



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EFFECTO DE LA PROTEÍNA DIETARIA SOBRE LA  
EXPRESIÓN GÉNICA EN LA LIPOGÉNESIS RENAL EN UN  
MODELO DE OBESIDAD GENÉTICA**

**TESIS MANCOMUNADA**

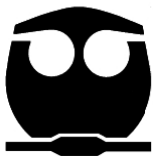
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICO DE ALIMENTOS**

**PRESENTAN:**

**GALÁN FABRE IVONNE**

**MORENO DURÁN NAGIBE BERENICE**



**MÉXICO D.F.**

**2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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:** Lucía Cornejo Barrera \_\_\_\_\_

**VOCAL:** Karla Mercedes Díaz Gutiérrez \_\_\_\_\_

**SECRETARIO:** Claudia Teresa Tovar Palacio \_\_\_\_\_

**1er. SUPLENTE:** Liliana Rocío González Osnaya \_\_\_\_\_

**2do. SUPLENTE** Juan Manuel Díaz Álvarez \_\_\_\_\_

## SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.  
Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral y Departamento de Fisiología  
de la Nutrición.  
Facultad de Química, UNAM.

**ASESOR DEL TEMA:** Dra. Claudia Teresa Tovar  
Palacio \_\_\_\_\_

**SUSTENTANTES :** Galán Fabre Ivonne \_\_\_\_\_

Moreno Durán Nagibe  
Berenice \_\_\_\_\_

## **AGRADECIMIENTOS**

A la UNAM por permitirnos ser parte de una institución reconocida a nivel mundial, lo que significa un gran orgullo.

A la Facultad de Química y a sus profesores, por forjarnos profesionalmente, darnos la oportunidad de crecer en ella y darnos las bases necesarias para la vida profesional.

Al INNCMSZ, por abrirnos sus puertas para la realización de nuestro proyecto de investigación.

A la Dra. Claudia Tovar por darnos la oportunidad de participar en su proyecto, por conocernos como personas, por su gran paciencia, apoyo y amistad.

Al Dr. Armando Tovar y a la Dra. Nimbe Torres, por permitirnos formar parte de su equipo de trabajo.

A todos los compañeros del Depto. De Fisiología de la Nutrición (Iván, Bere, Omar, Víctor, Maru, Andrea, Paty, Memo, Natalia, Marcela, Adriana y la Sra. Gloria) por resolver todas nuestras dudas, hacernos reír y ser parte de una etapa muy especial en nuestras vidas.

A todos los que directa e indirectamente hicieron que este proyecto se hiciera realidad.

***Ivonne Galán Fabre***

***Nagibe Berenice Moreno Durán***

## DEDICATORIAS

A Paola, por que eres y siempre serás mi razón para seguir adelante y ser una mejor persona y mamá cada día, todo esto es para ti. Eres lo mejor que me ha pasado en la vida. Te adoro princesa.

A mi mamá, gracias por todo el apoyo que me has dado y nunca dejarme sola, sin ti esto no hubiera sido posible. Gracias, te quiero mucho.

A mi papá, porque siempre estas y estarás presente en cada uno de mis logros. Te extraño mucho.

A Enrique, por ser parte de mi vida y apoyarme cuando lo he necesitado, por superar los problemas y seguir adelante juntos. Te amo y esto es solo el principio de todo lo que nos espera.

A Bere, por tu amistad todos estos años, por el apoyo para terminar este proyecto a pesar de todas las complicaciones. Por fin llegamos a la meta, lo logramos.

A mis amigos (Juana, Chucha, Juan, Fabiola, Gina, Gaby, Vania, Belem, Jorge, Raúl y Memo), simplemente por ser parte de mi vida, porque cada uno representa algo especial para mí y por todos los momentos que hemos compartido. Los quiero.

***Ivonne Galán Fabre***

## DEDICATORIAS

A mis padres Noel y Patricia, por darme la vida, por enseñarme que el amor que hay en una familia es lo más sagrado, prevalece ante todo y vence cualquier obstáculo. Ustedes son mi más grande amor e inspiración. Los amo.

A mi hermano Noel, por ser mi fortaleza, por siempre apoyarme, exigirme y orientarme en todas las decisiones de mi vida, por hacerme reír hasta en los momentos más difíciles y enseñarme a ver con sabiduría cualquier situación por mas difícil que sea.

A Titi, por marcar el inicio del mayor y mejor cambio de mi vida, por tu incondicional apoyo, por escucharme, por motivarme siempre a seguir adelante, por ser mi amiga y mi familia.

A Pato por llegar a mi vida, por respetarme, por enseñarme lo bonito del amor, por apoyarme y amarme. Te amo mi amor, esta es una meta alcanzada de toda nuestra vida futura

A mis abuelos Noel y Luz y a mis tíos, por quererme, apoyarme y sacarme adelante con todo su respeto, admiración y fortaleza. Por brindarme todo su apoyo durante estos difíciles años, haciéndolos felices y llenos de amor.

A Ivonne, por tu apoyo, por tu gran amistad, porque a pesar de todos los retos de la vida a los que nos hemos enfrentado, logramos concluir una etapa más de todas las que llevamos juntas. ¡Lo logramos!

A mis amigos (Sharpy, Aarón, Armando, Karlita, Lazarin, Sue, Belem, Vania, Moni, Rose, Gina, Gaby, Raúl, Memo, Ana), por su amistad, por su confianza, su apoyo, por todos los momentos de alegría, ustedes son la muestra más clara y verdadera de la amistad.

***Nagibe Berenice Moreno Durán***

## ÍNDICE GENERAL

### CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN .....	1
--------------------	---

### CAPÍTULO II

OBJETIVOS .....	4
2.1 Objetivo General .....	4
2.2 Objetivos Particulares .....	4

### CAPÍTULO III

MARCO TEÓRICO.....	6
3.1 Obesidad .....	6
3.2 Síndrome Metabólico .....	8
3.3 Resistencia a la insulina .....	11
3.4 Diabetes mellitus .....	13
3.5 Lipotoxicidad .....	14
3.6 Leptina .....	16
3.7 Metabolismo de lípidos.....	18
3.7.1 Colesterol .....	18
3.7.2 Biosíntesis de Colesterol .....	19
3.7.2.1 SREBP-2.....	21
3.7.2.2 HMG-CoA reductasa .....	22
3.7.3 Ácidos grasos .....	23
3.7.4 Biosíntesis de ácidos grasos .....	25
3.7.4.1 SREBP-1.....	26
3.7.4.2 FAS .....	26
3.7.5 Oxidación de ácidos grasos .....	27
3.7.5.1 CPT-1 .....	31
3.8 Inflamación .....	33
3.8.1 TNF- $\alpha$ .....	35

