La concentración de creatinina se determinó utilizando la curva estándar, considerando la solución empleada mediante la siguiente ecuación:

$$[Creatinina] = OD(510nm)_{5\ min} - OD(510nm)_{1\ min}$$

Donde:

- $OD(510\ nm)_{5\ min}$  es el valor de la densidad óptica de la muestra de orina o plasma leída a los 5 min,

- $OD(510\ nm)_{1\ min}$  es el valor de la densidad óptica leída al minuto.

La función renal o depuración de creatinina (CCr) se calculó con la siguiente fórmula:

$$CCr = \frac{[Creatinina\ urinaria][Flujo\ urinario]}{[Creatinina\ sérica]} = CCr \frac{mL}{min}$$

Por último, se calculó el flujo urinario mediante la siguiente ecuación:

$$Flujo\ urinario = Volumen\ de\ orina\ (mL) / Tiempo\ de\ recolección\ (min)$$

### 7.3.2. Cuantificación de nitrógeno ureico en sangre (BUN)

El BUN se midió espectrofotométricamente a 340 nm mediante la implementación de un kit comercial (Thermo Scientific, Rockford, IL) y la lectura en un dispositivo automatizado Advia 1650 (Ramírez-Rodríguez Y., et al., 2022).

### 7.3.3. Cuantificación de proteínas en orina (Proteinuria)

El ensayo de proteinuria se realizó mediante un método turbidimétrico con ácido tricloroacético (TCA) al 10% que permite que las proteínas precipiten y formen un sedimento blanco (Ramírez V., et al., 2008). Se empleó una curva estándar de albumina sérica de bovino fracción V (BSA) con concentraciones desde 50 hasta 1000  $\mu$ g/ml (50,

100, 200, 400, 600, 800, 1000 µg/ml). Se realizó una dilución 1:5 de las muestras de orina de cada rata. Enseguida, se incubaron 500 µL de los estándares y de las muestras con su blanco correspondiente. En este ensayo, se utilizó un blanco de ensayo y un blanco para cada muestra analizada. A las muestras, a los estándares y al blanco del ensayo se les adicionaron 125 µL de TCA, mientras que a los blancos de cada muestra de orina se les agregó 125 µL de agua destilada. Tras 30 min de incubación, se leyó la absorbancia a 420 nm, con los datos obtenidos se procedió a calcular la cantidad de proteínas en la orina mediante la siguiente diferencia utilizando la curva patrón:

$$[proteínas] \frac{\mu g}{\mu L} = Abs(muestra + TCA) - Abs(muestra + agua)$$

Finalmente se calculó la proteinuria a las 24 h:

$$[proteínas] \frac{mg}{24 h} = \frac{[proteínas \frac{\mu g}{\mu L}] [dilución]}{1000} \quad (24)$$

#### **7.4. Determinación H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Medición de peróxido de hidrógeno urinario (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>): Se determinó la presencia de estrés oxidante por la medición de peróxido de hidrógeno en orina mediante un método colorimétrico con el kit comercial Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit (Invitrogen). El ensayo se realizó empleando una curva estándar de peróxido de hidrógeno con concentraciones de 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 y 10 µM. Se prepararon las diluciones de las muestras de orina y se colocaron 50 µL de la muestra o del estándar en una placa ELISA seguido de 50 µL de la mezcla de reacción que involucra al Amplex Red Reagent (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine) 10mM para detectar el peróxido, en combinación con la horseradish peroxidase (HP) a una concentración de 10U/ml y buffer de reacción 1X (fosfato de sodio). Ésta mezcla una vez agregada a las muestras y con una incubación de 30 min a temperatura ambiente y protegidas de la luz, reaccionó con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> contenido en la orina produciendo un producto de oxidación denominado resurfina que emitió un color rojo fluorescente y se leyó a una absorbancia de 570 nm. Los resultados fueron determinados por la interpolación de la curva patrón y se expresaron en nmol/ mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### **7.5. Cuantificación de grasa total en riñón. Extracción de Folch**

La cuantificación del porcentaje de grasa total por peso de tejido se realizó mediante gravimetría. De inicio se pesaron alrededor de 100 mg de cada tejido en tubos de 16x100 mm previamente resueltos en peso constante (FEUM 11 ed) por medio de lavados con EtOH y calentamiento a 60°C en horno de hibridación (Hybaid, modelo Micro-4), el registro de los pesos de dichos tubos se realizó en una balanza analítica (Sartorius®, modelo ED623SCW). A la cantidad de tejido se le adicionó 3 mL de solución Cloroformo:Metanol (2:1) y 2 mL de solución de cloruro de sodio (NaCl) al 9%. Enseguida se procedió a la homogeneización del tejido con ayuda de un Polytron, se centrifugó durante 20 min a 2800 rpm (18 cm de radio del rotor) y con una temperatura de 4°C. Consecutivamente se descartó la fase acuosa de la fase orgánica que posteriormente se transfirió a tubos nuevos a peso constante. Finalmente, los tubos con grasa se pesaron tras haber sido colocados en una campana de extracción durante 24 h para la evaporación del disolvente orgánico.

El cálculo del porcentaje de grasa se realizó mediante la siguiente ecuación:

$$\%grasa = \frac{100(B - A)}{C}$$

Donde,

*A* es el peso del tubo limpio y seco (g)

*B* es el peso del tubo con grasa (g)

*C* es el peso de la muestra de tejido (g)

### **7.6. Análisis de Western Blot**

Para determinar los niveles urinarios de NGAL (marcador de daño renal). se utilizó el análisis de W. Blot.

-Extracción de proteínas de tejido renal: Para realizar la extracción de proteínas totales de la corteza renal, se homogeneizaron aproximadamente 100 mg de tejido con ayuda del homogeneizador (OMNI International Tissue Master 125), en 500 µL de buffer de extracción (50 mM HEPES pH 7.4, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA pH 8.0, 0.1% Nonidet p40), una vez obtenido el homogenado, se agregaron 20 µL de inhibidor de proteasas

Complete<sup>(R)</sup> (ROCHE) y 500 µL más de buffer de extracción; se procedió a centrifugar (Power Spin VX Centrifuge UNICO) las muestras 8 min/ 6000 rpm, se separó el sobrenadante obtenido y se determinó la concentración de proteínas mediante el método de Lowry, en el cual se utilizó una curva estándar de albúmina con concentraciones de 0.25, 0.5, 0.75 ,1 y 1.5 mg/ml. Para la cuantificación, se prepararon diluciones 1:20 de las muestras, se mezclaron 100 µL de la dilución con 500 µL de solución C y 100 µL de folin ciocalteu 1:2. La solución C se preparó a partir de 50 ml de solución A (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2%, NaOH 0.4%, Tartrato de sodio 0.02%) y 1 ml de solución B (CuSO<sub>4</sub> 0.5%). Se incubaron durante 30 min y se midió la absorbancia a 660 nm. Los resultados fueron determinados por la interpolación de la curva patrón.

-Desnaturalización de proteínas. Preparación de proteínas para W.Blot: A partir de los resultados de la concentración de proteínas en las muestras homogeneizadas, se agregaron los volúmenes correspondientes a 100 µg de proteínas del homogenado, en presencia de solución salina y de buffer de carga (Laemmli buffer 3% azul de bromofenol, 150mM tris base, 15% glicerol, 2% β-mercaptoetanol, 6% SDS, pH 7.6) y fueron calentadas a 95°C durante 5 min.

-Preparación de orinas para W.Blot: Se tomaron 40 µL de cada muestra de orina, volumen y se les agregó 60 µL de solución salina (0.9%) y 100 µL de buffer de carga. Se calentaron a 95°C durante 5 min. Se cargaron 2 µL de orina en cada pozo.

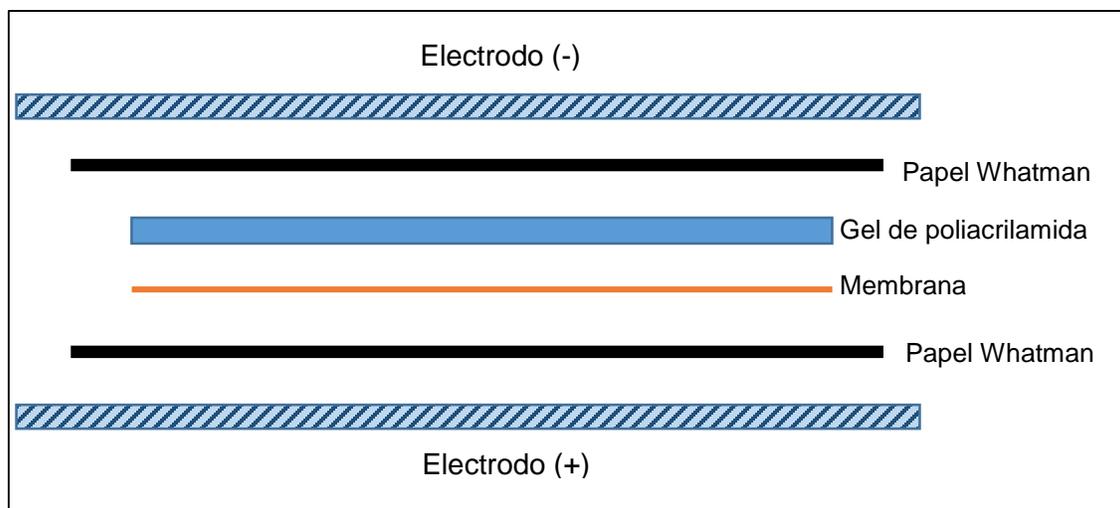
-Geles de poliacrilamida: Los geles de poliacrilamida son la matriz porosa que las proteínas recorren para su separación de acuerdo a su masa molecular. Su preparación consta de una mezcla de concentración y una de separación, que contienen agua destilada, Acrilamida 30%, Tris al 1.0 y al 1.5 M, Sodium Dodecyl Sulfate 10% (SDS), Ammonium Persulfate 10% (APS) y TEMED (Tabla 5).

**Tabla 5. Soluciones para preparar geles de poliacrilamida para electroforesis.**

Soluciones	Volumen (mL) para 20 mL de gel			Volumen (mL) para 10 ml de gel
	Separación 8% (ml)	Separación 10% (ml)	Separación 12% (ml)	Concentración 5% (ml)
H <sub>2</sub> O	9.3	7.9	6.5	6.8
Acrilamida 30%	5.3	6.7	8.0	1.7
Tris 1.5 M (pH 8.8)	5.0	5.0	5.0	-
Tris 1.0 M (pH 6.8)	-	-	-	1.25
SDS 10%	0.2	0.2	0.2	0.1
APS 10%	0.2	0.2	0.2	0.1
TEMED	0.012	0.008	0.008	0.01

-Separación de proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE: se utilizó la técnica de electroforesis en gel que se basa en el movimiento de las proteínas en respuesta a un campo eléctrico a través de una matriz porosa. Las condiciones de la electroforesis fueron las siguientes: 70V/50 min para apilarlas en el gel de concentración y 110/60 min para resolverlas en el gel de separación, los geles se colocaron en buffer de corrida 1X (190 mmol de glicina, 25 mmol Tris Base, 0.1% SDS pH 8-8.5) a T.A. Se agregó un marcador de peso molecular preteñido para determinar el peso de las proteínas de nuestro interés.

-Electro-transferencia semihúmeda: Con la finalidad de que las proteínas contenidas en el gel sean accesibles para hibridarlas con los anticuerpos se realizó una electrotransferencia en la cual el gel de poliacrilamida se puso en contacto con una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Immobilon-P Transfer Membranes con tamaño de poro de 0.45 µm) y papel Whatman previamente equilibrados en buffer de transferencia 1X (buffer de corrida 10X, Metanol al 20%) colocados como se observa en la (Figura 12). Las proteínas del gel se transfieren del gel a la membrana por la aplicación de un campo eléctrico (9V/54 min).



**Figura 12. Ensamble de piezas preparadas y el gel formando un sándwich en el proceso de electrotransferencia.**

-Bloqueo: Una vez finalizada la transferencia de proteínas, los sitios de adsorción de la membrana PVDF no ocupados por las proteínas se bloquearon con una solución de caseína (proteína no específica BIO-RAD) al 1% en TBS-t (TBS 10X, 136 mM NaCl, 2 M Trisbase-, Tween 20, pH 7.6) durante 2 h a 40 rpm en agitación (Orbital Shaker), para prevenir la unión inespecífica de los anticuerpos.

-Inmunodetección de los anticuerpos: Tras el bloqueo, la membrana fue sumergida en una solución de buffer de anticuerpo 0.1% (caseína, TBS-t) que contenía el anticuerpo específico primario de interés (Tabla 6). La incubación se realizó durante toda la noche con agitación suave. Al día siguiente las membranas fueron lavadas con TBS-t para eliminar el exceso del anticuerpo primario, posteriormente la membrana se incubó durante 2 h a T.A. con el anticuerpo secundario el cual está acoplado a la HP mismo que se preparó con buffer de anticuerpo 0.1%. Una vez pasado el tiempo se eliminó el exceso de anticuerpo secundario con 6 lavados con TBS-t y se procedió al revelado.

**Tabla 6. Anticuerpos primarios acoplados utilizados en el análisis de W.Blot de orina y en el análisis por Inmunohistoquímica.**

Proteína	Nombre	Peso molecular (kDa)	Dilución Anticuerpo primario
$\beta$ -Actina	Actina de músculo liso $\beta$ acoplado a HRP	42	1:10,000
NGAL (H-7) *	Lipocaína asociada a la Gelatinasa de neutrófilos	23	1:500
IL-1 $\beta$ (11E5)*	Interleucina 1 beta	17	1: 500
VCAM *	Vascular Cell Adhesion Molecule-1	110	1:2000

\*: Santa Cruz Biotechnology, Inc.

-Revelado: La membrana se expuso a sustrato químico luminiscente (Luminata forte Merck Millipore) y se expuso a una placa radiográfica para observar la presencia de las proteínas. Finalmente, las placas se escanearon para realizar un análisis densitométrico y determinar la concentración de proteínas equivalentes a pixeles de la imagen tomando una relación con el gen control  $\beta$  actina.

## **7.7. Análisis histológico**

### **7.7.1. Tinción de hematoxilina y eosina (H&E)**

Los tejidos renales previamente fijados con formaldehído 10%, se sometieron a proceso de deshidratación en soluciones graduadas de etanol, utilizando un Histokinette (Thermo Microm, modelo STP 120). Tras la deshidratación se procedió a embeber los tejidos en parafina líquida para formar bloques usando un centro de inclusión (Leica, modelo Arcadia H). Una vez solidificados los bloques, se cortaron con ayuda de un micrótopo (Leica, modelo 820), en secciones de aproximadamente 5  $\mu$ m de grosor. Los cortes se montaron en portaobjetos de vidrio 25x75, tratados previamente con etanol y poli-lisina al 10%. Posteriormente, se almacenaron a 4°C para su análisis.

Una vez teniendo los cortes montados, se inició el proceso de tinción comenzando con la eliminación de parafina mediante su calentamiento a 60°C en un horno de hibridación (Hybaid, modelo Micro-4) durante 20 min, y realizando 3 lavados de 10 min cada uno en xilol. Después, se hidrataron las muestras mediante 2 lavados de 5 min en alcoholes

graduados de 100%, 95% y 75%. Seguido de la inmersión del tejido en hematoxilina de Harris (colorante primario) durante 5 min, se realizó un lavado con agua y etanol al 100% y enseguida se sumergieron las muestras en eosina (colorante de contraste) durante 10 min. Se realizó un lavado con agua, etanol al 100% y al 95% y se finalizó con el aclaramiento de las muestras con 3 lavados de 5 min en xilol. Se sellaron los tejidos con cubreobjetos y medio de montaje (entellan) para su conservación.

Análisis morfológico.

Por último, se incluyeron 6 ratas de cada grupo y se procedió a realizar un análisis morfológico por microscopía en donde se tomaron 5 microfotografías de diferentes campos por rata de cada uno de los grupos en un microscopio de campo claro (Leica, modelo DM 1000) a una magnificación de 40X calibrado a 50  $\mu\text{m}$ . Posteriormente se realizó la cuantificación en  $\mu\text{m}^2$  del área total, área de glomérulos, área de luz tubular, área intersticial y área de daño de cada microfotografía tomada utilizando el programa de procesamiento digital de imagen Image J (ImageJ, Institutos Nacionales de EE. UU. Salud, Bethesda, MD, EE. UU.). Estos datos se utilizaron para calcular el porcentaje de daño tubular y el área tubular mediante las siguientes ecuaciones (Ramírez V., et al., 2022):

*Área tubular = área total – (área luz tubular + área glomerular + área Intersticial)*

$$\% \text{daño tubular} = \frac{\text{área de daño total}}{\text{área tubular}} (100)$$

Los resultados se presentan como porcentaje (%) de daño (Ramírez V., et al., 2009; Ramírez V, et al., 2022)

### **7.7.2. Inmunohistoquímica**

La inmunohistoquímica es una técnica basada en la alta especificidad y afinidad de la reacción antígeno-anticuerpo.