3.8.2 IL-6 .....	36
3.9 Fibrosis .....	38
3.9.1 TGF- $\beta$ .....	38
3.9.2 Colágena Tipo IV .....	40
3.10 Función renal.....	42
3.10.1 Anatomía del riñón.....	44
3.10.1.1 Nefrona.....	44
3.10.1.2 Glomérulo.....	44
3.10.1.3 Túbulos renales.....	45
3.10.2 Fisiología Renal.....	45
3.10.2.1 Filtración Glomerular.....	46
3.10.2.2 Podocina y Nefrina.....	46
3.10.3 Enfermedad renal.....	48
3.10.3.1 Depuración de creatinina.....	49
3.11 Dietas altas en proteína.....	51
3.11.1 Soya .....	52
3.11.1.1 Proteína de soya .....	54
3.11.2 Caseína .....	56
3.12 Modelo animal rata Zucker <sup>fa/fa</sup> .....	58

## **CAPÍTULO IV**

HIPÓTESIS .....	61
-----------------	----

## **CAPÍTULO V**

DISEÑO EXPERIMENTAL .....	62
5.1 Diagrama de flujo .....	63
5.2 Modelo animal y tratamientos dietarios .....	65
5.3 Métodos .....	65
5.3.1 Determinación de la expresión génica .....	65
5.3.1.1 Extracción del ARN total del tejido renal .....	65
5.3.1.2 Cuantificación del ARN por espectrofotometría .....	71



5.3.1.3 Electroforesis del ARN extraído .....	73
5.3.1.4 Reacción Transcriptasa Reversa .....	77
5.3.1.5 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real .....	80
5.3.2 Determinación de lípidos en tejido renal .....	83
5.3.2.1 Extracción de lípidos totales del tejido renal .....	83
5.3.2.2 Cuantificación del colesterol total en tejido renal .....	85
5.3.2.3 Cuantificación de triglicéridos totales en tejido renal.....	87
5.3.3 Determinación de creatinina en suero .....	89
5.3.4Análisis Histológicos .....	91
5.3.4.1 Obtención de preparaciones histologías .....	91
5.3.4.2 Tinción tricrómica de Masson.....	94
5.3.4.3 Tinción de PAS .....	98
5.3.4.4 Análisis de las preparaciones mediante microscopia .....	101
5.3.5 Análisis estadístico de los resultados .....	102

## **CAPÍTULO VI**

RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	103
6.1 Cuantificación de ARN .....	103
6.2 Electroforesis de ARN .....	103
6.3 Reacción RT .....	106
6.4 PCR tiempo real .....	106
6.4.1 SREBP-1 .....	109
6.4.2 FAS .....	111
6.4.3 SREBP-2 .....	113
6.4.4 HMG-CoA reductasa .....	115
6.4.5 CPT-1 .....	117
6.4.8 TNF- $\alpha$ .....	119
6.4.9 IL-6 .....	121
6.4.10 TGF- $\beta$ .....	123
6.4.11 Colágena Tipo IV .....	125
6.4.12 Podocina .....	127

6.4.13 Nefrina .....	129
6.5 Lípidos Renales .....	131
6.5.1 Colesterol total en tejido renal .....	132
6.5.2 Triglicéridos totales en tejido renal .....	134
6.6 Creatinina en suero .....	136
6.6.1 Depuración de creatinina .....	139
6.7 Análisis histológico del tejido renal .....	141
6.7.1 Expansión Mesangial .....	141
6.7.2 Fibrosis glomerular .....	144
6.8 Análisis General .....	146
<b>CAPÍTULO VII</b>	
CONCLUSIONES .....	150
<b>GLOSARIO</b> .....	151
<b>ABREVIATURAS</b> .....	154
<b>APENDICE I</b>	
Tablas .....	159
<b>APENDICE II</b>	
Estadísticas .....	202
<b>APENDICE III</b>	
Formulación de las dietas .....	234
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	235

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 3.1</b>	Mecanismos relacionados con el desencadenamiento de la enfermedad renal.....	10
<b>Figura 3.2</b>	Estructura química del colesterol .....	18
<b>Figura 3.3</b>	Síntesis de colesterol .....	20
<b>Figura 3.4</b>	Mecanismo de “activación” de un ácido graso catalizado por la acil-CoA sintasa .....	28
<b>Figura 3.5</b>	Transporte de los ácidos grasos al interior de la mitocondria .....	29
<b>Figura 3.6</b>	Filtración renal.....	43
<b>Figura 3.7</b>	Frijol de soya .....	54
<b>Figura 3.8</b>	Modelo animal rata Zucker <sup>fa/fa</sup> .....	60
<b>Figura 5.1</b>	Diagrama de bloques de la metodología a emplear en la investigación .....	63
<b>Figura 6.1</b>	Gel A de agarosa para electroforesis de ARN .....	104
<b>Figura 6.2</b>	Gel B de agarosa para electroforesis de ARN .....	104
<b>Figura 6.3</b>	Gel C de agarosa para electroforesis de ARN .....	105
<b>Figura 6.4</b>	Gel D de agarosa para electroforesis de ARN .....	105
<b>Figura 6.5</b>	Pantalla del programa de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para la amplificación del gen de ciclofilina.....	107
<b>Figura 6.6</b>	Expansión mesangial de los tratamientos dietarios (tinción de PAS).....	141
<b>Figura 6.7</b>	Fibrosis renal de los tratamientos dietarios (tinción de Masson)	144

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfica 6.1</b>	Expresión relativa del RNAm del gen SREBP-1 / Ciclofilina ...	109
<b>Gráfica 6.2</b>	Expresión relativa del RNAm del gen FAS / Ciclofilina .....	111
<b>Gráfica 6.3</b>	Expresión relativa del RNAm del gen SREBP-2 / Ciclofilina ...	113
<b>Gráfica 6.4</b>	Expresión relativa del RNAm del gen HMG-CoA reductasa/ Ciclofilina .....	115
<b>Gráfica 6.5</b>	Expresión relativa del RNAm del gen CPT-1 / Ciclofilina .....	117
<b>Gráfica 6.6</b>	Expresión relativa del RNAm del gen TNF- $\alpha$ / Ciclofilina .....	119
<b>Gráfica 6.7</b>	Expresión relativa del RNAm del gen IL-6 / Ciclofilina .....	121
<b>Gráfica 6.8</b>	Expresión relativa del RNAm del gen TGF- $\beta$ / Ciclofilina .....	123
<b>Gráfica 6.9</b>	Expresión relativa del RNAm del gen Colágena Tipo IV / Ciclofilina.....	125
<b>Gráfica 6.10</b>	Expresión relativa del RNAm del gen Podocina/ Ciclofilina ....	127
<b>Gráfica 6.11</b>	Expresión relativa del RNAm del gen Nefrina / Ciclofilina .....	129
<b>Gráfica 6.12</b>	Colesterol total en tejido renal .....	132
<b>Gráfica 6.13</b>	Triglicéridos totales en tejido renal .....	134
<b>Gráfica 6.14</b>	Creatinina en suero .....	137
<b>Gráfica 6.15</b>	Depuración de creatinina .....	139
<b>Gráfica 6.16</b>	Expansión Mesangial .....	142

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 3.1</b>	Secuencia del proceso inflamatorio .....	33
<b>Tabla 3.2</b>	Características nutricionales del frijol de soya .....	53
<b>Tabla A.I.1</b>	Lectura 260 y 280 nm del ARN extraído .....	159
<b>Tabla A.I.2</b>	Cálculos g ARN / $\mu$ L .....	161
<b>Tabla A.I.3</b>	Cálculos para la preparación de muestras de electroforesis de ARN.....	163
<b>Tabla A.I.4</b>	Cálculos para las diluciones de 500 $\mu$ L a una concentración de 150ng/ $\mu$ L de ARN.....	165
<b>Tabla A.I.5</b>	Cuantificación de las diluciones de 150ng / $\mu$ L de ARN .....	167
<b>Tabla A.I.6</b>	Cálculo de <i>agua sigma</i> y ARN para 300 ng .....	169
<b>Tabla A.I.7</b>	Resultados de expresión génica por medio de la técnica comparativa de “ct” para SREBP-1 .....	171
<b>Tabla A.I.8</b>	Resultados de expresión génica por medio de la técnica comparativa de “ct” para FAS .....	173
<b>Tabla A.I.9</b>	Resultados de expresión génica por medio de la técnica comparativa de “ct” para SREBP-2 .....	175
<b>Tabla A.I.10</b>	Resultados de expresión génica por medio de la técnica comparativa de “ct” para HMG-CoA reductasa .....	177
<b>Tabla A.I.11</b>	Resultados de expresión génica por medio de la técnica comparativa de “ct” para CPT-1 .....	179
<b>Tabla A.I.12</b>	Resultados de expresión génica por medio de la técnica comparativa de “ct” para TNF- $\alpha$ .....	181
<b>Tabla A.I.13</b>	Resultados de expresión génica por medio de la técnica comparativa de “ct” para IL-6.....	183
<b>Tabla A.I.14</b>	Resultados de expresión génica por medio de la técnica comparativa de “ct” para TGF- $\beta$ .....	185
<b>Tabla A.I.15</b>	Resultados de expresión génica por medio de la técnica comparativa de “ct” para Colágena Tipo IV .....	187

<b>Tabla A.I.16</b>	Resultados de expresión génica por medio de la técnica comparativa de “ct” para Podocina .....	189
<b>Tabla A.I.17</b>	Resultados de expresión génica por medio de la técnica comparativa de “ct” para Nefrina .....	191
<b>Tabla A.I.18</b>	Resultados colesterol total en tejido renal .....	193
<b>Tabla A.I.19</b>	Resultados triglicéridos totales en tejido renal .....	195
<b>Tabla A.I.20</b>	Resultados mg/dL de creatinina en suero .....	197
<b>Tabla A.I.21</b>	Resultaos mg/dL de depuración de creatinina .....	199
<b>Tabla A.I.22</b>	Resultados porcentaje de expansión mesangial .....	201
<b>Tabla A.11.1</b>	Formulación de las dietas administradas.....	234

## ÍNDICE DE ESTADÍSTICAS

<b>Estadística A.II.1</b>	Expresión génica por medio de la técnica comparativa "ct" para SREBP-1 .....	202
<b>Estadística A.II.2</b>	Expresión génica por medio de la técnica comparativa "ct" para FAS .....	204
<b>Estadística A.II.3</b>	Expresión génica por medio de la técnica comparativa "ct" para SREBP-2 .....	206
<b>Estadística A.II.4</b>	Expresión génica por medio de la técnica comparativa "ct" para HMG-CoA reductasa .....	208
<b>Estadística A.II.5</b>	Expresión génica por medio de la técnica comparativa "ct" para CPT-1 .....	210
<b>Estadística A.II.6</b>	Expresión génica por medio de la técnica comparativa "ct" para TNF- $\alpha$ .....	212
<b>Estadística A.II.7</b>	Expresión génica por medio de la técnica comparativa "ct" para IL-6.....	214
<b>Estadística A.II.8</b>	Expresión génica por medio de la técnica comparativa "ct" para TGF- $\beta$ .....	216
<b>Estadística A.II.9</b>	Expresión génica por medio de la técnica comparativa "ct" para Colágena Tipo IV .....	218
<b>Estadística A.II.10</b>	Expresión génica por medio de la técnica comparativa "ct" para Podocina .....	220
<b>Estadística A.II.11</b>	Expresión génica por medio de la técnica comparativa "ct" para Nefrina .....	222
<b>Estadística A.II.12</b>	Colesterol total en tejido renal .....	224
<b>Estadística A.II.13</b>	Triglicéridos totales en tejido renal .....	226
<b>Estadística A.II.14</b>	Creatinina en suero .....	228
<b>Estadística A.II.15</b>	Depuración de creatinina .....	230
<b>Estadística A.II.16</b>	Porcentaje Expansión Mesangial .....	232

## CAPÍTULO I

### INTRODUCCIÓN

Desde el punto de vista demográfico y de la salud, México se encuentra en un proceso de transición, el cual se ha denominado como “transición epidemiológica”. En este proceso se registra un descenso dramático de la mortalidad por enfermedades infecciosas y un aumento en la mortalidad por enfermedades crónico-degenerativas.<sup>45</sup>

La obesidad, es una de las principales enfermedades crónico-degenerativas y acompaña a otras muy frecuentes como la diabetes mellitus y la hipertensión arterial. Es el resultado del desequilibrio entre la ingestión calórica y el gasto energético, frecuentemente consecuencia del estilo de vida, costumbres y hábitos alimenticios y el sedentarismo.<sup>21</sup>

En algunos casos, la obesidad puede desencadenar una serie de alteraciones fisiológicas, las cuales se conocen como síndrome metabólico. El mecanismo fisiopatológico fundamental en el síndrome metabólico es la resistencia a la insulina, en la cual se elevan los niveles de insulina en plasma, a esto se le conoce como hiperinsulinemia. El aumento de insulina en plasma, provoca alteraciones en el metabolismo de los lípidos, ocasionando la acumulación de estos en algunos tejidos, principalmente los que no son insulino-dependientes como el riñón.<sup>58,67</sup>

La acumulación de lípidos parece tener un papel significativo en la génesis de algunas enfermedades renales. Inicialmente se asumió que la formación de depósitos de lípidos a nivel renal obedecía exclusivamente a niveles elevados de estos en suero, sin embargo estudios recientes indican que la síntesis endógena de lípidos, juega un papel fundamental en el desarrollo de estos depósitos en el riñón.<sup>69</sup>

Investigaciones recientes han descrito que esta síntesis endógena renal se encuentra regulada por las proteínas de unión a los elementos de respuesta a esteroides (SREBPs) involucrados en la biosíntesis del colesterol y ácidos grasos.