En este procedimiento se utilizaron, para localizar moléculas inflamatorias y marcadores de reparación, las muestras de tejido renal previamente fijadas, deshidratadas, parafinadas y cortadas a 5  $\mu\text{m}$  de espesor y montados en portaobjetos.

El trabajo se realizó en dos días, se utilizó el kit Multidetector de BioSB. En el día uno, se realizó un primer lavado en xilol durante 20-30 min con el fin de desparafinar las secciones de tejido, a continuación, se realizó un proceso de deshidratación del tejido con alcoholes graduados (EtOH 100%, 95%, 75% y 50%) un lavado de 10 min por cada alcohol, seguido de la incubación en citrato de sodio 1X (10 mM pH 6) en ebullición durante 30 min para recuperación del antígeno. Posteriormente se utilizó aproximadamente 30  $\mu\text{L}$  por tejido de bloqueador de la peroxidasa endógena para inhibir la actividad de la enzima endógena y evitar unión inespecífica. Finalmente, se añadió el anticuerpo de interés (IL-1 $\beta$ , VCAM; tabla 6) y se incubó toda la noche a T.A /humedad constante/ agitación a 20 rpm.

En el segundo día, se realizaron lavados con PBS1X (Fosfato buffer salino: NaCl 0.137 M, KCl 0.0027 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.01 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.0018 M; pH 7.4) e incubaciones en diferentes soluciones de la siguiente manera: ~20-30  $\mu\text{L}$ /15 min/ T.A. en solución Poly Detector Plus Link (solución amarilla), ~20-30  $\mu\text{L}$ /10 min/ T.A. en solución Poly Detector Plus HP Label (solución rosa) y ~20-30  $\mu\text{L}$ /10 min/ T.A. en solución de cromógeno (30  $\mu\text{L}$  de DAB concentrado + 1000  $\mu\text{L}$  de buffer de DAB). Se realizaron 2 lavados de 10 min con buffer PBS 1X. El sustrato cromógeno permite la detección del complejo antígeno-anticuerpo al actuar como donante de electrones en presencia de la solución label HP, el DAB se oxida y produce un color marrón en el sitio del antígeno objetivo. Al finalizar se contra-tiñen los tejidos con una gota de ~20  $\mu\text{L}$  de hematoxilina durante 30 segundos se lavaron con agua destilada durante 10 min y se procedió a deshidratar con alcoholes graduados (EtOH 50%, 75%, 95% y 100%), un lavado de 10 min por cada alcohol, y 20 min en xilol. Se finalizó con el sellado de los tejidos con medio de montaje.

A continuación, se tomaron 5 microfotografías en campos aleatorios por cada tejido en un microscopio de campo claro (Leica, modelo DM 1000) a una magnificación de 40X y se realizó un procedimiento semiautomático utilizando el Software Image J (Institutos Nacionales de Salud de EE. UU.). Los resultados se presentan como el porcentaje % de la tinción del área y se expresan como la media  $\pm$  error estándar de la media (EE). El

análisis estadístico utilizado para evaluar la significancia entre los grupos fue método de ANOVA de una vía seguido por la corrección de Tukey. Los valores se consideraron significativos si  $p < 0,05$ . Los datos se analizaron utilizando el software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE. UU.) (Ramírez-Rodríguez Y., et al., 2022).

### **7.7.3. Determinación *in situ* de apoptosis**

La determinación de células apoptóticas en los tejidos empleados se realizó mediante la utilización del kit Click-iT™ Plus TUNEL Assay with Alexa Fluor™ 488, mismo que se basa en la incorporación de dUTP modificados por la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) en los extremos 3'-OH de DNA fragmentado el cual es una característica distintiva en la apoptosis (Thermo Fisher Click iT TUNEL). Para ello se realizó la desparafinización de los tejidos efectuando los siguientes lavados: 5 min en Xilol por duplicado, 3 min en una solución 50%:50% de Xilol:EtOH, 5 min en EtOH al 100%, se procedió con lavados de 3 min en alcoholes graduados (EtOH 100%, 95%, 85%, 75% y 50%) y se concluyó con un lavado de 5 min en solución salina inyectable (Cloruro de sodio 0.8%) y uno de 5 min en PBS 1X. Se permeabilizaron los tejidos con Proteinasa K (1:25 en PBS) durante 15 min con lavados previos de 15 min en 4% paraformaldehído (1:10 formaldehído al 10% PBS), y 2 lavados de 5 min en PBS; y lavados posteriores de 5 min c/u en PBS 1X, 4% paraformaldehído, PBS y agua destilada (H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>). Enseguida se realizó la reacción TdT, incubando 10 min a T.A. con TdT buffer reaction, posteriormente, se incubaron los tejidos durante 60 min con la solución de reacción de TdT (94% TdT reaction buffer, 2% EdUTP, 4% TdT enzyme). Después de realizar lavados con agua destilada, solución de 3% BSA y 0.1% Triton X-100 en PBS, se finalizó el procedimiento añadiendo el buffer Click-iT Plus 90%-Click-iT Plus TUNEL Supermix (97.4% 1X Click-IT Plus TUNNEL Reaction Buffer, 2.5% Copper Protectant, 0.1% Alexa Fluor™ 488 picoyl azide y 10% 10X Click-iT Plus TUNEL reaction buffer additive) e incubando durante 30 min, sin luz, y al finalizar se realizan lavados con H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>, solución al 3% BSA con PBS. Se realizó contratinción de núcleos con DAPI (4'-6 diamidino-2-phenylindole) contenido en el medio de montaje VECTASHIELD®.

Finalmente, se tomaron 5 microfotografías en campos aleatorios por cada tejido en un microscopio de fluorescencia (OLYMPUS® BX51) a una magnificación de 40X, a 488 nm

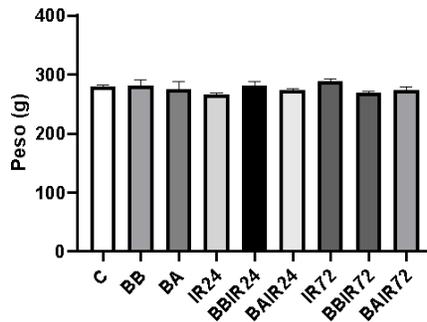
y con filtros verde y azul. Se realizó la cuantificación de DNA apoptótico en los tejidos utilizando el Software Image J (Institutos Nacionales de Salud de EE. UU.). En el software se unieron las microfotografías de ambos filtros y se buscaron núcleos positivos que se presentaban como un color celeste. Los resultados se presentan como porcentaje de las células TUNEL positivas por campo.

### **7.8. Análisis estadístico**

Todos los datos obtenidos en este protocolo se presentan como el promedio  $\pm$  el EE. El análisis estadístico utilizado para determinar diferencias entre los grupos fue el análisis de varianza de ANOVA de una vía; seguido de una corrección de Tukey. Los valores se consideraron significativos si  $p < 0,05$ . Los datos se analizaron utilizando el software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE. UU.). (Ramírez-Rodríguez Y., et al., 2022).

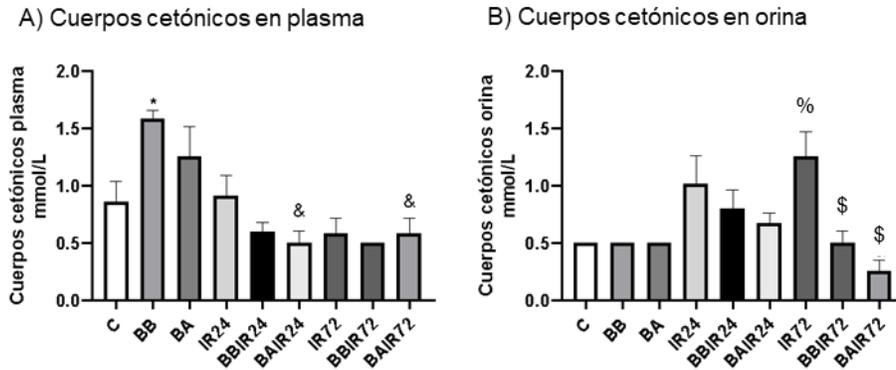
## 8. Resultados

Todos los animales en estudio tuvieron libre acceso a agua y alimento, previo al inicio del protocolo, hasta alcanzar un peso aproximado de 280 g (Figura 13), donde se observa que todos los animales tuvieron el mismo peso.



**Figura 13. Peso corporal de los animales incluidos (g).** Las barras representan el promedio  $\pm$  EE (n=6) por grupo. C (Control), BB (Butirato bajo; 300 mg/kg), BA (Butirato alto; 800 mg/kg), IR24 (Isquemia reperfusión 24 h), BBIR24 (Butirato bajo + IR 24 h), BAIR24 (Butirato alto + IR 24 h), IR72 (Isquemia reperfusión 72 h), BBIR72 (Butirato bajo + IR 72 h), BAIR72 (Butirato alto + IR 72 h).

Una vez que los animales fueron administrados de acuerdo a lo descrito en los métodos y con la finalidad de comprobar la administración de BuNa, se midieron los niveles de cuerpos cetónicos en plasma y orina. Como esperábamos, en plasma (Figura 14 A) se observó que en el grupo C, la concentración de cuerpos cetónicos aumentó significativamente en el grupo de BB con respecto al resto de los animales; es decir aumentaron los niveles de cuerpos cetónicos en plasma, este efecto no se observó en los animales post isquemia, ni en aquellos animales que tuvieron butirato+IR. En los grupos BAIR24 y BAIR72 se observó una reducción significativa comparado con el grupo BA. En orina, las concentraciones en los grupos C, BB y BA no hubo cambios y se mantuvo igual 24 h post insulto; por el contrario, se observó que en el grupo IR72, que la excreción de cuerpos cetónicos aumentó significativamente vs C (Figura 14 B) sin embargo, la administración de la dosis baja y alta previa a la IR72 previno la pérdida de cetonas en orina.



**Figura 14. Cuantificación de cuerpos cetónicos (mmol/L) en A) plasma y B) orina. Las barras representan el promedio  $\pm$  EE (n=6) por grupo. C (Control), BB (Butirato bajo; 300 mg/kg), BA (Butirato alto; 800 mg/kg), IR24 (Isquemia reperfusion 24 h), BBIR24 (Butirato bajo + IR 24 h), BAIR24 (Butirato alto + IR 24 h), IR72 (Isquemia reperfusion 72 h), BBIR72 (Butirato bajo + IR 72 h), BAIR72 (Butirato alto + IR 72 h). Las diferencias estadísticas fueron analizadas con ANOVA \*  $p < 0.05$  vs todos; &  $p < 0.05$  vs BA; %  $p < 0.05$  vs C; \$  $p < 0.05$  vs IR72.**

Una vez finalizado el experimento procedimos a comprobar el daño renal mediante diversos parámetros bioquímicos. Se cuantificaron las concentraciones de creatinina sérica (Figura 15), y notamos que tras la IR24h estos aumentaron significativamente con respecto a todos los grupos, comprobando la presencia de daño renal; el grupo BBIR24 no presentó reducción de este parámetro mientras que, en el grupo BAIR24 se observaron efectos protectores parciales con respecto a IR24 es decir hay una reducción significativa respecto al grupo IR24; por otro lado, observamos que a las 72 h de reperfusion, los niveles de creatinina fueron menores respecto a IR24 sin cambios con el grupo C mostrando regeneración después de 72 h, este efecto no se potencio en los grupos BBIR72 y BAIR72.

Cuando medimos la tasa de filtrado renal determinada como CCr (Figura 16), se observó, en el grupo de BA, que existe una disminución significativa con respecto al grupo BB, aun y cuando se encuentra en niveles normales, esto podría denotar un efecto hemodinámico del butirato. La IR24 indujo caída de la función renal con respecto al grupo C, BB y BA, sin inducir mejoría en los grupos BBIR24 y BAIR24, siendo estos valores significativamente menores vs C y BB. Tras 72 h de reperfusion no se observaron diferencias comparado con el grupo C, al igual que los tratamientos BBIR72 y BAIR72 que sólo mostraron diferencias con los grupos BB y BAIR24, respectivamente.

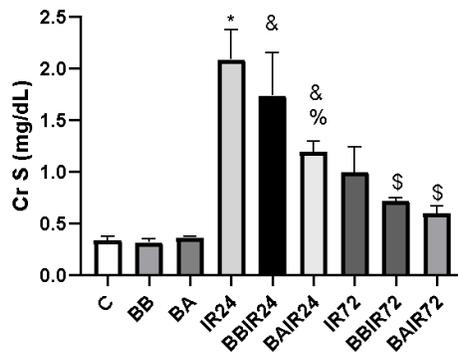


Figura 15. Determinación de la función renal como creatinina sérica. Las barras representan el promedio  $\pm$  EE (n=6) por grupo. C (Control), BB (Butirato bajo; 300 mg/kg), BA (Butirato alto; 800 mg/kg), IR24 (Isquemia reperusión 24 h), BBIR24 (Butirato bajo + IR 24 h), BAIR24 (Butirato alto + IR 24 h), IR72 (Isquemia reperusión 72 h), BBIR72 (Butirato bajo + IR 72 h), BAIR72 (Butirato alto + IR 72 h). Las diferencias estadísticas fueron analizadas con ANOVA. \*  $p < 0.05$  vs todos, &  $p < 0.05$  vs BB y BA; %  $p < 0.05$  vs IR24; \$  $p < 0.05$  vs BBIR24.

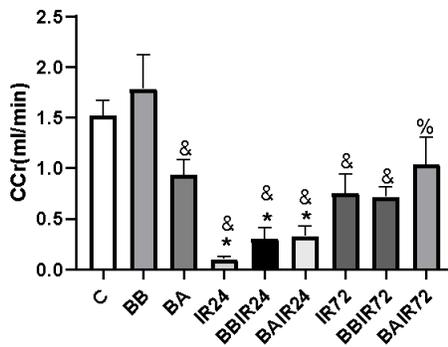


Figura 16. Tasa de filtrado glomerular, determinado como depuración de creatinina CCr (ml/min) Las barras representan el promedio  $\pm$  EE (n=6) por grupo. C (Control), BB (Butirato bajo; 300 mg/kg), BA (Butirato alto; 800 mg/kg), IR24 (Isquemia reperusión 24 h), BBIR24 (Butirato bajo + IR 24 h), BAIR24 (Butirato alto + IR 24 h), IR72 (Isquemia reperusión 72 h), BBIR72 (Butirato bajo + IR 72 h), BAIR72 (Butirato alto + IR 72 h). Las diferencias estadísticas fueron analizadas con ANOVA. \*  $p < 0.05$  vs C; &  $p < 0.05$  vs BB; %  $p < 0.05$  vs BAIR24.

Al analizar el BUN (Figura 17) se observó un comportamiento similar a la creatinina sérica, los grupos BB y BA no cambian respecto al C; en el grupo de IR24 las concentraciones aumentan significativamente con respecto a los grupos controles, sin cambios por la administración profiláctica de BBIR24 y BAIR24; por otro lado, después de 72 h de reperusión con o sin tratamiento se observó reducción con respecto al grupo IR24, sin embargo, esta reducción no se potencio por la administración de la dosis baja o alta.

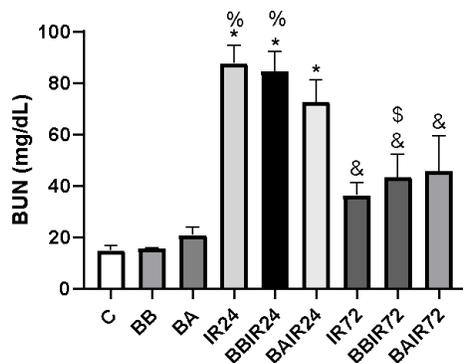


Figura 17. Determinación de nitrógeno ureico en sangre BUN (mg/dL). Las barras representan el promedio  $\pm$  EE (n=6) por grupo. C (Control), BB (Butirato bajo; 300 mg/kg), BA (Butirato alto; 800 mg/kg), IR24 (Isquemia reperfusion 24 h), BBIR24 (Butirato bajo + IR 24 h), BAIR24 (Butirato alto + IR 24 h), IR72 (Isquemia reperfusion 72 h), BBIR72 (Butirato bajo + IR 72 h), BAIR72 (Butirato alto + IR 72 h). Las diferencias estadísticas fueron analizadas con ANOVA. \* $p < 0.05$  vs C, BB, BA; &  $p < 0.05$  vs IR24; %  $p < 0.05$  vs IR72; \$  $p < 0.05$  vs BBIR24.

De igual forma se cuantificó la excreción de proteínas en orina como marcador de daño tubular. La (Figura 18) muestra que la administración de BB y BA no modifica los valores de excreción urinaria de proteínas respecto a los animales control. Se observó que tras la IR24 la concentración de proteínas urinarias aumentó significativamente vs. grupos C, BB y BA y la administración previa de butirato no modificó estos valores después de 24 h de reperfusion. Como esperábamos en el grupo IR72, los niveles de proteinuria se normalizaron siendo menores que el grupo de IR24, aunque la administración de BuNa no tuvo un efecto aditivo. Es decir, la reducción observada es debida al proceso de reparación normal.