Se ha encontrado una correlación directa en el aumento de los factores de transcripción de las proteínas de unión a los elementos de respuesta a esteroides 1 y 2 (SREBP-1 y SREBP-2 respectivamente) y el aumento de genes asociados con la síntesis de ácidos grasos como la acetil-CoA carboxilasa (ACC) y la sintasa de ácidos grasos (FAS) por sus siglas en inglés) y la expresión del gen que codifica para la proteína hidroximetilglutaril CoA reductasa (HMG-CoA reductasa, enzima clave en la síntesis de colesterol.<sup>10,44</sup>

Los factores de transcripción SREBPs se encuentran regulados tanto a nivel transcripcional o sobre el procesamiento, estabilidad y traducción del ARNm. Entre los nutrientes que pueden influir la expresión génica de estas proteínas se encuentra la glucosa, los ácidos grasos y el colesterol entre otros, además de la insulina.<sup>36</sup>

Uno de los principales problemas de la acumulación de lípidos renales es la formación de lipoproteínas oxidadas. La formación a nivel glomerular de oxígeno activado incrementa, lo que favorece la oxidación de LDL, que, a su vez, estimula la síntesis de diversas citocinas proinflamatorias como la interleucina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ).

Las modificaciones en las dietas, en el manejo de la obesidad y en forma particular en el mejoramiento del perfil lipídico se ha enfocado tradicionalmente a evitar la grasa saturada y el colesterol. Sin embargo, estudios actuales están mostrando que el manejo de los lípidos ha sido sobresimplificado, es decir, basando dichas dietas únicamente en la reducción de grasa saturada y colesterol. Específicamente, se ha dejado a un lado la correlación del metabolismo como un todo en el entendimiento de los efectos benéficos o tóxicos en diversas patologías tales como la insuficiencia renal. En este sentido, existe la evidencia de que la proteína de origen vegetal retarda el desarrollo y la progresión del daño renal en estudios conducidos en humanos, así como en varios modelos de animales como la rata Zucker <sup>fa/fa</sup>.<sup>63,65</sup> Por otro lado la concentración de la proteína en la dieta también está involucrada en modificar el perfil lipídico.

Por lo anteriormente descrito el objetivo de esta propuesta es evaluar el efecto de la concentración y tipo de proteína de la dieta sobre el metabolismo de lípidos a nivel renal y sistémico en un modelo de obesidad genético. La elección del modelo genético obedece a que se podrán magnificar los cambios metabólicos encontrados y disponer de una respuesta más clara hacia las alteraciones encontradas bajo el influjo de estas maniobras dietarias.

Se analizaron en el riñón la expresión de factores de la transcripción (SREBPs) involucrados en la biosíntesis de colesterol y ácidos grasos; así como algunos de sus genes blancos (síntesis de ácidos grasos: FAS; síntesis de colesterol: HMG-CoA reductasa), que son enzimas involucradas en el metabolismo de lípidos. Por otro lado se analizó la expresión de genes involucrados en el proceso de oxidación de lípidos tomando a la carnitin-palmitoil transferasa (CPT-1), inflamación (TNF- $\alpha$  e IL-6) y fibrosis (TGF- $\beta$  y Colágena Tipo IV) y función renal (nefrina y podocina).

El modelo utilizado para este estudio fue la rata Zucker <sup>fa/fa</sup>, la cual se caracteriza por la pérdida genética de la función del receptor de leptina y desarrolla obesidad, hipertrigliceridemia e hiperinsulinemia severa.<sup>74</sup>

## **CAPÍTULO II**

### **OBJETIVOS**

#### **2.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de la concentración y tipo de proteína en la dieta sobre la expresión de genes involucrados en el metabolismo de lípidos a nivel renal y sistémico, en el proceso inflamatorio y la formación de fibrosis en tejido renal.

#### **2.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

- Realizar la extracción del ARN del tejido renal mediante la técnica de extracción con sarcosil-tiocianato de guanidina-cloruro de cesio, corroborando la pureza e integridad.
- Analizar en el tejido renal la expresión génica de factores de transcripción (SREBPs) involucrados en la biosíntesis del colesterol y ácidos grasos; así como algunos de sus genes blancos.
- Analizar en el tejido renal la expresión génica de factores de transcripción involucrados en el proceso inflamatorio.
- Analizar en el tejido renal la expresión génica de factores de transcripción involucrados en el proceso de formación de fibrosis
- Analizar en el tejido renal la expresión génica de factores de transcripción relacionados con la oxidación de lípidos (CPT-1).
- Analizar en el tejido renal la expresión génica de las proteínas relacionadas con la filtración glomerular (Nefrina y Podocina), para evaluar el daño renal.
- Analizar los parámetros bioquímicos del perfil de lípidos (colesterol y triglicéridos en suero) en ratas Zucker <sup>fa/fa</sup> sometidas a los tratamientos dietarios.

- Determinar la función renal mediante el análisis de parámetros bioquímicos como: niveles séricos de creatinina, depuración de creatinina y el porcentaje expansión mesangial.
- Evaluar alteraciones en la estructura renal mediante análisis histopatológicos.

## CAPÍTULO III

### MARCO TEÓRICO

#### 3.1 OBESIDAD

Según la Norma Oficial Mexicana *NOM-174-SSA1-1998, Para el manejo integral de la obesidad*; la obesidad se define como la enfermedad caracterizada por el exceso de tejido adiposo en el organismo, resultado de un desequilibrio entre la ingestión y el gasto energético, frecuentemente consecuencia del consumo de dietas con alta densidad energética y una escasa actividad física.<sup>21</sup>

La obesidad constituye un problema sanitario que alcanza proporciones que la definen como pandemia, pues afecta a personas de los cinco continentes, e incrementa el riesgo de sufrir diversas enfermedades.<sup>45</sup>

A nivel nacional de acuerdo a la ENSANUT 2006<sup>21</sup>, el 26 % de los niños entre 5 y 11 años son obesos y en los adultos el 30 % de la población sufre de obesidad. Las tendencias muestran incremento constante de la prevalencia de obesidad a través del tiempo y se observa que esta cada vez se presenta a edades más tempranas.

El índice de masa corporal (IMC) es un indicador simple de la relación entre el peso y la talla que se utiliza frecuentemente para identificar el sobrepeso y la obesidad en los adultos, tanto a nivel individual como poblacional. Se calcula dividiendo el peso en kilogramos por el cuadrado de la talla en metros ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ).<sup>45</sup>

El IMC constituye la medida más útil del sobrepeso y la obesidad, pues la forma de calcularlo no varía en función del sexo ni de la edad en la población adulta. No obstante, debe considerarse como una guía aproximativa, pues puede no corresponder al mismo grado de gordura en diferentes individuos.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define el sobrepeso como un IMC igual o superior a 25, y la obesidad como un IMC igual o superior a 30. Estos umbrales sirven de referencia para las evaluaciones individuales, pero hay

pruebas de que el riesgo de enfermedades crónicas en la población aumenta progresivamente a partir de un IMC de 21.