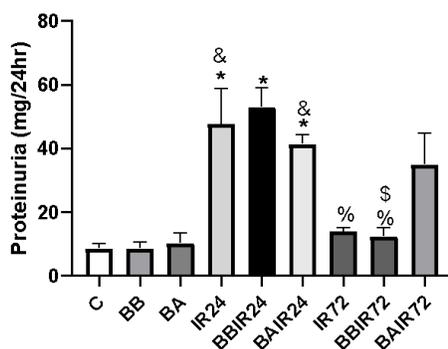


Figura 18. Excreción urinaria de proteínas (Proteinuria mg/24hr). Las barras representan el promedio  $\pm$  EE (n=6) por grupo. C (Control), BB (Butirato bajo; 300 mg/kg), BA (Butirato alto; 800 mg/kg), IR24 (Isquemia reperfusion 24 h), BBIR24 (Butirato bajo + IR 24 h), BAIR24 (Butirato alto + IR 24 h), IR72 (Isquemia reperfusion 72 h), BBIR72 (Butirato bajo + IR 72 h), BAIR72 (Butirato alto + IR 72 h). Las

diferencias estadísticas fueron analizadas con ANOVA. \*  $p < 0.05$  vs C, BB; &  $p < 0.05$  vs BA; %  $p < 0.05$  vs IR24; \$  $p < 0.05$  vs BBIR24.

Una de las características de la LRA es la formación de radicales libres que contribuyen al daño renal, por esta razón evaluamos el estrés oxidante al determinar la concentración de  $H_2O_2$  en orina. Nuestros resultados mostraron que la administración de BB y BA no modificaron el estado oxido reducción del epitelio tubular, por el contrario, en el grupo de IR24 observamos incremento significativo de la excreción urinaria de  $H_2O_2$  vs el grupo C (Figura 19), estos valores no disminuyeron cuando se administró BBIR24 y BAIR24 de manera profiláctica; en el grupo de 72 h de reperusión se observó normalización de este parámetro con respecto al grupo IR24 y los tratamientos BBIR72 y BAIR72 no generaron ningún efecto adicional.

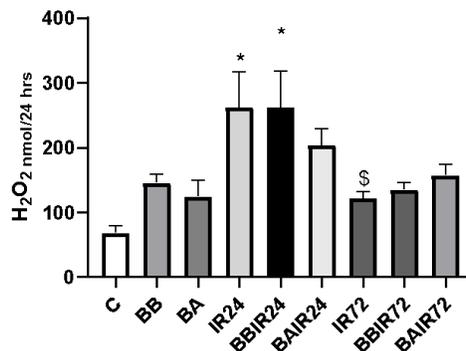
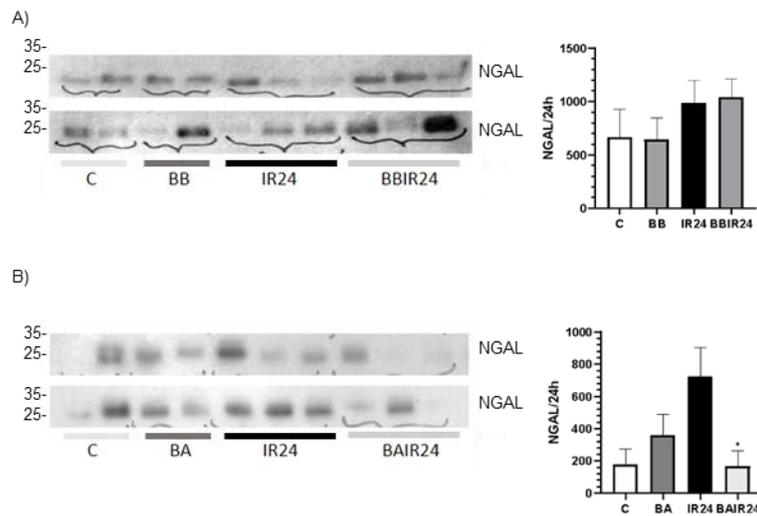


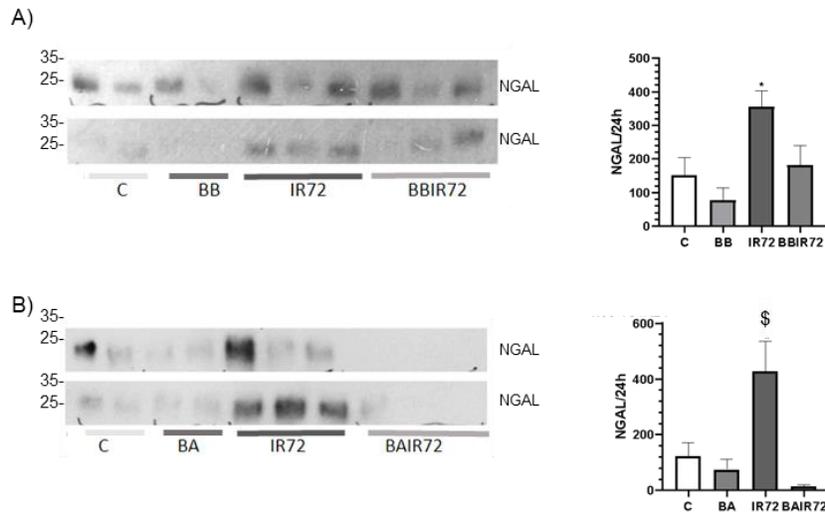
Figura 19. Producción de radicales libres determinado por la concentración de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en orina (nmol/24h). Las barras representan el promedio  $\pm$  EE (n=6) por grupo. C (Control), BB (Butirato bajo; 300 mg/kg), BA (Butirato alto; 800 mg/kg), IR24 (Isquemia reperusión 24 h), BBIR24 (Butirato bajo + IR 24 h), BAIR24 (Butirato alto + IR 24 h), IR72 (Isquemia reperusión 72 h), BBIR72 (Butirato bajo + IR 72 h), BAIR72 (Butirato alto + IR 72 h). Las diferencias estadísticas fueron analizadas con ANOVA \*  $p < 0.05$  vs C; \$  $p < 0.05$  vs IR24, BBIR24.

Una vez determinado el daño funcional nos dimos a la tarea de cuantificar el marcador de daño tubular NGAL en la orina de los animales de estudio. Mediante W. Blot de orina, cuyo resultado fue normalizado con el volumen urinario, observamos que el grupo IR24 mostró una tendencia a aumentar la cantidad de proteína con respecto al grupo C sin ser diferente y, la dosis previa de BB + IR24 no induce daño renal (Figura 20 A), al analizar a aquellos animales con dosis alta de butirato notamos una tendencia a incrementarse en el grupo IR24 vs C y BA que no alcanzó diferencias significativas, sin embargo, la cantidad de NGAL fue significativamente menor en el grupo BAIR24 con respecto al

grupo IR24 indicando una reducción en el daño tubular (Figura 20 B). Al analizar esta proteína en los animales con 72 h de reperfusión observamos incremento significativo en IR72 vs C y BB (Figura 21 A) y que el grupo BBIR72 no fue diferente a IR72 aun cuando hay una tendencia a la normalización. Cuando evaluamos la dosis alta nuevamente observamos que IR72 presentó mayor cantidad de NGAL respecto a C y BA, interesantemente la administración de la dosis alta BAIR72 fue capaz de reducir significativamente el daño tubular, mostrando así que el butirato de sodio reduce el daño o acelera la reparación (Figura 21 B).

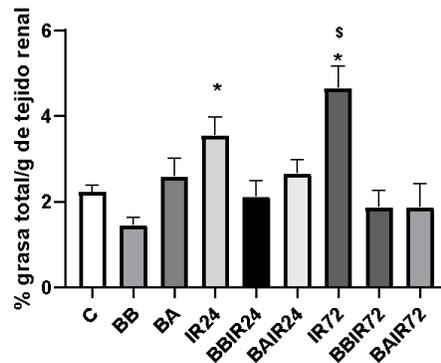


**Figura 20. Marcador de daño tubular lipocalina 2 (NGAL) en orina después de 24h de reperfusión. Imagen representativa de Análisis de W. Blot y análisis densitométrico normalizado con el volumen urinario. Cada banda representa un animal diferente y la imagen muestra a 4-6 ratas por grupo. A) dosis baja y B) dosis alta de butirato de sodio previo a la isquemia con 24 h de reperfusión. Las barras representan el promedio  $\pm$  EE (n=6) por grupo. C (Control), BB (Butirato bajo; 300 mg/kg), BA (Butirato alto; 800 mg/kg), IR24 (Isquemia reperfusión 24 h), BBIR24 (Butirato bajo + IR 24 h), BAIR24 (Butirato alto + IR 24 h). Las diferencias estadísticas fueron analizadas con ANOVA \*  $p < 0.05$  vs IR24.**



**Figura 21. Marcador de daño tubular lipocalina 2 (NGAL) en orina después de 72h de reperfusion. Imagen representativa de Análisis de W. Blot y análisis densitométrico normalizado con el volumen urinario. Cada banda representa a un animal individual y la imagen muestra a 4-6 ratas por grupo. A) dosis baja y B) dosis alta de butirato de sodio previo a la isquemia con 72 h de reperfusion. Las barras representan el promedio  $\pm$  EE (n=6) por grupo. C (Control), BB (Butirato bajo; 300 mg/kg), BA (Butirato alto; 800 mg/kg), IR72 (Isquemia reperfusion 72 h), BBIR72 (Butirato bajo + IR 72 h), BAIR72 (Butirato alto + IR 72 h). Las diferencias estadísticas fueron analizadas con ANOVA \*  $p < 0.05$  vs C, BB; \$  $p < 0.05$  vs todos.**

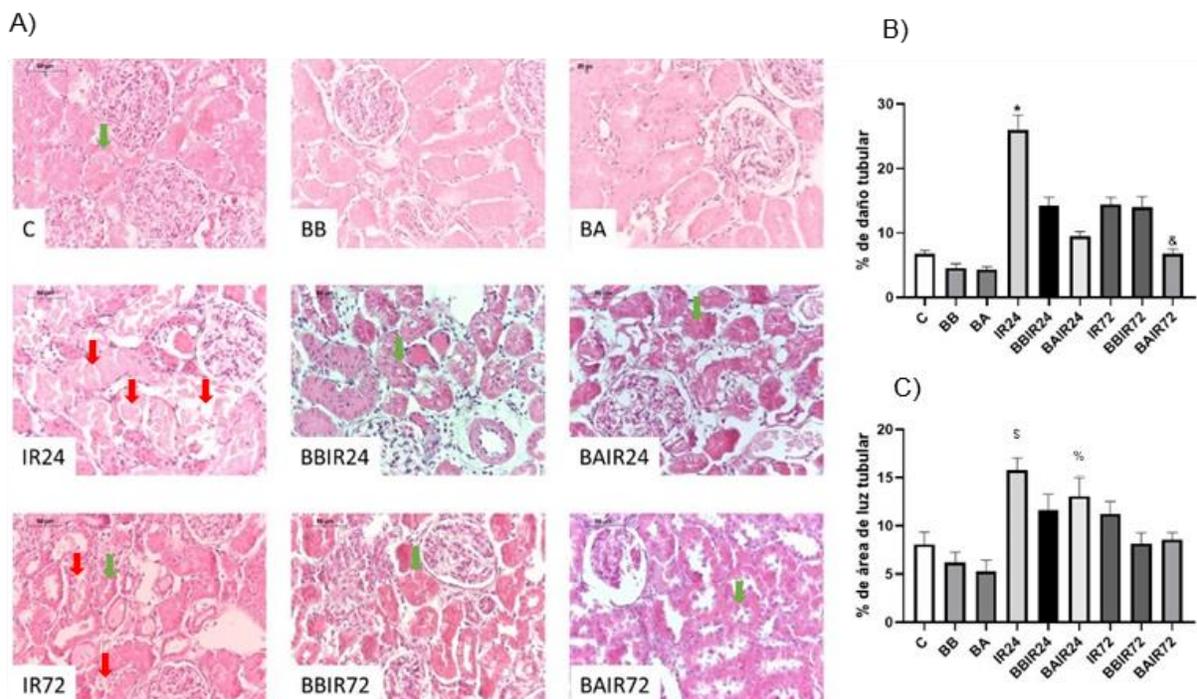
Una vez que determinamos si el butirato previno o redujo el daño funcional decidimos estudiar parte de su metabolismo, ya que se conoce que el tejido renal emplea ácidos grasos como sustrato energético, específicamente el túbulo proximal depende en menos del 10% de la glucosa, dado esta evidencia decidimos cuantificar el contenido de grasa en la corteza renal. Observamos que la IR24 induce la acumulación de grasa en el tejido renal vs BB, interesantemente este efecto fue significativamente mayor en el grupo IR72 con respecto a todos los grupos (Figura 22). También vimos que la administración de butirato en BBIR24 y BAIR24 tiende a reducir la cantidad de grasa a las 24 h sin ser diferente con el grupo IR24, no obstante, esta acumulación se previene completamente en los animales con tratamiento alto y bajo después de 72 h de reperfusion, mostrando valores similares a los animales del grupo C.



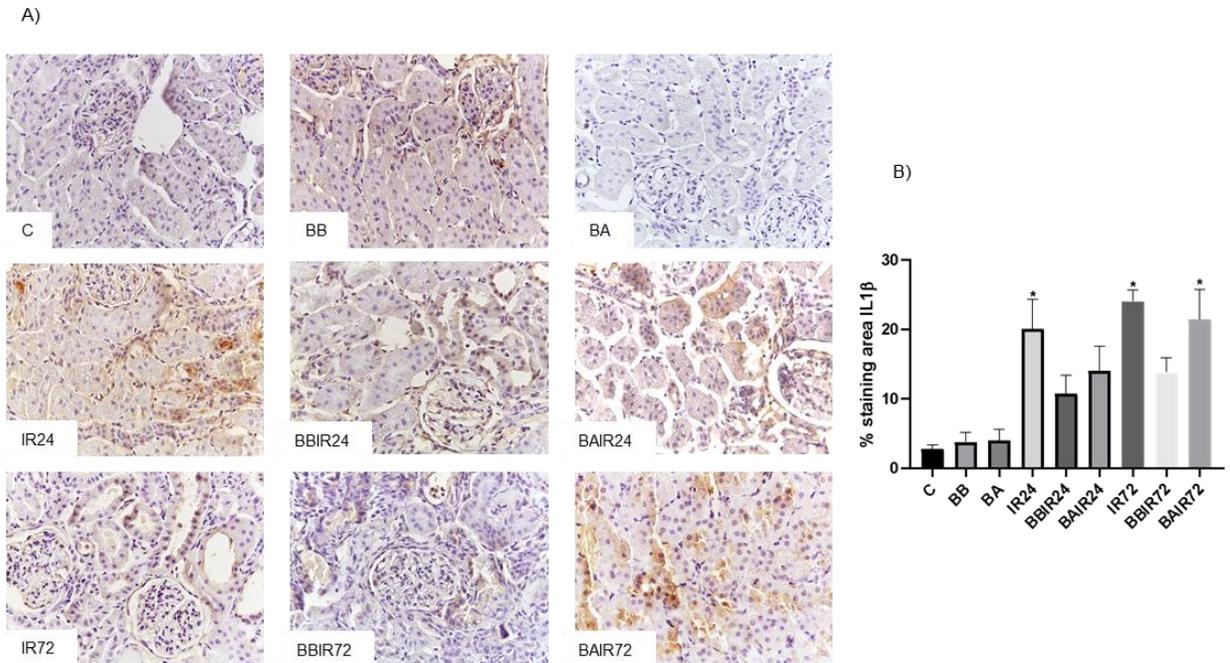
**Figura 22.** Determinación de grasa total en el tejido renal expresado como % grasa total/g de tejido renal. Las barras representan el promedio  $\pm$  EE (n=6) por grupo. C (Control), BB (Butirato bajo; 300 mg/kg), BA (Butirato alto; 800 mg/kg), IR24 (Isquemia reperusión 24 h), BBIR24 (Butirato bajo + IR 24 h), BAIR24 (Butirato alto + IR 24 h), IR72 (Isquemia reperusión 72 h), BBIR72 (Butirato bajo + IR 72 h), BAIR72 (Butirato alto + IR 72 h). Las diferencias estadísticas fueron analizadas con ANOVA. \* $p < 0.05$  vs BB; \$ $p < 0.05$  vs todos.

Posteriormente, se evaluó si los tratamientos son capaces de disminuir el daño estructural. Para lo cual, cuantificamos el área de daño del tejido renal mediante el análisis morfométrico. Se muestra una microfotografía representativa de la tinción H&E de cada uno de los grupos de estudio (Figura 23 A). La tinción y el análisis del grupo C mostró la estructura celular de un tejido sano donde se observan túbulos y glomérulos preservados, presencia de bordes en cepillo de las células tubulares proximales, y existe un espacio intersticial y luz tubular normal. Las dosis de BB y BA, no modificaron esta estructura (Figura 23 A y B). Por otro lado, las microfotografías (Figura 23 A) mostraron que la IR24 causó pérdida del borde en cepillo, aumento de la luz tubular y del espacio intersticial, hay presencia de la descamación e infiltración observada como estructuras circulares teñidas de violeta en la luz tubular e intersticio respectivamente. Además, el análisis morfométrico (Figura 23 B) mostró un aumento significativo el % de área dañada en las ratas con IR24 comparado con el grupo C, BB y BA. Encontramos que los tratamientos BBIR24 y BAIR24 presentaron reducción del % de área dañada (Figura 23 A y B) respecto a IR24, evidenciando la capacidad del butirato para reducir el daño estructural. En los grupos de 72 h de reperusión, se observa la presencia de daño e infiltración de células inflamatorias (Figura 23 A), pero comparado con el grupo IR24 el daño es significativamente menor, esto puede deberse a la activación de mecanismos de reparación, los valores fueron similares al grupo C, BB y BA (Figura 23 B y C). Efectos

similares se observaron con BBIR72, donde hay reducción significativa respecto a IR24 sin cambios con IR72, es decir la dosis baja no modifico el área de daño (Figura 23 B y C). Sin embargo, en el grupo BAIR72 (Figura 23 A) se observa un % de área dañada significativamente menor que IR24 e IR72, estos resultados sugieren que la administración de butirato alto en el grupo BAIR72 acelera la reparación tubular después de 72 h. Aun cuando no hay reducción, el área de la luz tubular muestra mejor preservación de los túbulos renales y menor infiltración después de 72 h del daño (Figura 23 C).



**Figura 23. Análisis morfométrico. A) Microfotografías representativas de la tinción de H&E de todas las ratas de estudio. Magnificación de 40X, Barra = 50  $\mu$ m. Las flechas verdes señalan túbulos renales sanos, con la formación y estructura correcta; las flechas rojas indican túbulos renales dañados, se observa descamación de células, formación de cilindros, mayor luz tubular y espacio intersticial. B) % de daño tubular, C) % de área de luz tubular. Cada barra representa el promedio  $\pm$  EE de 30 campos por grupo (5 por rata) diferencias estadísticas analizadas con ANOVA. C (Control), BB (Butirato bajo; 300 mg/kg), BA (Butirato alto; 800 mg/kg), IR24 (Isquemia reperfusión 24 h), BBIR24 (Butirato bajo + IR 24 h), BAIR24 (Butirato alto + IR 24 h), IR72 (Isquemia reperfusión 72 h), BBIR72 (Butirato bajo + IR 72 h), BAIR72 (Butirato alto + IR 72 h). \*  $p < 0.05$  vs todos; &  $p < 0.05$  vs IR72, BBIR72; \$  $p < 0.05$  vs C, BB, BA; %  $p < 0.05$  vs BA.**

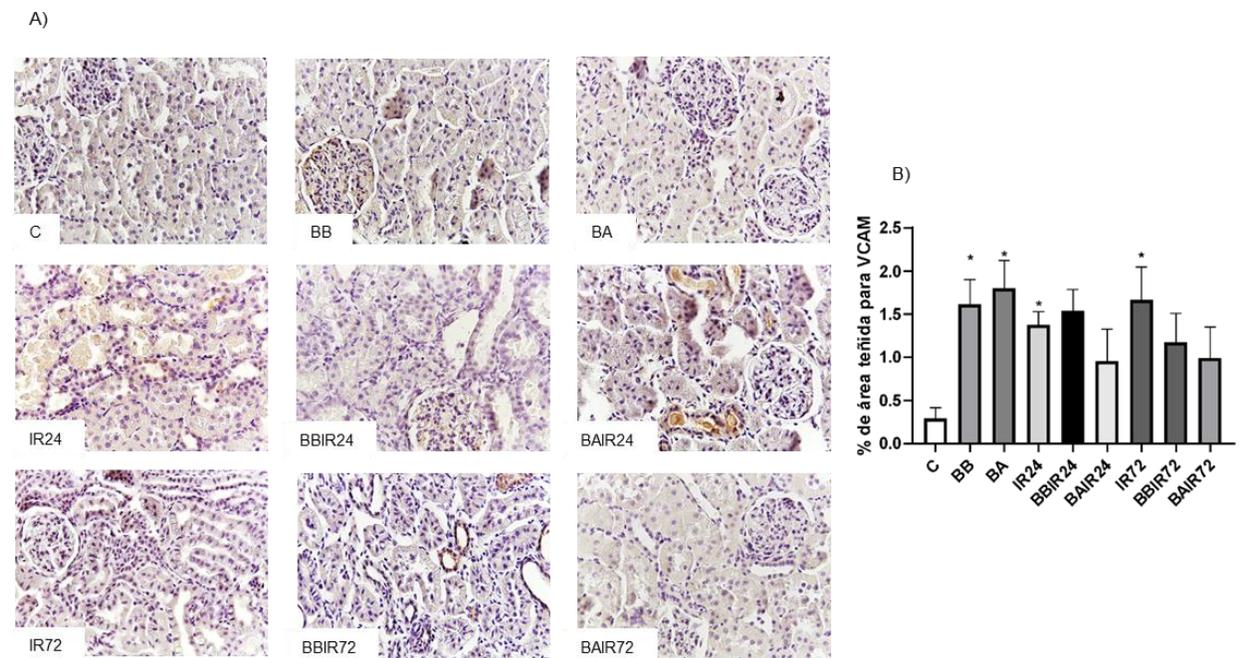


**Figura 24. Presencia de IL-1 $\beta$  en tejido renal determinada mediante inmunohistoquímica. A) Microfotografías representativas de cada uno de los grupos de estudio. Magnificación de 40X, Barra = 50  $\mu$ m. B) Cuantificación del % área teñida para IL-1 $\beta$  (image J). Cada barra representa el promedio de 30 campos (5 por rata n=6 por grupo)  $\pm$  EE. Las diferencias estadísticas analizadas con ANOVA. C (Control), BB (Butirato bajo; 300 mg/kg), BA (Butirato alto; 800 mg/kg), IR24 (Isquemia reperfusion 24 h), BBIR24 (Butirato bajo + IR 24 h), BAIR24 (Butirato alto + IR 24 h), IR72 (Isquemia reperfusion 72 h), BBIR72 (Butirato bajo + IR 72 h), BAIR72 (Butirato alto + IR 72 h). \*  $p < 0.05$  vs C.**

Los efectos de la lesión renal aguda, incluyen la activación de la vía inflamatoria, ya que, tras la lesión, en el epitelio tubular se liberan numerosas moléculas de la vía inflamatoria, entre ellas citocinas como la interleucina 1 $\beta$  (Bonventre J., et al., 2011), por lo que decidimos evaluar si la administración de BuNa era capaz de reducir la inflamación determinada con la presencia de IL-1 $\beta$  en el tejido tubular. La inmunohistoquímica para IL-1 $\beta$  (Figura 24 A y B) mostró una elevación significativa en el % de área teñida para IL-1 $\beta$  a las 24 h y 72 h después de la lesión. Observamos que el BuNa parece reducir la presencia de IL-1 $\beta$ , sin ser significativo en los grupos BBIR24 y BAIR24 vs IR24 y en el grupo BBIR72 vs IR72; mientras que, en el grupo BAIR72 permanece alto aún después de 72 h del insulto.

Por otro lado, evaluamos la presencia de la molécula de adhesión de células vasculares-1 (VCAM1) que se expresa en el endotelio vascular en condiciones normales, pero cuando hay daño renal esta se puede expresar en las células del epitelio tubular involucradas en inflamación y reparación celular (Contreras F, 2008). Encontramos que,

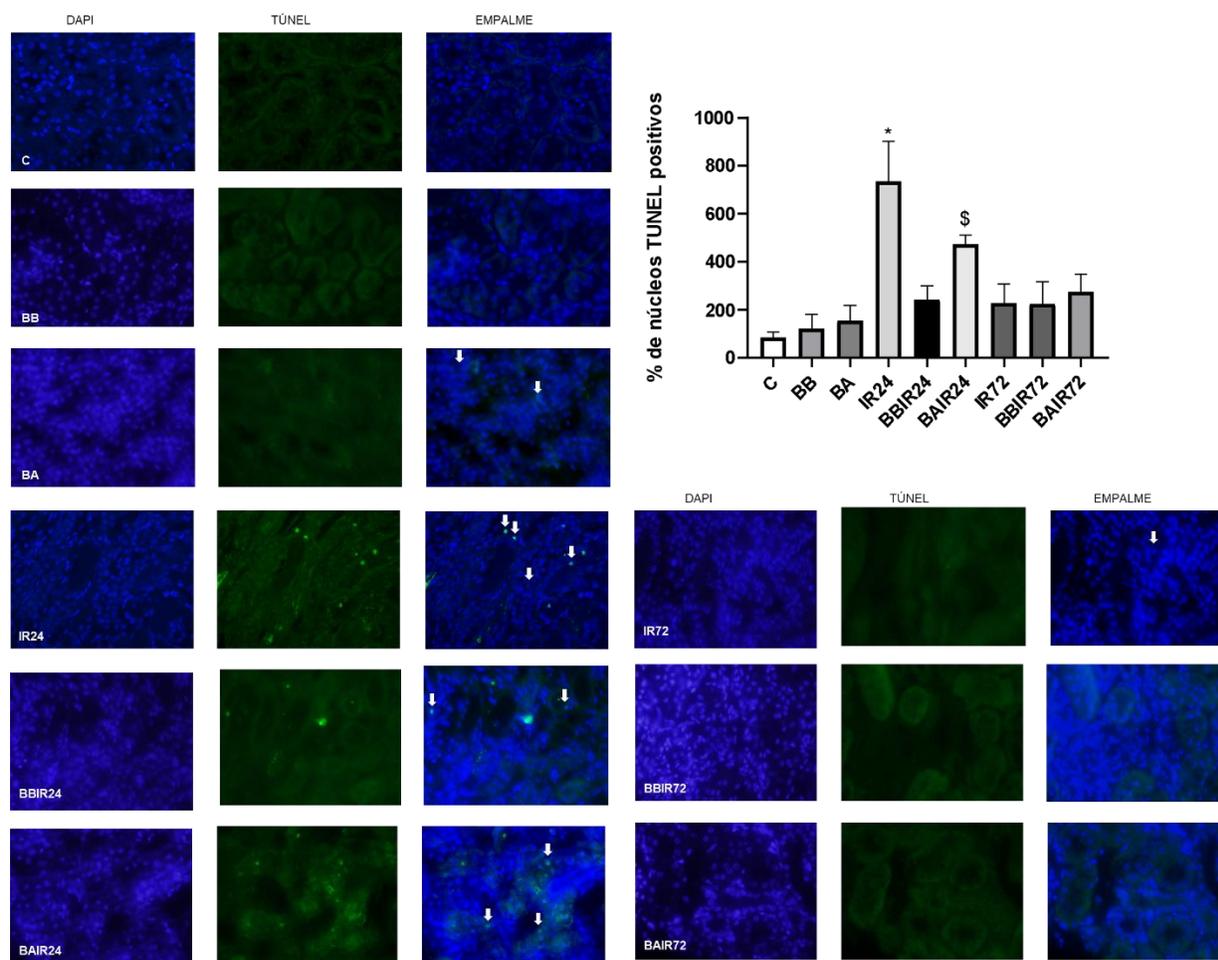
hubo un incremento significativo en el área positiva para VCAM en los grupos a los que sólo se les administró butirato dosis baja o alta con respecto al grupo C. Asimismo, el grupo IR24 mostró resultados similares. Con el tratamiento BBIR24 no se observaron cambios; mientras que las ratas del grupo BAIR24 mostraron una ligera reducción, no significativa, de la presencia de VCAM en la corteza. Ahora bien, en el tiempo de reperusión de 72 h post isquemia aún hay incremento de la presencia de VCAM vs C, y los tratamientos BBIR72 y BAIR72 no muestran cambios significativos vs IR72, esto indica que el tratamiento con butirato previo a la IR no tiene efecto aditivo para reducir los niveles de VCAM1.



**Figura 25. Presencia de VCAM-1 en tejido renal determinada mediante inmunohistoquímica. A) Microfotografías representativas de cada uno de los grupos de estudio. Magnificación de 40X, Barra = 50  $\mu$ m. B) Cuantificación del % área teñida para VCAM1 (Image J). Cada barra representa el promedio de 30 campos (5 por rata n=6 por grupo)  $\pm$  EE. Las diferencias estadísticas analizadas con ANOVA. C (Control), BB (Butirato bajo; 300 mg/kg), BA (Butirato alto; 800 mg/kg), IR24 (Isquemia reperusión 24 h), BBIR24 (Butirato bajo + IR 24 h), BAIR24 (Butirato alto + IR 24 h), IR72 (Isquemia reperusión 72 h), BBIR72 (Butirato bajo + IR 72 h), BAIR72 (Butirato alto + IR 72 h). \*  $p < 0.05$  vs C.**

Por último, estudiamos la vía de muerte celular ya que se conoce que la IR induce apoptosis. Al cuantificar el índice de apoptosis no se detectaron núcleos TUNEL positivos en los riñones del grupo C, el porcentaje de núcleos TUNEL positivos en el grupo IR24 fue significativamente mayor respecto a todos los grupos excepto el grupo BAIR24

(Figura 26). Curiosamente, el tratamiento de BBIR24 redujo significativamente la muerte celular en ratas vs IR24; mientras que BAIR24 mostró un índice de apoptosis similar a IR24. Finalmente, en los grupos BBIR72 y BAIR72 no se observó un cambio en el número de células apoptóticas vs el grupo IR72, mostrando estos 3 últimos grupos niveles similares a los grupos control.



**Figura 26. Índice de apoptosis (%).** Microfotografías representativas de la tinción de TUNEL de células apoptóticas de los tejidos de cada grupo de animales de estudio. Magnificación de 40X, Barra = 50  $\mu$ m. n=5-10 campos por rata. Tinción con 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI): azul e izquierda; Células TUNEL positivas verde en medio y empalme: derecha. Las flechas señalan los núcleos TUNEL positivos. Los resultados se presentan como % de células TUNEL positivas. Cada barra representa el promedio de 30 campos (5 por rata n=6 por grupo)  $\pm$  EE. Las diferencias estadísticas analizadas con ANOVA. C (Control), BB (Butirato bajo; 300 mg/kg), BA (Butirato alto; 800 mg/kg), IR24 (Isquemia reperfusion 24 h), BBIR24 (Butirato bajo + IR 24 h), BAIR24 (Butirato alto + IR 24 h), IR72 (Isquemia reperfusion 72 h), BBIR72 (Butirato bajo + IR 72 h), BAIR72 (Butirato alto + IR 72 h). \*  $p < 0.05$  vs C, BB, BA, BBIR24, IR72, BBIR72 y BAIR72; \$  $p < 0.05$  vs C, BB y BA.

## 9. Discusión

El propósito de este trabajo fue determinar si la administración de un ácido graso corto es capaz de reducir el daño renal ya sea funcional o estructural y estudiar sus efectos anti-inflamatorios y antiapoptóticos.

Observamos que la administración oral de solución de butirato de sodio, aumentó las concentraciones de cuerpos cetónicos en plasma, debido a su absorción intestinal y biotransformación en el hígado a Acetil Co-A; lo que podría favorecer su conversión mediante la  $\beta$ -oxidación, a acetoacetato o  $\beta$ -hidroxibutirato que son transportados a la sangre para su utilización en tejidos extrahepáticos incluyendo al riñón (Nelson D., et al., 2009). Aunado a ello, se observó que las concentraciones de cuerpos cetónicos en orina después de administrar butirato, se mantuvieron iguales al C, debido a que se metabolizan de manera correcta. Un estudio previo realizado por Jouret F. y Cols. en el 2016, muestra que 6 h y 24 h después de una lesión renal por IR de 30 min en ratones, se inducen cambios en el metaboloma energético, ellos observaron que después de la isquemia, 6 y 24 h de reperfusión, los niveles de metabolitos urinarios como taurina, lactato y glucosa aumentan, concluyendo que la energía no se metaboliza adecuadamente en ese segmento de la nefrona (Jouret F., et al, 2016). El análisis de ANOVA mostró que el grupo IR24 no aumentó significativamente los niveles de excreción de cuerpos cetónicos; sin embargo, al realizar una prueba t-student para estos 2 grupos (resultado no mostrado) observamos que la isquemia con reperfusión de 24 h, efectivamente aumentaba la excreción de cuerpos cetónicos vs C, infiriendo un metabolismo de energía alterado de manera similar a lo mostrado anteriormente. De igual manera, al tiempo de reperfusión de 72 h observamos que la energía se metaboliza adecuadamente, ya que los niveles son significativamente mayores que el grupo C. Los grupos que recibieron una dosis previa de BuNa a IR72 mostraron una reducción en la eliminación de cuerpos cetónicos llegando hasta valores normales. Los datos anteriores sugieren que el BuNa puede estar proporcionando un efecto reparador en el metabolismo de ácidos grasos y de cuerpos cetónicos que se da principalmente en las mitocondrias (Clark A., et al., 2020). En apoyo a nuestros resultados, un estudio *in vitro* realizado por Denoon T. y Cols., 2020 demostró que la suplementación de acetoacetato en medios de crecimiento de células LLCPK1 aumenta la función mitocondrial favoreciendo el

metabolismo de este intermediario metabólico (Denoon T., et al., 2020). Adicionalmente, estas moléculas están asociadas con la reducción parcial del daño funcional en modelos de daño renal (Bishop M., 2006).