Otro parámetro para evaluar la obesidad es la circunferencia de la cintura. La Secretaría de Salud (SSA), clasifica como circunferencia abdominal saludable  $\leq 80$  cm en mujeres y  $\leq 90$  cm en hombres.<sup>21</sup>

La obesidad, y en particular la abdominal, además de ser el mayor factor de riesgo de enfermedades cardiovasculares es el más importante factor de riesgo de la diabetes mellitus tipo II. Según la OMS el riesgo de diabetes tipo II se triplica entre las personas obesas, comparadas con aquellas de peso normal.

Recientemente se ha considerado a la obesidad como un factor de daño renal. Esta relación empieza a establecerse, en primer lugar, porque la hipertensión y la diabetes (enfermedades relacionadas con la obesidad) son las primeras causas de insuficiencia renal crónica y/o tratamiento renal sustitutivo.<sup>58</sup>

Desde el punto de vista histológico, la obesidad puede agravar lesiones renales ya existentes, pero se caracteriza fundamentalmente por presentar unas lesiones glomerulares. Algunas de estas lesiones pueden ser: incremento de la matriz mesangial, proliferación de las células mesangiales e hipertrofia y fusión parcial de los podocitos. La aparición de estas lesiones podría estar condicionada por varios factores incluyendo el tiempo de evolución de la obesidad, diferente predisposición genética o enfermedades asociadas. La pérdida de peso es el tratamiento de elección de las lesiones renales de la obesidad.<sup>58</sup>

### 3.2 SÍNDROME METABÓLICO

El síndrome metabólico constituye una de las principales causas de morbimortalidad en la población<sup>29</sup>. No se trata de una única enfermedad, sino de una asociación de problemas de la salud, que pueden aparecer en forma simultánea o secuencial en un mismo individuo. Estos problemas de salud pueden estar causados por factores genéticos y ambientales asociados al estilo de vida, especialmente la mala alimentación o sobreingestión calórica (que trae como consecuencia el exceso de grasa corporal, y especialmente abdominal) y la ausencia de actividad física (sedentarismo).<sup>3</sup>

Se le denomina también Síndrome X, en el cual la resistencia a la insulina es el mecanismo fisiopatológico fundamental. Hay 6 componentes del síndrome metabólico que son<sup>15</sup>:

1. Resistencia a la captación de glucosa mediada por la insulina
2. Intolerancia a la glucosa
3. Hiperinsulinemia
4. Aumento de triglicéridos en las VLDL
5. Disminución del colesterol de las HDL
6. Hipertensión arterial

La obesidad tiene una estrecha relación con la resistencia a la insulina ya que esta aumenta con el incremento del contenido de grasa corporal, por lo tanto, la obesidad es un factor determinante en el síndrome metabólico

Los factores que pueden predisponer al síndrome metabólico son, en orden de importancia<sup>3</sup>:

1. Edad
2. Factores genéticos
3. Estilo de vida, por ejemplo, sedentarismo y consumo excesivo de calorías (más de las que se gastan diariamente).

Uno de los criterios para diagnosticar el Síndrome Metabólico es la obesidad abdominal.<sup>11</sup> La circunferencia de la cintura es un buen predictor de las complicaciones metabólicas y de riesgo cardiovascular.<sup>29</sup>

Existen diferentes definiciones y criterios para el diagnóstico del Síndrome Metabólico establecidos por instituciones como la OMS (Organización Mundial de la Salud), EGIR (Grupo Europeo de Estudio de Resistencia a la Insulina), American Heart Association, entre otros. La prevalencia del síndrome metabólico varía en dependencia de la definición empleada para determinarla, así como la edad, sexo, origen étnico y estilo de vida.<sup>4</sup>

Se han propuesto diversas estrategias para prevenir la aparición del Síndrome Metabólico. Estos incluyen el aumento de actividad física<sup>39</sup> (como caminar 30 minutos al día), y una dieta reducida en calorías.<sup>23</sup>

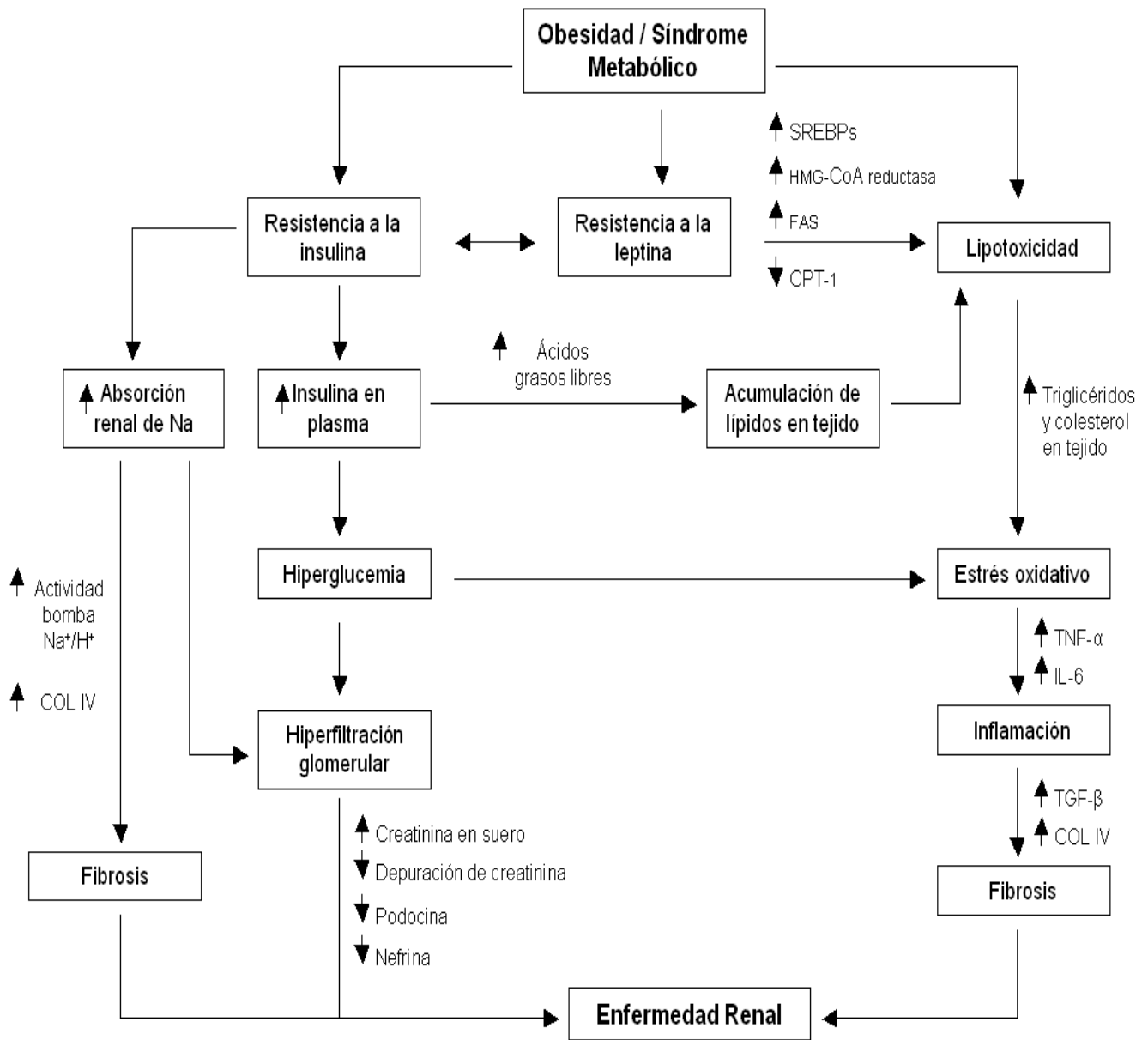
Se sugiere que el consumo diario de leche o productos lácteos pueden reducir a la mitad el riesgo de Síndrome Metabólico.<sup>20</sup>

El tratamiento consiste en la restricción de calorías y actividad física diaria, sin embargo, el tratamiento farmacológico es a menudo necesario<sup>51</sup>. En general las enfermedades que comprenden el Síndrome Metabólico deben tratarse por separado.

Estudios recientes demuestran que alteraciones en la estructura, función y regulación de factores genéticos parecen ser esenciales en la patogénesis del Síndrome Metabólico, en especial la familia de proteínas SREBPs, los cuales son dianas para hormonas como insulina y leptina, factores de crecimiento y señales de inflamación, que al parecer actúan como punto de convergencia de señales a un nivel de regulación genética<sup>15</sup>.

Los mecanismos por los cuales la obesidad y el síndrome metabólico pueden llegar a desencadenar la enfermedad renal se observan en la siguiente figura:





**Figura 3.1 Mecanismos relacionados con el desencadenamiento de la enfermedad renal<sup>72</sup>**

### 3.3 RESISTENCIA A LA INSULINA

La resistencia a la insulina puede ser definida como la condición en la cual, concentraciones fisiológicas de insulina son incapaces de regular apropiadamente los procesos en la homeóstasis de la glucosa y los lípidos, en consecuencia se produce una elevación de la insulina en el plasma, denominada hiperinsulinemia. Estas condiciones afectan principalmente la adiposidad, los lípidos, las lipoproteínas, la presión arterial y la tolerancia a la glucosa.<sup>29</sup>

La resistencia a la acción de la insulina se asocia a una serie de entidades que incluyen a la diabetes mellitus tipo 2, obesidad, hipertensión arterial y síndrome metabólico.<sup>7</sup> Existen factores nutricionales y no nutricionales que pueden predisponer a un estado de resistencia a la insulina, como el sedentarismo, la ingestión de dietas hipercalóricas, la edad y la herencia genética.

También se ha observado una relación entre la sensibilidad a la insulina y la concentración de ácidos grasos en el plasma sanguíneo, por lo tanto, alteraciones en el metabolismo de ácidos grasos contribuyen a la resistencia a la insulina.<sup>7</sup>

En la diabetes mellitus tipo 2 hay una combinación de resistencia y deficiencia a la insulina. La secreción de insulina inicialmente es suficiente para compensar los efectos de resistencia, esta situación es difícil de mantener en forma indefinida. Finalmente las células pancreáticas disminuyen su capacidad para mantener un nivel elevado de síntesis y secreción de insulina, apareciendo hiperglucemia postprandial, alteraciones en la tolerancia a la glucosa en ayuno y posterior desarrollo de diabetes mellitus con presencia de hiperglucemia crónica, que por si misma reduce la sensibilidad y secreción de insulina.<sup>27</sup>

En el caso de la relación entre la resistencia a la insulina y la hipertensión arterial, se observa que la hiperinsulinemia secundaria a la resistencia a la insulina ejerce efectos negativos como el aumento de la absorción de sodio, lo que lleva a daño renal, se estimula la actividad de la bomba  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ , que ocasiona alcalosis

intracelular activando factores de crecimiento y aumento de la síntesis de colágeno contribuyendo a la formación de fibrosis.<sup>27</sup>

Otro componente fuertemente relacionado con la resistencia a la insulina es la obesidad. En el tejido adiposo la insulina promueve la captación de triglicéridos. En pacientes obesos la producción de ácidos grasos libres aumenta, promoviendo un aumento en el tejido adiposo.

Las medidas para disminuir la resistencia a la insulina se basan principalmente en modificaciones al estilo de vida como la reducción de peso y el aumento de la actividad física. En algunos casos es necesario recurrir a algunos fármacos como las tiazolidinedionas, las cuales aumentan de manera directa la sensibilidad a la insulina, ya que producen un incremento de glucotransportadores.<sup>27</sup>

### 3.4 DIABETES MELLITUS

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica, no transmisible de gran impacto para la salud y a nivel socio-económico a nivel mundial y para la cual aún no existe cura. Es una enfermedad metabólica causada por una deficiencia de la hormona insulina o por el uso ineficaz de la insulina en el organismo.<sup>26</sup>

Existen 2 tipos de diabetes:

1. Diabetes mellitus tipo 1 (DM1): denominada con frecuencia diabetes juvenil o diabetes insulina-dependiente. El organismo no puede producir insulina.
- 1) Diabetes mellitus tipo 2 (DM2): denominada con frecuencia diabetes adulta o diabetes insulino-independiente. El organismo no puede producir suficiente insulina o no la puede utilizar en forma eficaz para poder funcionar bien. Se sabe que la obesidad juega un papel muy importante en el desarrollo de esta enfermedad.

En todos los tipos de diabetes se altera el metabolismo de los hidratos de carbono, proteínas y lípidos.

La diabetes mellitus tipo 2 esta relacionada con la resistencia a la insulina. La insulina se necesita para que los tejidos metabolicen la glucosa para producir energía. Si éstos son resistentes a la acción de la insulina los niveles de glucosa comienzan a elevarse extracelularmente en el torrente sanguíneo (hiperglucemia). Al elevarse el nivel de glucosa en sangre, el páncreas produce mas insulina para contrarrestar este efecto. Esta situación es difícil de mantener, lo que ocasiona daño en las células pancreáticas reduciendo la secreción de insulina y dando paso al desarrollo de diabetes mellitus tipo 2<sup>26</sup>

Los pacientes diabéticos pueden presentar diversas complicaciones renales. Los altos niveles de glucosa en sangre, producen hiperfiltración renal, ocasionando daño glomerular e inflamación. Si el daño continúa, se reducen los niveles de filtración glomerular, el daño evoluciona a fibrosis, hasta producir la perdida

irreversible de la función renal, conocida como insuficiencia renal crónica. La diabetes es la principal causa de la insuficiencia renal crónica.<sup>14</sup>

### **3.5 LIPOTOXICIDAD**

La lipotoxicidad es un padecimiento reciente, vinculado a la epidemia de obesidad y diabetes, causado por la acumulación de lípidos que deberían ser almacenados en los adipositos, en tejidos como el páncreas, hígado y riñón, entre otros.