En conjunto con la medición de cuerpos cetónicos, la acumulación de grasa también fue un indicador del metabolismo en este estudio. Observamos que el daño ocasionado por isquemia inducía la acumulación de grasa en la corteza renal siendo mayor en el grupo IR72, es decir, los ácidos grasos se acumulan. En apoyo a nuestros resultados, Portilla D. y Cols., en el 2006 observó en un modelo de nefrotoxicidad por cisplatino la reducción de la oxidación de ácidos grasos (Portilla D., et al., 2006). En adición, en un estudio *in vitro* de nefropatía inducida por hipoxia, Feldkamp T. y Cols., 2006, encontró que la hipoxia promueve la acumulación de ácidos grasos no esterificados que a su vez provocan una disminución de ATP en los túbulos reoxigenados y probablemente reflejan la inhibición de la oxidación de ácidos grasos (Feldkamp T., et al., 2006). Ahora bien, el uso de los SCFAs de forma profiláctica en un modelo de lesión renal y su impacto en la acumulación de grasa, no está caracterizado, nosotros observamos que el butirato de sodio previno la acumulación de grasa en el tejido renal, siendo significativo en la IR72; teniendo en cuenta que el BuNa ha sido estudiado como un modulador del metabolismo celular (Plata C., et al., 2018) podemos inferir que el butirato de sodio desempeña un papel fundamental como regulador de la energía durante la reparación del epitelio tubular en estas condiciones (Feldkamp T., et al., 2006).

En diferentes estudios *in vivo* de nefropatía se ha demostrado que la administración de SCFAs disminuye la concentración de marcadores de daño renal como BUN y creatinina (Khan S., et al., 2014; Huang W., et al., 2020; Wei T., et al., 2014). Khan S. y Jena G., en el 2014, encontraron que al administrar una dosis de 500 mg/kg/día de butirato en roedores con nefropatía diabética por 21 días, el BUN y la creatinina disminuían significativamente con respecto a animales no diabéticos comprobando que la administración prolongada mejora la función renal (Khan S., et al., 2014). Otro estudio en el 2020 por Huang W. y Cols., mostró la reducción en los niveles de creatinina sérica, BUN y Cistatina C al administrar una dosis de butirato de sodio 100 mg/kg-cada 48 h por 12 semanas en ratones C57BL/6 con nefropatía diabética (Huang W., et al., 2020). Sin

embargo, no existe evidencia de los efectos producidos 72-240 h posteriores al daño. Nuestros resultados mostraron que la creatinina sérica aumentó más de 6 veces en el grupo IR24, comprobando nuestro modelo de daño. El tratamiento previo BB no propició la reducción de creatinina sérica, mientras que la dosis alta redujo el daño en un 30%. No obstante, en la CCr se observa que la administración butirato después de 24 h no modifica este parámetro, de igual forma con el BUN y la proteinuria, es probable que la dosis de butirato o el tiempo de administración no son suficientes para reducir estos marcadores aun cuando se han activado los mecanismos de reparación. Los SCFAs se han asociado con la reducción de la producción de toxinas urémicas relacionadas al metabolismo de urea entre ellos el BUN en la enfermedad renal crónica, es decir periodos prolongados y sostenidos de daño renal, en este proyecto, nosotros estudiamos su efecto 24 y 72 h posteriores al daño, por lo que es probable que en nuestro modelo, el tiempo de daño sea muy corto o la dosis muy baja y, por ello, no seamos capaces de observar cambios (Yu S, et al., 2020; Plata C., et al., 2018). Es importante resaltar que administramos una dosis única a nuestros animales, ya que estudios previos realizados por Plata C. y Cols., 2018 mostraron en ratones C57BL/6 que la administración prolongada del butirato de sodio al 5% en la dieta, durante 1- 4 meses incrementaban los marcadores de daño, tanto BUN como creatinina con inducción de daño estructural irreversible (Plata C., et al, 2018). Aunado a ello, Felizardo R. y Cols., en el 2014 reportaron una disminución en la proteinuria tras la suplementación al 15% de BuNa unido a fibra en la dieta durante 8 semanas en un modelo de nefropatía por adriamicina en roedores, comprobando su efecto protector en un modelo de daño renal crónico (Felizardo R., et al., 2014). Resultados similares se observaron en un estudio realizado en el 2020 por Li Y. y Cols., en donde la administración conjunta de SCFAs y fibra dietética en animales con nefropatía diabética, durante 3 semanas, redujo los niveles de albuminuria (Li Y., et al., 2020), cabe mencionar que nuestro modelo es daño transitorio y de corta duración y es probable que los efectos observados en los modelos de daño crónico se deban a la mejora de la barrera de filtración al tiempo de administración y dosis, sin embargo en este modelo la presencia de la proteinuria está dada por la disfunción tubular. Lo anterior se comprueba en los animales con IR72 pues presentan una proteinuria menor en el grupo IR24, demostrando menor daño debido a la reparación

del tejido renal, este efecto no fue aditivo por la administración de BBIR72 y BAIR72, por lo que, nuestros resultados sugieren que el butirato de sodio no revierte la descamación epitelial a las 24 h post isquemia, y no tiene un efecto aditivo a la velocidad de reparación. Sería conveniente su estudio a las 48 h post insulto para clarificar su papel en la excreción urinaria de proteínas.

Por otro lado, durante la hipoxia, las células renales sufren depleción de oxígeno y ATP, ocasionando que los niveles de ROS aumentan. Está descrito que, en un estado fisiológico normal, las ROS se producen en bajas concentraciones, ya que son fundamentales para mantener el balance óxido reducción que promueve la supervivencia celular, la proliferación y el crecimiento (Ratliff B., et al., 2016; Gyurászová M., et al., 2020; Piko N., et al., 2023). Ratliff B. y Cols, 2016 mencionan que las ROS en el riñón se pueden generar a partir de dos rutas, de la NADPH oxidasa o por la actividad de las mitocondrias y se puede potenciar por diversos estímulos como la expresión de moléculas de inflamación, niveles altos de glucosa, etc (Ratliff B., et al., 2016). La gran cantidad de mitocondrias contenidas en las células del túbulo proximal propicia que éstas sean más susceptibles al estrés oxidante (Gyurászová M, 2020). Un estudio *in vivo* realizado por Hall A., et al., 2013 muestra que la NADH mitocondrial aumenta en los riñones de rata en respuesta a la isquemia, asimismo el potencial de membrana se altera y las mitocondrias en los túbulos proximales cambian su forma, acortándose y fragmentándose, concluyendo que la disfunción mitocondrial durante la LRA, provoca un aumento de ROS (Pavlakou P., et al., 2017). En este trabajo cuantificamos el peróxido de hidrógeno urinario ( $H_2O_2$ ) como indicador de estrés oxidante y encontramos que tras la IR24 la concentración de  $H_2O_2$  aumentó significativamente vs C, posiblemente asociado a daño a las mitocondrias. Aunado a ello Rashid H. y Cols., 2024 menciona que durante el tiempo de reperfusión se producen niveles elevados de ROS debido a que en las mitocondrias afectadas se reintroduce oxígeno (Rashid H., et al., 2024). Weinberg J. y Cols., 2000 realizaron un estudio en donde se evaluó la disfunción mitocondrial durante la hipoxia y re-oxigenación en túbulos proximales de riñón de conejo, y encontraron que la variación en el tiempo de hipoxia afectaba los niveles de ATP (Weinberg J., et al., 2000). Los resultados anteriores sugieren que la producción de ROS durante la reperfusión varía de acuerdo al tiempo expuesto al daño por hipoxia;

además de que, estos valores se han determinado durante los primeros minutos de reperfusión; en el presente estudio evaluamos la concentración de  $H_2O_2$  72 h posteriores a 30 min de daño y encontramos que éstas disminuyeron vs IR24. En el 2017 Huang W. y Cols., realizaron la evaluación del efecto en el estrés oxidativo de SCFAs en células mesangiales glomerulares de ratón inducidas con altos niveles de glucosa y lipopolisacáridos y encontró que la administración de 5 mM de butirato de sodio redujo el estrés oxidativo, disminuyendo la cantidad de ROS y el marcador oxidativo malonaldehído (MDA) y aumentando las concentraciones de la enzima antioxidante superóxido dismutasa (SOD) (Huang W., et al., 2017). En adición, se ha demostrado que la SOD aumenta y el MDA disminuye su expresión en modelos de nefrotoxicidad aguda por insecticidas al administrar previamente  $\beta$ -hidroxibutirato (Wei T., et al., 2014). Nuestros resultados mostraron que ambas dosis no fueron capaces de reducir el estrés oxidante esto puede deberse a que los cambios en los estudios anteriores se observan en un linaje de células distinto con funciones diferentes. Por otro lado, es incluso posible que el peróxido esté involucrado en procesos reparadores ya que Chen J. y Cols., 2019 investigaron, en un modelo de nefropatía inducida por gentamicina en pez cebra, el efecto del peróxido de hidrógeno en la recuperación de la LRA y encontraron que durante el periodo de reparación se produjo  $H_2O_2$  en los túbulos proximales y distales, además de que la inhibición de la producción de  $H_2O_2$  inducía mayor daño en los túbulos renales; los autores concluyeron que el  $H_2O_2$  desempeña un papel dual como protector de la reparación y regeneración renal (Chen J., et al., 2019). Considerando lo referido, es probable que, en nuestro estudio, la medición de  $H_2O_2$  nos dé más información sobre el estado de reparación, ya que los niveles no se modificaron en los grupos con BBIR24 y BAIR24 cuando hay mayor daño y a las 72 h cuando se activan los procesos de reparación.

En el momento en que las células renales sufren daño agudo, se expresan diversos marcadores de daño celular a nivel tubular; entre ellos, NGAL misma que es un marcador que presenta elevación en su concentración urinaria dentro de las primeras 2-6 h posteriores al daño (Carrillo ER, 2016). Arifin A. y Cols., 2024 en un estudio para dilucidar los efectos del secretoma de células madre mesenquimales durante la LRA por sepsis en ratones, observaron, que los niveles de NGAL excretados en orina (NGALu) en el

grupo de LRA eran mayores en comparación con su grupo control (Arifin A et al., 2024). También, Bagshaw S. y Cols., en el 2010 realizaron un estudio en donde evaluaron la concentración de NGAL urinaria a las 12, 24 y 48 h posteriores a la inducción de LRA séptica y no séptica y encontraron que NGALu a las 12 h era significativamente mayor vs al grupo de LRA no séptica (Bagshaw S., et al., 2010). Nuestros resultados muestran que tras 24 h producida la isquemia, los valores de NGAL en orina no generaron cambios respecto al control. Es posible que, en nuestro estudio, no veamos un aumento significativo de NGAL a las 24 h de reperusión, debido al modelo de daño que utilizamos o que el tiempo de isquemia no fue suficiente o que este marcador no es tan sensible, sin embargo, previamente mostramos que 20 min de IR fue capaz de aumentar marcadores más tempranos como la molécula de daño renal 1 (Kim-1) (Ramírez V., et al., 2009; Vaidya V., et al., 2010). Por el contrario, a las 72 h transcurrida la isquemia, observamos que el daño tubular determinado por NGAL, fue significativamente mayor vs C. En apoyo a nuestros resultados Mishra J. y Cols., 2004 observaron en un modelo de nefropatía por cisplatino, que tras la administración de 20 mg/kg de cisplatino, los niveles de NGALu tenían un pico a las 48 h y se mantenían persistentemente positivos hasta las 96 h. Es posible que estos resultados estén vinculados con que NGAL puede ser expresados por el túbulo para inducir la re-epitelización (Mishra J., et al., 2004; Yang J., et al., 2003). Por otro lado, la administración de BuNa en dosis alta, previno el daño tubular en las ratas con isquemia tanto en 24 h como en 72 h de reperusión, obteniendo resultados similares a Liu Y. y Cols., 2021 donde, en ratones con LRA inducida con ácido fólico evaluaron la suplementación profiláctica con dieta alta en fibra (HFD) y SCFAs (100 mM butirato-150 mM acetato/propionato) durante 2 semanas. Observaron que los SCFAs +HFD redujo la creatinina, la urea y el daño tubular 48 h posteriores al insulto (Liu Y., et al., 2021). Vaidya V. y Cols., 2008 describieron que esta disfunción tubular es resultante del daño estructural ocasionado por la LRA, caracterizado por la pérdida del borde en cepillo, de las uniones estrechas, la formación de cilindros y el aumento tanto de luz tubular como del espacio intersticial (Vaidya V., et al., 2008; Asif S., et al., 2011). Observamos que el BuNa redujo el daño estructural ocasionado por la isquemia, mostrando efectos similares en el túbulo proximal a los encontrados por Chen G. y Cols., 2018 en la barrera epitelial, en su estudio observaron que la administración previa de 5

g/L de BuNa en agua durante 6 semanas mantenía las uniones estrechas y mejoraba la disfunción de la barrera del epitelio intestinal en ratones con colitis inducida por ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBS) mediado por la activación del receptor GPR109A (Chen G., et al., 2018). Estos resultados sugieren que la activación receptores acoplados a proteínas G en el riñón como son GPR41, GPR43 (Li Y., et al., 2020), o de los transportadores del butirato de sodio MCT-1, MCT-2, SMCT-1, SMCT-2 (Dave R., et al., 2015; Iwanaga T., et al., 2006) podrían ser los responsables de sus efectos renoprotectores observados en este trabajo; sin embargo, será necesario realizar más estudios.

La isquemia induce el daño estructural parcialmente mediado por la disfunción endotelial, en condiciones de estrés, se expresan moléculas de adhesión en la superficie del endotelio, lo que lleva al reclutamiento de leucocitos y moléculas inflamatorias (Asif S., et al., 2011; Jourde-Chiche N, 2019). Los biomarcadores asociados a la inflamación incluyen desde citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10) hasta factores como el factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ) y el factor nuclear kB (NF-kB). En este estudio evaluamos la inflamación mediada por IL-1 $\beta$  y comprobamos que la isquemia inducía el aumento de esta citocina, así como, que los tratamientos con IR+butirato de sodio no reducían significativamente la presencia de IL-1 $\beta$ . Sin embargo, trabajos recientes han mostrado que los SCFAs son capaces de reducir la inflamación; por ejemplo, en el 2017, Huang W. y Cols., mostraron una disminución significativa de IL-1 $\beta$  y NF-kB tras la administración de 5mM de BuNa en células mesangiales glomerulares de ratón inducidas con altos niveles de glucosa y lipopolisacárido (Huang W., et al., 2017). Un estudio adicional por Tedelind S., y Cols., 2007 en cultivos primarios de colonocitos de ratón establecidos a partir de ratones con colon inflamado demostró que la administración de acetato, propionato y butirato a 30 mmol/L disminuían la liberación de TNF $\alpha$  e IL-6, e inhibían la actividad de NFkB (Tedelind S., et al., 2007). No obstante, nuestros resultados demostraron que la administración de BuNa en cualquier dosis no reduce la inflamación mediada por IL-1 $\beta$ , es probable que veamos reducción de otros marcadores inflamatorios, por lo que, será interesante estudiar otras citocinas o moléculas inflamatorias asociadas con los SCFAs y la LRA como son MCP1, NF-kB, TNF $\alpha$ , IL6, entre otras (Huang W., et al., 2017; Li Y., et al., 2020).

Un paso sustancial en el proceso de inflamación, es la adhesión y migración de leucocitos por el endotelio que se da gracias a la expresión de moléculas de adhesión celular como VCAM. Sin embargo, se ha demostrado que VCAM se puede expresar en las células del epitelio tubular en presencia de daño renal involucradas en procesos de inflamación y reparación celular (Contreras F., et al., 2008). Como se esperaba, los grupos a los que se les causó isquemia, IR24 e IR72, mostraron una alta tinción de VCAM en la corteza renal. De igual manera, observamos tinción positiva de VCAM en los grupos BB y BA, y es que se sabe que las moléculas de adhesión endoteliales se activan en respuesta a la presencia de lípidos en el tejido cardíaco (Contreras F., et al., 2008; Obregón O., et al., 2007). Un estudio en el 2009 por Zapolska-Downar D. y Cols., hecho en células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) estimuladas con TNF- $\alpha$  demostró que la adición de propionato (0.1, 1.0 o 10.0 mM) previo a la inducción con citocinas durante 30 min, 12 o 24 h inhibía significativamente la expresión de VCAM-1 e ICAM-1 de manera dosis y tiempo dependiente (Zapolska-Downar D., et al., 2009). Sin embargo, estos resultados se realizaron en células endoteliales, y poco se sabe sobre la expresión de VCAM determinada por la administración de SCFAs en células epiteliales; en este estudio encontramos que el BuNa antes de la LRA no tiene efectos sobre la presencia de VCAM-1 en la corteza renal. Aunque, los grupos BBIR72 y BAIR72 mostraron una tendencia (no significativa) a disminuir vs IR72, lo que nos podría indicar que, una vez que las células están regenerándose, VCAM-1 reduce su expresión en células epiteliales.