Para prevenir la lipotoxicidad se han diseñado tres estrategias. La primera consiste disminuir la ingestión de ácidos grasos e hidratos de carbono, si se disminuye el exceso de nutrimentos se evita el exceso de grasa. La segunda consiste en aumentar la capacidad de almacenamiento de tejido adiposo y multiplicar el número de adipocitos, esto se logra administrando fármacos como las tiazolidinedionas. Finalmente la tercera opción, metabolizar los ácidos grasos libres para evitar su almacenamiento haciendo ejercicio.<sup>62</sup>

Actualmente es bien conocido que la lipotoxicidad está íntimamente relacionada con la resistencia a la insulina. El aumento de los ácidos grasos libres en el tejido promueve su captación y oxidación, y se usan como fuente de energía en competencia con la glucosa y se reduce la secreción de insulina<sup>42</sup>. Si bien no se conoce el mecanismo mediante el cual los ácidos grasos libres producen una menor secreción de insulina; se ha postulado que este se debería a: 1) Menos actividad de los transportadores de glucosa, principalmente los encargados de la reabsorción de glucosa a nivel renal (GLUT2) y 2) Cambios en las vías metabólicas normales de los lípidos. El aumento de los ácidos grasos libres debido a una lipólisis excesiva, produce disminución de malonil CoA y de los derivados acilos de la coenzima A necesarios para la liberación de insulina.<sup>18</sup>

Además parece que los ácidos grasos libres reducen la afinidad de la insulina a sus receptores, de manera que disminuye la acción de esta en los tejidos insulinosensibles y aumenta la concentración de glucosa en plasma, a esto se le conoce como hiperglucemia.<sup>18</sup>

La hiperglucemia *per se* induce hiperfiltración glomerular, lo que puede conducir a diversas nefropatías.

Diversos estudios han mostrado que el exceso de lípidos en el tejido renal, estimulan la proliferación de células mesangiales y de matriz extracelular del glomérulo renal. Por otro lado la acumulación de lípidos provoca una oxidación excesiva de estos, el cual tiene como consecuencia la producción de radicales libres, los cuales pueden ocasionar estrés oxidativo, inflamación del tejido y posterior fibrosis, lo que ocasiona la pérdida de la función renal.<sup>13</sup>

En pacientes con obesidad se han encontrado perfiles genéticos relacionados con el metabolismo de lípidos que no se expresan en pacientes delgados, lo que sugeriría una relación causa - efecto entre estos perfiles y las lesiones glomerulares de la obesidad.

Otra de las posibles causas de que ocurran ciertos desordenes en la liporegulación los cuales dan lugar a la lipotoxicidad es la resistencia a la leptina que se desarrolla en la obesidad.

### 3.6 LEPTINA

La leptina es una proteína de 167 aminoácidos, que incluyen un péptido señal de 21 aminoácidos. Su estructura tridimensional presenta cuatro hélices alfa y un puente disulfuro entre las cisteína en posición 96 y 146, siendo este último necesario para la actividad biológica de la hormona.

La leptina, es también conocida como proteína Ob. Es una hormona producida en su mayoría por los adipocitos (células grasas) aunque también se expresa en el hipotálamo, el ovario y la placenta.<sup>24</sup>

Fue descubierta en 1994 en el ratón. Posteriormente, el gen Ob humano se localizó en el  cromosoma 7. Se cree que la leptina actúa como un lipóstato: cuando la cantidad de grasa almacenada en los adipocitos aumenta, se libera leptina en el flujo sanguíneo, lo que constituye una señal que informa al hipotálamo que el cuerpo tiene bastante comida y que debe inhibir el apetito. Cuando aumenta la masa de tejido adiposo más allá del punto de equilibrio, aumenta la síntesis y secreción de leptina por lo que se estimulan varios efectos compensadores en el hipotálamo: la disminución del apetito por estimulación de péptidos anorexigénicos (que producen pérdida de apetito) y supresión de la producción de los péptidos orexigénicos (del griego orexis que significa apetito); aumento el gasto energético aumentando la tasa de metabolismo basal y la temperatura corporal además de la modificación del punto de equilibrio hormonal para reducir la lipogénesis (producción de grasas) y aumentar la lipólisis (uso de grasa acumulada para producir energía) en el tejido adiposo. La regulación de la secreción de leptina es a largo plazo, principalmente por variación del nivel de masa corporal y efectos estimulantes de la insulina.<sup>19,56</sup>

Los niveles séricos de leptina en personas con peso normal oscilan en el rango de 1-15 ng/mL, aunque en individuos con un índice de masa corporal (IMC) superior a 30 se pueden encontrar valores de 30 ng/mL o incluso superiores.

La eliminación de la leptina se lleva a cabo principalmente por vía renal. La leptina es metabolizada especialmente por las células epiteliales renales, por esta razón su concentración aumenta en pacientes con insuficiencia renal.<sup>24</sup>

En la obesidad se va desarrollando una resistencia adquirida a las acciones de la leptina lo que puede ocasionar desordenes en la liporegulación, dando lugar a lipotoxicidad, resistencia a la insulina y diabetes.<sup>40</sup>

Algunos modelos animales genéticamente modificados (ob/ ob), que carecen de receptores funcionales para leptina, son hiperfágicos, obesos y diabéticos.

Estudios recientes postulan a la leptina como principal hormona liporeguladora. La leptina disminuye la actividad de los factores de transcripción lipogénicos, principalmente de la proteína SREBP-1. De esta manera, induce la disminución de la expresión de las enzimas lipogénicas ACC y FAS, incrementando la expresión de enzimas clave en la oxidación de ácidos grasos con la CPT-1.<sup>68</sup>

Cuando existe resistencia a la leptina se incrementa la síntesis de triglicéridos y ácidos grasos, bloqueando simultáneamente su oxidación.<sup>68</sup>

Para entender como actúa esta serie de estos factores genéticos en el daño renal, es necesario conocer las rutas metabólicas de síntesis y oxidación de lípidos.



## 3.7 METABOLISMO DE LÍPIDOS

### 3.7.1 COLESTEROL <sup>41</sup>

El colesterol es un lípid encontrado en los tejidos corporales y en el plasma sanguíneo de los vertebrados e invertebrados. Se encuentra en altas concentraciones en el hígado, médula espinal, cerebro, piel y glándulas adrenales. Es un lípido esteroide, formado por una molécula de ciclopentanoperhidrofenantreno, constituida por cuatro ciclos de carbono condensados (Figura 3.2):

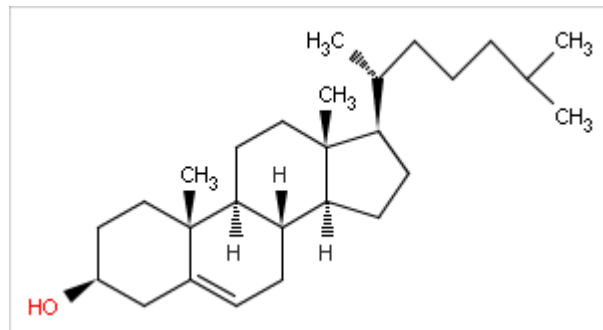


Figura 3.2 Estructura química del colesterol <sup>41</sup>

El ser humano obtiene el colesterol a través de dos vías:

1. Vía exógena: Directamente a través de los alimentos. Los alimentos que contienen colesterol son exclusivamente los de origen animal, sobre todo la yema de huevo, hígado, sesos y carnes rojas.
2. Vía endógena: La síntesis en el hígado.