Por otro lado, la lesión renal isquémica se ha asociado con la apoptosis de células tubulares (Kaushal G., et al., 2004). En un modelo de lesión renal por IR en ratas Chien CT. y Cols., 2001, demostró que la apoptosis tubular es dependiente del tiempo de lesión, mientras más tiempo de isquemia, mayor índice de apoptosis; de igual manera, observaron que el tiempo de reperfusión también influía en el índice de apoptosis, encontrando que el número de células apoptóticas en isquemia de 45 y 60 min, aumentó a las 4 h de reperfusión y que a las 10 h y 24 h de reperfusión no se encontraron células apoptóticas aparentes (Chien CT., et al., 2001). En nuestro modelo encontramos un comportamiento similar, en donde con una isquemia de 30 min, tras 24 h de reperfusión el índice apoptótico aumentó significativamente contra los grupos controles y a las 72 h de reperfusión no se encontraron células TUNEL positivas, probablemente debido a la

eliminación natural de las células muertas (Chien CT., et al., 2001). Observamos que la dosis baja de butirato de sodio previa a IR24 disminuyó el índice de apoptosis, apoyando a los resultados plasmados por Du Y. y Cols., 2020, en donde en un modelo de nefropatía diabética en ratones, encontraron que el BuNa 0.5 mM durante 48 h previene la apoptosis de células renales comparados con el grupo de nefropatía diabética (Du Y., et al., 2020). Por el contrario, sorprendentemente, nuestros resultados mostraron que el tratamiento BAIR24 indujo significativamente el aumento de células apoptóticas. Estos resultados tienen una posible explicación y es que se ha demostrado que el butirato de sodio actúa como inhibidor de la proliferación celular e inductor de la apoptosis en células cancerosas principalmente por su acción inhibidora de las deacetilasas de histonas (HDAC) y por su efecto a través de la vía mitocondrial, en donde tras la adición de butirato, se da la disminución de las proteínas antiapoptóticas Bcl-xl y Bcl-2 y el aumento de las proteínas proapoptóticas Bax y Bak (Chen J., et al., 2019; Du Y., et al., 2020; Leonel A., et al., 2012). Clarke J. y Cols., 2012, demostraron que la ingesta de almidones suplementados con tributirina (3 y 10%) por dos semanas previa a una exposición aguda a un agente carcinógeno genotóxico azoximetano aumentó la cantidad de células apoptóticas en el epitelio del colon distal de la rata al inhibir la actividad de las HDAC, y participando en vías intrínsecas y extrínsecas de la apoptosis (Clarke J., et al., 2012). En este sentido, es posible que en nuestro grupo BAIR24 el ácido graso promueva la apoptosis por la cantidad de daño que presentan las células renales en este modelo. No observamos cambios en los niveles de apoptosis en los grupos de BBIR72 y BAIR72, esta respuesta podría estar asociada con la característica que le atribuye, Bailón E. y Cols., 2010 al butirato, sobre que este SCFA sólo es capaz de modificar apoptosis en células dañadas; aquí observamos que, a las 72 h, los mecanismos de reparación ya están activos, lo que favorece la disminución del daño y por lo tanto la reducción de la apoptosis (Bailón E., et al., 2010). Además, también se ha demostrado que el butirato actúa como inhibidor de la acumulación de p53 lo que permite la regulación de la muerte y proliferación celular (Emenaker, N., et al., 2001)

## 10. Conclusiones

Nuestros resultados sugieren que el butirato de sodio administrado de manera profiláctica en un modelo de IR de 30 min en dosis de 800 mg/kg reduce parcialmente el daño funcional tras la LRA determinado por reducción de la CrS y el marcador de daño tubular NGAL. La administración previa de butirato a ambas dosis, disminuyó el área de daño 24 h posteriores a la lesión. Observamos que la dosis de BA favorece la reparación del epitelio tubular y reduce la expresión de VCAM-1 en las células epiteliales a las 72 h post insulto, sugiriendo que los SCFAs podrían tener un papel importante al preservar y reparar el tejido renal bajo estas condiciones de daño. La protección estructural renal del BuNa no se asoció con reducción de IL-1 $\beta$ . Sin embargo, observamos que el butirato ejerce cambios en la apoptosis con variación respecto al tiempo de reperfusión y a la dosis administrada.

Los datos obtenidos hasta el momento muestran claramente que se reduce parcialmente el daño funcional, aún con la presencia de daño a las 24 y 72 h hay mejor preservación del tejido renal, por lo que es probable que el tejido se regenere tempranamente o que la adición de butirato previo al daño evite por tiempo prolongado el uso de glucosa, podemos inferir que la célula del epitelio tubular a las 72 h en los grupos con butirato, están empleando su fuente energética primordial pues se reduce significativamente la acumulación de grasa en los grupos con dosis baja y alta. Para conocer exactamente los mecanismos involucrados, serán necesarios más experimentos que incluyan el estudio de otras proteínas inflamatorias, así como cambios en la expresión de las proteínas que median el transporte y la señalización de los SCFAs. Estos resultados, entonces, podrían mostrar la asociación con los resultados observados en este modelo con la finalidad de encontrar un método terapéutico efectivo para tratar o prevenir la LRA.

## 11. Referencias

1. Abbas A., et.al. (2021) Cellular and Molecular Immunology. 10th Edition ISBN: 9780323757485.
2. Adler S, Brady H. (2016). Cell adhesion molecules and the glomerulopathies. *Am J Med.* 1999;107:371–386.
3. Agudelo O, Gloria M., Giraldo G, Nubia A., BarreraC, Carlos J., & Valdés D, Beatriz E. (2017) Microbiota intestinal y ácidos grasos de cadena corta en pacientes críticos. *Perspectivas en Nutrición Humana*, 18(2), 205-222.
4. Aho V, Houser MC, Pereira PAB, Chang J, Rudi K, Paulin L, Hertzberg V, Auvinen P, Tansey MG, Scheperjans F. (2021) Relationships of gut microbiota, short-chain fatty acids, inflammation, and the gut barrier in Parkinson's disease. *Mol Neurodegener.* Feb 8;16(1):6. doi: 10.1186/s13024-021-00427-6. PMID: 33557896; PMCID: PMC7869249.
5. Akcay, A., Nguyen, Q. & Edelstein, C. L. (2009). Mediators of inflammation in acute kidney injury. *Mediators Inflamm.* 2009, 137072.
6. Al-Harbi, N. O. et al. (2018) Short chain fatty acid, acetate ameliorates sepsis-induced acute kidney injury by inhibition of NADPH oxidase signaling in T cells. *Int Immunopharmacol* 58, 24-31, doi:10.1016/j.intimp.2018.02.023.
7. Amarasiri SS, Attanayake AP, Arawwawala LDAM, Mudduwa LKB, Jayatilaka KAPW. (2023) Barleria prionitis L. extracts ameliorate doxorubicin-induced acute kidney injury via modulation of oxidative stress, inflammation, and apoptosis. *J Tradit Complement Med.* May 31;13(5):500-510. doi: 10.1016/j.jtcme.2023.05.007. PMID: 37693098; PMCID: PMC10491988.
8. Aranalde G. (2015) *Fisiología Renal*. 1era ed. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Corpus Libros Médicos y Científicos.
9. Arifin A, Purwanto B, Indarto D, Wasita B, Sumanjar T, Pamungkasari EP, Soetrisno S. (2024) Improvement of renal functions in mice with septic acute kidney injury using secretome of mesenchymal stem cells. *Saudi J Biol Sci.* 2024 Mar;31(3):103931. doi: 10.1016/j.sjbs.2024.103931. Epub 2024 Jan 13. PMID: 38304542; PMCID: PMC10831246.
10. Asif S, Molitoris, B. A. (2011). Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Nature Reviews Nephology*, 7(4), 189–200. doi:10.1038/nrneph.2011.16.
11. Bagshaw SM, Bennett M, Haase M, Haase-Fielitz A, Egi M, Morimatsu H, D'amico G, Goldsmith D, Devarajan P, Bellomo R. (2010) Plasma and urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin in septic versus non-septic acute kidney injury in critical illness. *Intensive Care Med.* 2010 Mar;36(3):452-61. doi: 10.1007/s00134-009-1724-9. Epub 2009 Dec 3. PMID: 19956924.
12. Bailón E, Cueto-Sola M, Utrilla P, Rodríguez-Cabezas ME, Garrido-Mesa N, Zarzuelo A, Xaus J, Gálvez J, Comalada M. (2010) Butyrate in vitro immune-modulatory effects might be mediated through a proliferation-related induction of apoptosis. *Immunobiology.* 2010 Nov;215(11):863-73. doi: 10.1016/j.imbio.2010.01.001. Epub 2010 Jan 13. PMID: 20149475.
13. Barrera-Chimal, J. et al. (2019) Delayed spironolactone administration prevents the transition from acute kidney injury to chronic kidney disease through improving renal inflammation. *Nephrol Dial Transplant* 34, 794-801, doi:10.1093/ndt/gfy246.
14. Bellomo R. (2002) Bench-to bedside review: lactate and the kidney. *Crit Care.* 2002 Aug;6(4):322-6. doi: 10.1186/cc1518. Epub 2002 Jun 7. PMID: 12225607; PMCID: PMC137458.
15. Bishop M (2006). *Química clínica* 5ta edición Mc Graw Hill.
16. Bolignano D, Coppolino G, Campo S, Aloisi C, Nicocia G, Frisina N, Buemi M. (2007) Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is associated with severity of renal disease in proteinuric patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2008 Jan;23(1):414-6. doi: 10.1093/ndt/gfm541. Epub 2007 Sep 24. PMID: 17893105.
17. Bonventre, J. V., & Yang, L. (2011). Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Journal of Clinical Investigation*, 121(11), 4210–4221. doi:10.1172/jci45161.
18. Boron W. y Boulpaep E. (2017) *Fisiología médica* 3ra edición. Elsevier España, S.L.U. ISBN:978-84-9113-125-0.
19. Brandan N, et.al. (2014) Interrelaciones metabólicas: Interrelaciones metabólicas entre tejidos especializados. *Ciclo Ayuno-Alimentación. Interrelaciones metabólicas en estados fisiológicos y patológicos.* Universidad Nacional de Nordeste <https://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/Carrera-Medicina/BIOQUIMICA/interrelaciones.pdf>

20. Campbell, MK y Shawn O.F. (2004) *Bioquímica* 4ta ed. Thompson Editores S.A. de C.V. ISBN 970-686-335-4.
21. Campuzano M, Arbeláez G, Gómez M (2007) El Uroanálisis: Un gran aliado del médico *Revista Urología Colombiana*, vol. XVI, núm. 1, abril, 2007, pp. 67-92 Sociedad Colombiana de Urología.
22. Carracedo J, Ramírez R.(2020) *Fisiología Renal*.En: Lorenzo V., López Gómez JM (Eds). *Nefrología al día*. ISSN: 2659-2606. Disponible en: <https://www.nefrologiaaldia.org/335>.
23. Carrillo ER et al. (2016) Lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos urinaria como biomarcador temprano de lesión renal aguda grave en Cuidados Intensivos. *Rev Asoc Mex Med Crit y Ter Int* 2016;30(1):10-16.
24. Carrillo ER et.al. (2014) Biomarcadores de lesión renal aguda: la lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL) *Rev Invest Med Sur Mex*, Enero-Marzo 2014; 21 (1): 14-18
25. Castaño Bilbao I. et.al. (2009) Estudios de función renal; función glomerular y tubular. *Análisis de la orina. NefroPlus*, 2(1):17-30.
26. Chen G, Ran X, Li B, Li Y, He D, Huang B, Fu S, Liu J, Wang W. (2018) Sodium Butyrate Inhibits Inflammation and Maintains Epithelium Barrier Integrity in a TNBS-induced Inflammatory Bowel Disease Mice Model. *EBioMedicine*. 2018 Apr;30:317-325. doi: 10.1016/j.ebiom.2018.03.030. Epub 2018 Mar 28. PMID: 29627390; PMCID: PMC5952406.
27. Chen Y, Fry BC, Layton AT. (2017) Modeling glucose metabolism and lactate production in the kidney. *Math Biosci*. 2017 Jul;289:116-129. doi: 10.1016/j.mbs.2017.04.008. Epub 2017 May 8. PMID: 28495544; PMCID: PMC5533195.
28. Chen, J., Yu, T., He, X., Fu, Y., Dai, L., Wang, B., Liu, C. (2019). Dual roles of hydrogen peroxide in promoting zebrafish renal repair and regeneration. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. doi:10.1016/j.bbrc.2019.06.052.
29. Chen J, Zhao KN, Vitetta L. (2019) Effects of Intestinal Microbial-Elaborated Butyrate on Oncogenic Signaling Pathways. *Nutrients*. 2019 May 7;11(5):1026. doi: 10.3390/nu11051026. PMID: 31067776; PMCID: PMC6566851.
30. Chien CT, Lee PH, Chen CF, Ma MC, Lai MK, Hsu SM. (2001) De novo demonstration and co-localization of free-radical production and apoptosis formation in rat kidney subjected to ischemia/reperfusion. *J Am Soc Nephrol*. 2001 May;12(5):973-982. doi: 10.1681/ASN.V125973. PMID: 11316856.
31. Chiett, S. et al. (2019) Prominent action of butyrate over  $\beta$ -hydroxybutyrate as histone deacetylase inhibitor, transcriptional modulator and anti-inflammatory molecule. *Scientific Reports* 9, 742, doi:10.1038/s41598-018-36941-9.
32. Cigarran GS., González PE., & Cases AA. (2017). Microbiota intestinal en la enfermedad renal crónica. *Nefrología*, 37(1), 9–19. doi:10.1016/j.nefro.2016.05.008.
33. Clark AJ. and Parikh SM. (2020) Mitochondrial Metabolismo in Acute Kidney Injury. *Seminars in Nephrology*, 40 (2), 101-113. Doi:10.1016/j.semnephrol.2020.
34. Clarke JM, Young GP, Topping DL, Bird AR, Cobiac L, Scherer BL, Winkler JG, Lockett TJ. Butyrate delivered by butyrylated starch increases distal colonic epithelial apoptosis in carcinogen-treated rats. *Carcinogenesis*. 2012 Jan;33(1):197-202. doi: 10.1093/carcin/bgr254. Epub 2011 Nov 10. PMID: 22080572; PMCID: PMC3276328.
35. Contreras F, et.al. (2008) Evaluación de un marcador de inflamación vascular VCAM-1 en una población normal, con diabetes tipo 2 y con hipertensión. *Revista Latinoamericana de Hipertensión*. Vol. 3 Nº 7, ISSN: 1856-4550.
36. Dave, R. A. & Morris, M. E. (2015) Semi-mechanistic kidney model incorporating physiologically-relevant fluid reabsorption and transporter-mediated renal reabsorption: pharmacokinetics of gamma-hydroxybutyric acid and L-lactate in rats. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 42, 497-513, doi:10.1007/s10928-015-9441-1.
37. de Dios Soler, M (2018) *Guía de inmunohistoquímica para técnicos / Marcela de Dios Soler; Gabriela Acosta Haab. - 1a ed. - Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Instituto Nacional del Cáncer, 2018. Libro digital, PDF/A Archivo Digital: descarga y online ISBN 978-987-3945-59-5.*
38. Denoon, T., Sunilkumar, S. & Ford, S. M.(2020) Acetoacetate enhances oxidative metabolism and response to toxicants of cultured kidney cells. *Toxicology Letters* 323, 19-24, doi:<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.01.015>.
39. Díaz de León-Ponce M.A., Briones-Garduño J.C., Carrillo-Esper R., Moreno-Santillán A., Pérez-Calatayud A. (2017) Insuficiencia renal aguda (IRA) clasificación, fisiopatología, histopatología, cuadro clínico

- diagnóstico y tratamiento una versión lógica. *Revista Mexicana de Anestesiología*. Volumen 40, No. 4, octubre-diciembre.
40. Du Y, Tang G, Yuan W. (2020) Suppression of HDAC2 by sodium butyrate alleviates apoptosis of kidney cells in db/db mice and HG-induced NRK-52E cells. *Int J Mol Med*. 2020 Jan;45(1):210-222. doi: 10.3892/ijmm.2019.4397. Epub 2019 Nov 6. PMID: 31746362; PMCID: PMC6889930.
  41. Edelstein, L. C., Lagos, L., Simmons, M., Tirumalai, H. & Gélinas, C. (2003) NF- $\kappa$ B-dependent assembly of an enhanceosome-like complex on the promoter region of apoptosis inhibitor Bfl-1/A1. *Mol. Cell. Biol.* 23, 2749–2761.
  42. Emenaker, N. J., Calaf, G. M., Cox, D., Basson, M. D., & Qureshi, N. (2001). Short-Chain Fatty Acids Inhibit Invasive Human Colon Cancer by Modulating uPA, TIMP-1, TIMP-2, Mutant p53, Bcl-2, Bax, p21 and PCNA Protein Expression in an In Vitro Cell Culture Model. *The Journal of Nutrition*, 131(11), 3041S–3046S. doi:10.1093/jn/131.11.3041s.
  43. Escalante-Gomez, et.al. (2007) Proteinuria, fisiología y fisiopatología aplicada. *Acta Médica Costariicense*, 49(2), 83-89. ISSN 0001-6012.
  44. Feldkamp T, Kribben A, Roeser NF, Senter RA, Weinberg JM.(2006) Accumulation of nonesterified fatty acids causes the sustained energetic deficit in kidney proximal tubules after hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006 Feb;290(2):F465-77. doi: 10.1152/ajprenal.00305.2005. Epub 2005 Sep 13. PMID: 16159894.
  45. Felizardo, R. J. F. et al. (2019) Gut microbial metabolite butyrate protects against proteinuric kidney disease through epigenetic- and GPR109a-mediated mechanisms. *FASEB J* 33, 11894-11908, doi:10.1096/fj.201901080R.
  46. Fernández L, Miosotis de L ; Mederos Pérez, I ; Alonso L; Rego J; Varela I; Díaz C ; Contreras T (2016) Morphometry of histological sections of normal renal tubules in adult humans. *Revista Argentina de Anatomía Online* 2016, Vol. VII, N° 1, pp. 13 – 19.
  47. Fontecha-Barriuso, M.; Lopez-Diaz, A.M.; Guerrero-Mauvecin, J.; Miguel, V.; Ramos, A.M.; Sanchez-Niño, M.D.; Ruiz-Ortega, M.; Ortiz, A.; Sanz, A.B. (2022) Tubular Mitochondrial Dysfunction, Oxidative Stress, and Progression of Chronic Kidney Disease. *Antioxidants* 2022,11,1356. <https://doi.org/10.3390/antiox11071356>.
  48. Frank, H. et al. (2008) Lactaturia and loss of sodium-dependent lactate uptake in the colon of SLC5A8-deficient mice. *The Journal of biological chemistry* 283, 24729-24737, doi:10.1074/jbc.M802681200.
  49. Fransen, M., Lismont, C., and Walton, P. (2017). The Peroxisome-Mitochondria Connection: How and Why? *Int. J. Mol. Sci.* 18. 1126. doi:10.3390/ijms18061126.
  50. Gaínza de los Ríos FJ. (2023) Insuficiencia Renal Aguda. En: Lorenzo V., López Gómez JM (Eds). *Nefrología al día*. ISSN: 2659-2606. Disponible en: <https://www.nefrologiaaldia.org/317>.
  51. Galli, F. et al. (2005) Oxidative stress and reactive oxygen species. *Contrib. Nephrol.* 149, 240–260
  52. Galliano S.(2024) Guía de trabajo práctico: Sistema urinario: túbulo renales. Escuela de Medicina Instituto de Investigaciones. Instituto Universitario CEMIC. Repositorio febrero 2024. Recuperado de: <https://www.cemic.edu.ar/descargas/repositorio/2guia%207%20tubulos%20renales.pdf>.
  53. Ganapathy, V. et al. (2008) Sodium-coupled monocarboxylate transporters in normal tissues and in cancer. *AAPS J* 10, 193-199, doi:10.1208/s12248-008-9022-y.
  54. Gao Z and Chen X (2022) Fatty Acid  $\beta$ - Oxidation in Kidney Diseases: Perspectives on Pathophysiological Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Front. Pharmacol.* 13:805281. doi: 10.3389/fphar.2022.805281.
  55. García M y Vecino E. (2003) Vías de señalización intracelular que conducen a la apoptosis de las células de la retina. *Archivos de la sociedad Española de Oftalmología*, 78 (7), 351-364.
  56. Gartner L, Hiatt J, (2008) *Texto Atlas de Histología*, 3ª Ed, México, Mc. Graw Hill – Interamericana.
  57. Güler MC, Akpınar E, Tanyeli A, Çomaklı S, Bayir Y. (2023) Costunolide prevents renal ischemia-reperfusion injury in rats by reducing autophagy, apoptosis, inflammation, and DNA damage. *Iran J Basic Med Sci.* 2023;26(10):1168-1176. doi: 10.22038/IJBMS.2023.71779.15596. PMID: 37736519; PMCID: PMC10510491.
  58. Gupta, A., Williams, M. D., Macias, W. L., Molitoris, B. A. & Grinnell, B. W. (2009) Activated protein C and acute kidney injury: selective targeting of PAR-1. *Curr. Drug Targets* 10, 1212–1226.
  59. Hall J. (2011) *Guyton y Hall Tratado de fisiología médica*. Elseiver. 12ª edición <http://www.untumbes.edu.pe/bmedicina/libros/Libros10/libro125.pdf>.
  60. Gyurászová M, Gurecká R, Bábíčková J, Tóthová Ľ.(2020) Oxidative Stress in the Pathophysiology of Kidney Disease: Implications for Noninvasive Monitoring and Identification of Biomarkers. *Oxid Med Cell*

- Longev. 2020 Jan 23;2020:5478708. doi: 10.1155/2020/5478708. PMID: 32082479; PMCID: PMC7007944.
61. Hall A.M., Seigneux S. (2022) Metabolic mechanisms of acute proximal tubular injury. *Pflugers Archiv. European Journal of Physiology* 474:813-827, doi.org/10.1007/s00424-022-02701-y.
  62. Hall AM, Rhodes GJ, Sandoval RM, Corridon PR, Molitoris BA.(2013) In vivo multiphoton imaging of mitochondrial structure and function during acute kidney injury. *Kidney Int.* 2013 Jan;83(1):72-83. doi: 10.1038/ki.2012.328. Epub 2012 Sep 19. PMID: 22992467; PMCID: PMC4136483.
  63. Han P., X. Zhou, N. Chang, C. Xiao, S. Yan, H. Ren, X. Yang, M. Zhang, Q. Wu, B. Tang, J. Diao, X. Zhu, C. Zhang, C. Li, H. Cheng, J. Xiong, (2014) Hydrogen peroxide primes heart regeneration with a derepression mechanism, *Cell Res.* 24, 1091e1107.
  64. Hemstreet G. (1998) *Enciclopedia de Salud y seguridad en el trabajo. Cap. Sistemas renal y urinario.* Editorial Chantal Dufresne, BA. 4ta ed.
  65. Hernández LF. (2017) *Estrés oxidante en Fundamentos de Toxicología para QFB, UNAM.* ISBN: 978-607-02-9781-6.
  66. Hoppensack A, Chistian C. Kazanecki D, Colter A, Gosiewska J, Schanz H, Walles K, Schenke-Layland. (2014) A Human In Vitro Model That Mimics the Renal Proximal Tubule. *TISSUE ENGINEERING: Part C* Volume 20, Number 7, 2014<sup>a</sup> Mary Ann Liebert, Inc. DOI: 10.1089/ten.tec.2013.0446.
  67. Huang, W., Man, Y., Gao, C., Zhou, L., Gu, J., Xu, H., et al. (2020). Short-chain fatty acids ameliorate diabetic nephropathy via GPR43-mediated inhibition of oxidative stress and NF- $\kappa$ B signaling. *Oxidative Med. Cell. Longev.* 2020, 4074832–4074821. doi: 10.1155/2020/4074832.
  68. Iwanaga T, Takebe K, Kato I, Karaki S-I, Kuwahara A. (2006) Cellular expression of monocarboxylate transporters (MCT) in the digestive tract of the mouse, rat, and humans, with special reference to slc5a8. *Biomed Res.* 2006;27:243-54. DOI: 10.2220/biomedres.27.243.
  69. Jordan J. (2003) Apoptosis: muerte celular programada. *Rev Offarm Vol.* 22. Núm. 6.
  70. Jourde-Chiche N, Fakhouri F., Dou L., Bellien J., et.al. (2019) Endothelium structure and function in kidney health and disease. *NEphology.* vol 15 <https://doi.org/10.1038/s41581-018-0098-z>.
  71. Jouret, F. et al (2016) Nuclear Magnetic Resonance Metabolomic Profiling of Mouse Kidney, Urine and Serum Following Renal Ischemia/Reperfusion Injury. *PloS one* 11, e0163021, doi:10.1371/journal.pone.0163021.
  72. Jouret, F., Leenders, J., Poma, L., Defraigne, J.-O., Krzesinski, J.-M., & de Tullio, P. (2016). Nuclear Magnetic Resonance Metabolomic Profiling of Mouse Kidney, Urine and Serum Following Renal Ischemia/Reperfusion Injury. *PLOS ONE*, 11(9), e0163021. doi:10.1371/journal.pone.0163021.
  73. Kaczmarczyk MM, Miller MJ, Freund GG. (2012) The health benefits of dietary fiber: beyond the usual suspects of type 2 diabetes mellitus, cardiovascular disease and colon cancer. *Metabolism.* 2012 Aug;61(8):1058-66. doi: 10.1016/j.metabol.2012.01.017. Epub 2012 Mar 7. PMID: 22401879; PMCID: PMC3399949.
  74. Kadkhodae, M., Hanson, G. R., Towner, R. A., & Endre, Z. H. (1996). Detection of Hydroxyl and Carbon-Centred Radicals by EPR Spectroscopy after Ischaemia and Reperfusion of the Rat Kidney. *Free Radical Research*, 25(1), 31–42. doi:10.3109/10715769609145654.
  75. Kaushal GP, Basnakanian AG, Shah SV. (2004) Apoptotic pathways in ischemic acute renal failure. *Kidney Int.* 2004 Aug;66(2):500-6. doi: 10.1111/j.1523-1755.2004.761\_6.x. PMID: 15253697.
  76. Kelly, K. J., Plotkin, Z., Vulgamott, S. L. & Dagher, P. C.(2003) P53 mediates the apoptotic response to GTP depletion after renal ischemia-reperfusion: protective role of a p53 inhibitor. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14, 128–138.
  77. Khan, S. & Jena, G. (2014) Sodium butyrate, a HDAC inhibitor ameliorates eNOS, iNOS and TGF- $\beta$ 1-induced fibrogenesis, apoptosis and DNA damage in the kidney of juvenile diabetic rats. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 73, 127-139, doi:10.1016/j.fct.2014.08.010.
  78. Kim T-M, Ramírez V, Barrera-Chimal J, Bobadilla NA, Park PJ, et al. (2011) Gene Expression Analysis Reveals the Cell Cycle and Kinetochore Genes Participating in Ischemia Reperfusion Injury and Early Development in Kidney. *PLoS ONE* 6(9): e25679. doi:10.1371/journal.pone.0025679.
  79. Kwiatkowska, E. et al. (2021) The Mechanism of Drug Nephotoxicity and the Methods for Preventing Kidney Damage. *Int J Mol Sci* 22, doi:10.3390/ijms22116109.
  80. Lan, R., Geng, H., Singha, P. K., Saikumar, P., Bottinger, E. P., Weinberg, J. M., & Venkatachalam, M. A. (2016). Mitochondrial Pathology and Glycolytic Shift during Proximal Tubule Atrophy after Ischemic AKI. *Journal of the American Society of Nephology*, 27(11), 3356–3367. doi:10.1681/asn.2015020177.

81. Legouis D, Faivre A, Cippà PE, de Seigneux S. Renal gluconeogenesis: an underestimated role of the kidney in systemic glucose metabolism. *Nephrol Dial Transplant*. 2022 Jul 26;37(8):1417-1425. doi: 10.1093/ndt/gfaa302. PMID: 33247734.
82. Leonel AJ, Alvarez-Leite JI. (2012) Butyrate: implications for intestinal function. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2012 Sep;15(5):474-9. doi: 10.1097/MCO.0b013e32835665fa. PMID: 22797568.
83. Li, Y. J. et al.(2020) Dietary Fiber Protects against Diabetic Nephropathy through Short-Chain Fatty Acid–Mediated Activation of G Protein–Coupled Receptors GPR43 and GPR109A. *Journal of the American Society of Nephrology* 31, 1267, doi:10.1681/ASN.2019101029.
84. Li, Z., Lu, S. & Li, X. (2021) The role of metabolic reprogramming in tubular epithelial cells during the progression of acute kidney injury. *Cell Mol Life Sci*, doi:10.1007/s00018-021-03892-w.
85. Lieberthal, W., Koh, J. S. & Levine, J. S. (1998) Necrosis and apoptosis in acute renal failure. *Semin. Nephrol*. 18, 505–518.
86. Lin HY, Lee SC, Lin SF, Hsiao HH, Liu YC, Yang WC, Hwang DY, Hung CC, Chen HC, Guh JY. (2013) Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels predict cisplatin-induced acute kidney injury better than albuminuria or urinary cystatin C levels. *Kaohsiung J Med Sci*. 2013 Jun;29(6):304-11. doi: 10.1016/j.kjms.2012.10.004. Epub 2013 Jan 11. PMID: 23684135.
87. Liu Y, Li YJ, Loh YW, Singer J, Zhu W, Macia L, Mackay CR, Wang W, Chadban SJ, Wu H. (2021) Fiber Derived Microbial Metabolites Prevent Acute Kidney Injury Through G-Protein Coupled Receptors and HDAC Inhibition. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Apr 8;9:648639. doi: 10.3389/fcell.2021.648639. PMID: 33898439; PMCID: PMC8060457.
88. Lombi, F., Muryan, A., Canzonieri, R., & Trimarchi, H. (2016). Biomarcadores en la lesión renal aguda: ¿ paradigma o evidencia? *Nefrología*, 36(4), 339–346. doi:10.1016/j.nefro.2016.01.012.
89. Lombi, F., Varela, C. F., Martínez, R., Greloni, G., Campolo Girard, V., & Rosa Diez, G. (2017). Lesión renal aguda en Latinoamérica en la era del big data. *Nefrología*, 37(5), 461–464. doi:10.1016/j.nefro.2017.03.010.
90. Lupusoru, M. et al. (2021) Renal replacement therapy in cancer patients with acute kidney injury (Review). *Exp Ther Med* 22, 864, doi:10.3892/etm.2021.10296.
91. Macfarlane S, Macfarlane GT. (2003) Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc Nutr Soc*. 2003;62:67-72. DOI: 10.1079/PNS2002207.
92. Manrique Vergara, D, & González Sánchez, ME. (2017). Ácidos grasos de cadena corta (ácido butírico) y patologías intestinales. *Nutrición Hospitalaria*, 34(Supl. 4), 58-61. <https://dx.doi.org/10.20960/nh.1573>.
93. Marques L.(2019) Tubulogénesis de túbulo proximal para estudios de nefrotoxicidad. Grado en Biotecnología. Facultad de Ciencias. Universidad Zaragoza <https://core.ac.uk/download/290002519.pdf>.
94. Mateos Islas, M., Ventura-Pérez, P., & Ariza-Ortega, J. A. (2021). Ácidos grasos de cadena corta y media como precursores para inhibir los síntomas del coronavirus. *Educación Y Salud Boletín Científico Instituto De Ciencias De La Salud Universidad Autónoma Del Estado De Hidalgo*, 9(18), 224-231. <https://doi.org/10.29057/icsa.v9i18.6918>.
95. Meyer C, Stumvoll M, Dostou J, Welle S, Haymond M, Gerich J. (2002) Renal substrate exchange and gluconeogenesis in normal postabsorptive humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002 Feb;282(2):E428-34. doi: 10.1152/ajpendo.00116.2001. PMID: 11788376.
96. Meyer C, Stumvoll M, Welle S, Woerle HJ, Haymond M, Gerich J. (2003) Relative importance of liver, kidney, and substrates in epinephrine-induced increased gluconeogenesis in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003 Oct;285(4):E819-26. doi: 10.1152/ajpendo.00145.2003. PMID: 12959936.
97. Mishra J, Ma Q, Prada A, Mitsnefes M, Zahedi K, Yang J, Barasch J, Devarajan P. (2003) Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Oct;14(10):2534-43. doi: 10.1097/01.asn.0000088027.54400.c6. PMID: 14514731.
98. Mishra J, Mori K, Ma Q, Kelly C, Barasch J, Devarajan P.(2004) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a novel early urinary biomarker for cisplatin nephrotoxicity. *Am J Nephrol*. 2004 May-Jun;24(3):307-15. doi: 10.1159/000078452. Epub 2004 May 12. PMID: 15148457.
99. Mitchell R, Kumar V, Abbas A, Aster J. Robbins y Cotran. (2017) *Patología estructural y funcional*. 9na. Barcelona, España: Elsevier; 2017.
100. Miyahira A.J.M. (2003) Tema de Revisión: Insuficiencia renal aguda. *Rev Med Hered* 2003; 14: 36-43 <http://www.scielo.org.pe/pdf/rmh/v14n1/v14n1tr1>.
101. Montalvo C. (2011) Estructura microscópica de los órganos. UNAM. Recuperado de: [https://bct.facmed.unam.mx/wp-content/uploads/2018/08/generalidades\\_organos\\_montalvo\\_2011.pdf](https://bct.facmed.unam.mx/wp-content/uploads/2018/08/generalidades_organos_montalvo_2011.pdf) .
102. Moreno M A.(2016) Inflamación y sepsis. *Rev Hosp Jua Mex*; 83(3): 86-91.

103. Mori K, Lee HT, Rapoport D, Drexler IR, Foster K, Yang J, Schmidt-Ott KM, Chen X, Li JY, Weiss S, Misha J, Cheema FH, Markowitz G, Suganami T, Sawai K, Mukoyama M, Kunis C, D'Agati V, Devarajan P, Barasch J. (2005) Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest.* 2005 Mar;115(3):610-21. doi: 10.1172/JCI23056. PMID: 15711640; PMCID: PMC548316.
104. Müller G.A., Müller C.A. & Markovic-Lipkovski J(1996) Adhesion Molecules in Renal Diseases, *Renal Failure*, 18:5, 711-724, DOI: 10.3109/08860229609047701.
105. Nelson D, Cox M (2009) *Lehninger Principios de Bioquímica*. Omega, 5ta edición. Barcelona, España. ISBN: 978-84-282-1486-5.
106. Novitskaya, T. et al.(2014) A PTBA small molecule enhances recovery and reduces postinjury fibrosis after aristolochic acid-induced kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 306, F496-504, doi:10.1152/ajprenal.00534.2013.
107. Obregón, O., Aure, G., Lares, M., Castro, J., & Tamayo, A. (2007). Respuesta lipídica y relación con VCAM-1 en el embarazo como modelo de activación endotelial. *Clínica e Investigación En Arteriosclerosis*, 19(4), 181–188. doi:10.1016/s0214-9168(07)74196-7.
108. Oriol-Audit C. (1979) *Actina: Cristalizacion y acci+on inductora sobre la división celular*. Biochimie cellulaire. College de France. Paris 5.
109. Paes AS, Koga RCR, Sales PF, Santos Almeida HK, Teixeira TACC, Carvalho JCT. (2023) Phytochemicals from Amazonian Plant Species against Acute Kidney Injury: Potential Nephroprotective Effects. *Molecules*. 2023 Sep 2;28(17):6411. doi: 10.3390/molecules28176411. PMID: 37687240; PMCID: PMC10490259. páginas 100-106.
110. Patindol JA, Guraya HS, Champagne ET, McClung AM. (2010) Nutritionally important starch fractions of rice cultivars grown in Southern United States. *J Food Sci.* 2010;75:H137-44. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.01627.x.
111. Pavlakou, P.; Liakopoulos, V.; Eleftheriadis, T.; Mitsis, M.; Dounousi, E. (2017) Oxidative Stress and Acute Kidney Injury in Critical Illness: Pathophysiologic Mechanisms-Biomarkers-Interventions, and Future Perspectives. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2017, 2017, 6193694.
112. Periz A, Force L, Sanmartín E. (2003) Revisión actualizada sobre la insuficiencia renal aguda: estudio de un caso. *Nursing*. Vol. 21. Núm.8. páginas 51-59 .<https://www.elsevier.es/es-revista-nursing-20-articulo-revision-actualizada-sobre-insuficiencia-renal-13052533>.
113. Pickkers, P. et al. (2021) Acute kidney injury in the critically ill: an updated review on pathophysiology and management. *Intensive Care Med*, doi:10.1007/s00134-021-06454-7.
114. Piko N, Bevc S, Hojs R, Ekart R. (2023) The Role of Oxidative Stress in Kidney Injury. *Antioxidants*. 2023; 12(9):1772. <https://doi.org/10.3390/antiox12091772>.
115. Plata, C., Cruz, C., Cervantes, L. G. & Ramirez, V. (2019) The gut microbiota and its relationship with chronic kidney disease. *Int Urol Nephrol* 51, 2209-2226, doi:10.1007/s11255-019-02291-2.
116. Plata, C., et al. (2018) A Butyrate And Niacin Supplemented Diet Reduces Corporal Fat Gain And Induces Severe Kidney Damage In A Murine Model (C57bl/6). *The FASEB Journal* 32, 719.719-719.719, doi:[https://doi.org/10.1096/fasebj.2018.32.1\\_supplement.719.19](https://doi.org/10.1096/fasebj.2018.32.1_supplement.719.19).
117. PolyDetector DAB HP Brown Substrate – Chromogen. PI 0018, Rev. E DCN: 3135. <https://biosbfilehosting.s3.us-west-1.amazonaws.com/Product%20Instructions/English/PI0018.pdf>.
118. PolyDetector Peroxidase Blocker. PI 0054, Ver. 6 DCN: 4236. <https://www.biosb.com/wp-content/uploads/2022/08/PI0054-PolyDetector-Peroxidase-Blocker-1.pdf>.
119. Porth C, Norris T. (2020) *Porth Fisiopatología. Alteraciones De La Salud. Conceptos Basicos*. 10ma Ed. Wolters Kluwer. ISBN, 978-84-17602-09-3.
120. Portilla D, Li S, Nagothu KK, Megyesi J, Kaissling B, Schnackenberg L, Safirstein RL, Beger RD. (2006) Metabolomic study of cisplatin-induced nephrotoxicity. *Kidney Int.* 2006 Jun;69(12):2194-204. doi: 10.1038/sj.ki.5000433. Epub 2006 May 3. PMID: 16672910.
121. Prozialeck WC, Edwards JR. (2007) Cell adhesion molecules in chemically-induced renal injury. *Pharmacol Ther.* 2007 Apr;114(1):74-93. doi: 10.1016/j.pharmthera.2007.01.001. Epub 2007 Jan 23. PMID: 17316817; PMCID: PMC1913814.
122. Racusen, L. (2001) in *Acute Renal Failure 1st edn* (eds Molitoris, B. A. & Finn, W. F.) 1–12 (W. B. Saunders, Philadelphia, 2001).
123. Ramírez V. (2022). Insuficiencia renal aguda en el adulto mayor en Pimentel M, et.al. *Gerontología: un enfoque interdisciplinario (191-198)*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

124. Ramirez, V. et al. (2009) Adrenalectomy prevents renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 297, F932-942, doi:10.1152/ajprenal.00252.2009.
125. Ramírez, V., Mejia-Vilet, J. M., Hernandez, D., Gamba, G. & Bobadilla, N. A. (2008) Radicol, a heat shock protein 90 inhibitor, reduces glomerular filtration rate. *Am J Physiol Renal Physiol* 295, F1044-1051, doi:10.1152/ajprenal.90278.2008.
126. Ramírez-Rodríguez Y., Ramírez V et.al. (2022) *Stenocereus huastecorum*-fruit juice concentrate protects against cisplatin-induced nephrotoxicity by nitric oxide pathway activity and antioxidant and antiapoptotic effects. *Food Research International* 160 (2022) 111337. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111337>.
127. Rashid H, Jali A, Akhter MS, Abdi SAH. (2024) Molecular Mechanisms of Oxidative Stress in Acute Kidney Injury: Targeting the Loci by Resveratrol. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024; 25(1):3. <https://doi.org/10.3390/ijms25010003>.
128. Ratliff BB, Abdulmahdi W, Pawar R, Wolin MS. (2016) Oxidant Mechanisms in Renal Injury and Disease. *Antioxid Redox Signal*. 2016 Jul 20;25(3):119-46. doi: 10.1089/ars.2016.6665. Epub 2016 Apr 26. PMID: 26906267; PMCID: PMC4948213.
129. Restrepo C. Parra C. (2018). Anatomía y fisiología renal. Universidad de caldas, 790–795. . <http://asocolnef.com/wp-content/uploads/2018/12/anatomia-yfisiologia-renaL.pdf>.
130. Rodriguez I. B, Fernandez L.(1997) Apoptosis en enfermedades renales. *NEFROLOGÍA Vol. XVII. Num.6*.
131. Rubio-Marin B, Roca-Rodríguez CA, Ramírez-Hernández JM. (2020) Arterias y venas múltiples en injertos renales. Revisión de literatura sobre la anatomía y embriología en variantes vasculares renales y sobre los resultados en donación y trasplante de riñones con vascularidad múltiple. *Rev Mex Traspl*. 2020; 9 (3): 120-129. <https://dx.doi.org/10.35366/97460>.
132. Ryou H Jang, & Rabb, H. (2009). The innate immune response in ischemic acute kidney injury. *Clinical Immunology*, 130(1), 41–50.doi:10.1016/j.clim.2008.08.016.
133. Saikumar, J. et al. (2012) Expression, circulation, and excretion profile of microRNA-21, -155, and -18a following acute kidney injury. *Toxicol Sci* 129, 256-267, doi:10.1093/toxsci/kfs210.
134. Sanz M. (2020) Metabolismo energético de células de túbulo proximal humano. Grado en Biotecnología – Facultad de Ciencias. Universidad Zaragoza 2020 <https://zagan.unizar.es/record/97951/files/TAZ-TFG-2020-3259.pdf>.
135. Schaub J, Venkatachalam M., and Weinberg J. (2021) Proximal Tubular Oxidative Metabolism in Acute Kidney Injury and the Transition to CKD. *KIDNEY360* 2: 355–364, 2021. doi: <https://doi.org/10.34067/KID.0004772020>.
136. Shih YL, Rothfield L (2006). "The bacterial cytoskeleton". *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70 (3): 729–54. DOI:10.1128/MMBR.00017-06.
137. Stumvoll M, Meyer C, Mitrakou A, Nadkarni V, Gerich JE. (1997) Renal glucose production and utilization: new aspects in humans. *Diabetologia*. 1997 Jul;40(7):749-57. doi: 10.1007/s001250050745. PMID: 9243094.
138. Susantitaphong P, Cruz DN, Cerda J, Abulfaraj M, Alqahtani F, Koulouridis I. (2013) World incidence of AKI: a meta-analysis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2013;8(9):1482-93.
139. Sutton T.A., et.al. (2003) Injury of the renal microvascular endothelium alters barrier function after ischemia. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. 285, F191-F198.
140. Tedelind S, Westberg F, Kjerrulf M, Vidal A.(2007) Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: a study with relevance to inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2007 May 28;13(20):2826-32. doi: 10.3748/wjg.v13.i20.2826. PMID: 17569118; PMCID: PMC4395634.
141. Thermo Fisher Scientific. Click-iT TUNEL Alexa Fluor Imaging Assay Protocol <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/apoptosis-protocol/tunel-protocols/click-it-tunel-alexa-fluor-imaging-assay-protocol.html>.
142. Tomsa AM, Alexa AL, Junie ML, Rachisan AL, Ciumarnean L. (2019) Oxidative stress as a potential target in acute kidney injury. *PeerJ*. 2019 Nov 13;7:e8046. doi: 10.7717/peerj.8046. PMID: 31741796; PMCID: PMC6858818.
143. Vaidya, V. S. et al. (2009) A rapid urine test for early detection of kidney injury. *Kidney Int* 76, 108-114, doi:10.1038/ki.2009.96.
144. Vaidya, V. S. et al. (2010) Kidney injury molecule-1 outperforms traditional biomarkers of kidney injury in preclinical biomarker qualification studies. *Nat Biotechnol* 28, 478-485, doi:10.1038/nbt.1623.
145. Vaidya, V. S., Ferguson, M. A. & Bonventre, J. V. (2008) Biomarkers of acute kidney injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48, 463-493, doi:10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094615.

146. Vergara M, González SD, Eugenia M. (2017). Ácidos grasos de cadena corta (ácido butírico) y patologías intestinales. *Nutrición Hospitalaria*, 34(Supl. 4), 58-61. <https://dx.doi.org/10.20960/nh.1573>.
147. Vinuesa, E., Hotter, G., Jung, M., Herrero-Fresneda, I., Torras, J., & Sola, A. (2007). Macrophage involvement in the kidney repair phase after ischaemia/reperfusion injury. *The Journal of Pathology*, 214(1), 104–113. doi:10.1002/path.2259.
148. Wagner, M. C. et al. (2008) Ischemic injury to kidney induces glomerular podocyte effacement and dissociation of slit diaphragm proteins Neph1 and ZO-1. *J. Biol. Chem.* 283, 35579–35589.
149. Wei, T., Tian, W., Liu, F. & Xie, G. (2014) Protective effects of exogenous beta-hydroxybutyrate on paraquat toxicity in rat kidney. *Biochem Biophys Res Commun* 447, 666-671, doi:10.1016/j.bbrc.2014.04.074.
150. Weinberg JM, Venkatachalam MA, Roeser NF, Nissim I. (2000) Mitochondrial dysfunction during hypoxia/reoxygenation and its correction by anaerobic metabolism of citric acid cycle intermediates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Mar 14;97(6):2826-31. doi: 10.1073/pnas.97.6.2826. PMID: 10717001; PMCID: PMC16014.
151. White KC, Nasser A, Gatton ML, Laupland KB. (2023) Current management of fluid balance in critically ill patients with acute kidney injury: A scoping review. *Critical Care and Resuscitation : Journal of the Australasian Academy of Critical Care Medicine.* 2023 Sep;25(3):126-135. DOI: 10.1016/j.ccrj.2023.06.002. PMID: 37876369; PMCID: PMC10581269.
152. Wiener, J. G. D., Goss, L., Wahl, T. S., Terry, M. A., Burge, K. G., Chu, D. I., Morris, M. S. (2019). The Association of Enhanced Recovery Pathway and Acute Kidney Injury in Patients Undergoing Colorectal Surgery. *Diseases of the Colon & Rectum*, 1. doi:10.1097/dcr.0000000000001528.
153. Wu, H. et al. (2007) TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury. *J. Clin. Invest.* 117, 2847–2859.
154. Yang H, Zhang Z, Peng R, Zhang L, Liu H, Wang X, Tian Y, Sun Y. (2021) RNA-Seq analysis reveals critical transcriptome changes caused by sodium butyrate in DN mouse models. *Biosci Rep.* 2021 Apr 30;41(4):BSR20203005. doi: 10.1042/BSR20203005. PMID: 33779731; PMCID: PMC8035627.
155. Yang J, Mori K, Li JY, Barasch J: (2003) Iron, lipocalin, and kidney epithelia. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;285:F9–F18.
156. Yu, S. M. & Bonventre, J. V. (2020) Acute kidney injury and maladaptive tubular repair leading to renal fibrosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 29, 310-318, doi:10.1097/MNH.0000000000000605.
157. Zager, R. A., Johnson, A. C. & Becker, K. (2014) Renal cortical pyruvate depletion during AKI. *J Am Soc Nephrol* 25, 998-1012, doi:10.1681/ASN.2013070791.
158. Zapolska-Downar D, Naruszewicz M. (2009) Propionate reduces the cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression by inhibiting nuclear factor-kappa B (NF-kappaB) activation. *J Physiol Pharmacol.* 2009 Jun;60(2):123-31. PMID: 19617655.
159. Zhang A y Huang S. (2012) Progress in Pathogenesis of Proteinuria. *Int J Nephrol*; 2012:314251 doi:10.1155/2012/314251.
160. Zheng, Y., Zhang, Z. & Zhang, N. (2019) Protective Effects of Butyrate on Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *Urol Int* 102, 348-355, doi:10.1159/000497476.

## 1. ANEXO

Constancias de congresos, pláticas y cursos a los que se asistió durante la elaboración de la tesis.

Constancia 1. VII Congreso AMIINSHAE, diciembre 2023.



Constancia 2. 14° Congreso Internacional de Investigación UVM, octubre 2023.



Constancia 3. VI Congreso AMIINSHAE, diciembre 2022.



Constancia 4. 70° Congreso Internacional en Nefrología IMIN, diciembre 2023..



Constancia 5. Plática virtual: Programación del desarrollo en el modelo de la rata: evidencia crítica de los cambios ambientales actuales, julio, 2023.



Constancia 6. Curso virtual de Inducción a las políticas de ingreso y uso al bioterio, octubre 2022



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

Otorga la presente

# CONSTANCIA

a

## Citlali Metztlí Roque Soto

Por su participación al Curso Virtual de " **Inducción a las políticas de ingreso y uso al Bioterio** ", el cual se llevó a cabo el 21 de octubre de 2022, en un horario de 10:30 a 13:30h.

Este curso virtual se llevo a cabo dentro de las instalaciones del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

  
**Dr. Gerardo Gamba Ayala**  
Director de Investigación

  
**Dra. Mariela Guadalupe Contreras Escamilla**  
Instructor y Titular de Departamento de Investigación Experimental y Bioterio

  
**Lcda. Berenice Díaz Ramos**  
Coordinadora del curso

IEB-104-36 A-37-22



f t @ incmsz