La producción de colesterol es regulada directamente por la concentración del colesterol presente en el retículo endoplásmico de las células. Una alta ingestión de colesterol en los alimentos conduce a una disminución neta de la producción endógena y viceversa. El principal mecanismo regulador de la homeóstasis de colesterol celular reside en las proteínas SREBPs. Entre los genes regulados por

los SREBPs destacan el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) y la HMG-CoA-reductasa, la enzima limitante en la vía biosintética del colesterol.

Debido a la gran insolubilidad del colesterol en agua, como la mayoría de los lípidos, el transporte de colesterol por la sangre, se realiza a través de las lipoproteínas.

La concentración actualmente aceptada como normal de colesterol en el plasma sanguíneo (colesterolemia) de individuos sanos es de 150 a 200 mg/dL. Cuando esta concentración aumenta se habla de hipercolesterolemia.

### **3.7.2 BIOSÍNTESIS DE COLESTEROL <sup>41</sup>**

La biosíntesis del colesterol tiene lugar en el citoplasma de los hepatocitos de todas las células de los animales vertebrados.

El colesterol se forma a partir del acetil-CoA en cuatro fases. Los principales pasos de la síntesis de colesterol son:

1. El acetil-CoA se convierte en mevalonato, mediante la enzima HMG-CoA reductasa.
2. El mevalonato se convierte en escualeno mediante reacciones catalizadas por la mevalonato descarboxilasa.
3. El escualeno se transforma en lanosterol, mediante la escualeno ciclasa.
4. El lanosterol se convierte en colesterol después de unas 20 reacciones sucesivas, enzimáticamente catalizadas.

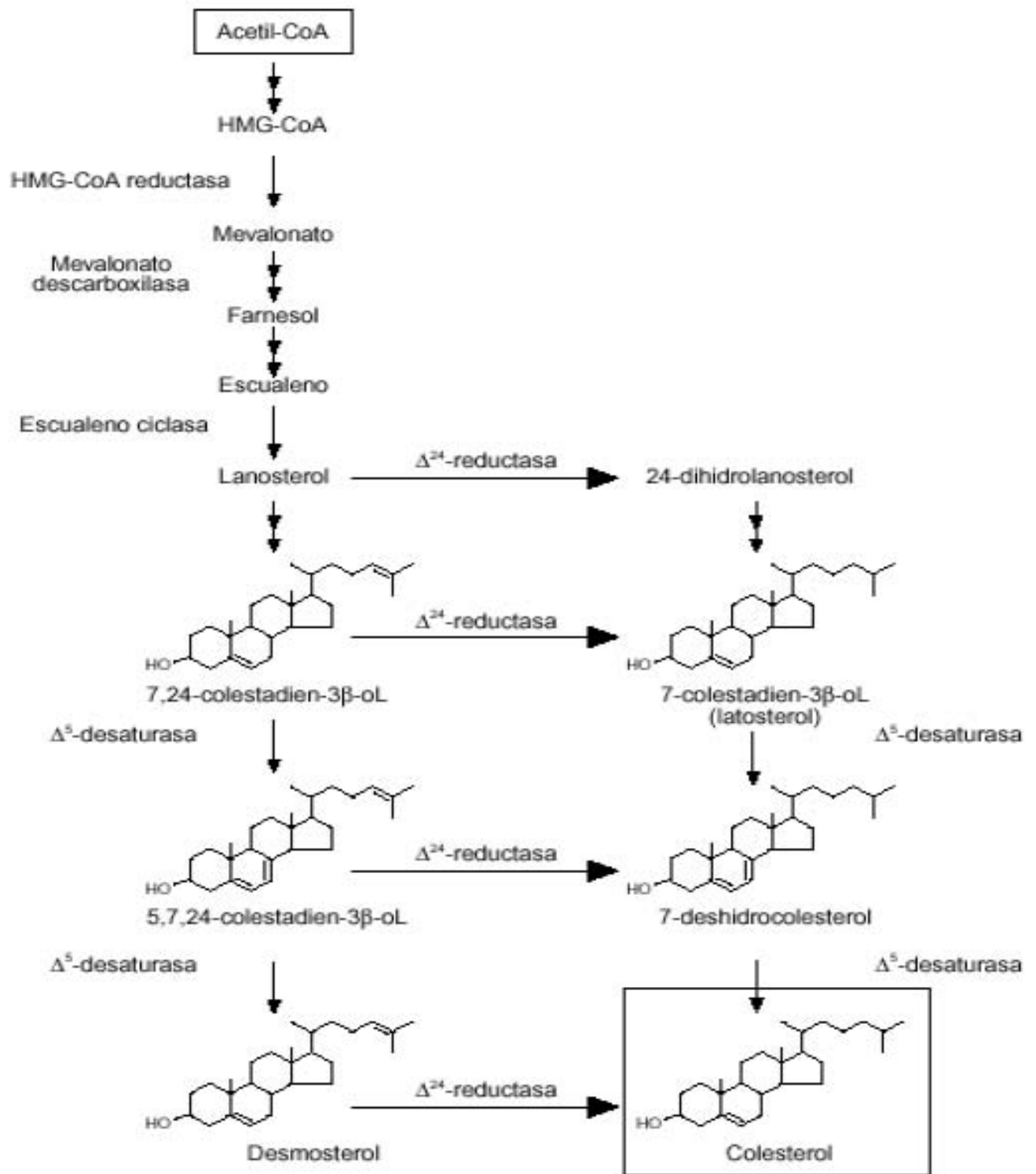


Figura 3.3 Síntesis del colesterol<sup>41</sup>

La síntesis del colesterol es un proceso complejo y energéticamente caro. El paso limitante en la ruta del colesterol es la conversión de  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilglutaril-CoA en mevalonato, siendo la enzima que cataliza esta reacción, la HMG-CoA reductasa. La HMG-CoA reductasa está regulada hormonalmente. La enzima existe en sus formas fosforilada (inactiva) y desfosforilada (activa). El glucagón estimula la fosforilación (inactivación) mientras que la insulina promueve la desfosforilación activando la enzima y favoreciendo la síntesis del colesterol.

La producción no regulada de colesterol puede ser causa de enfermedades graves. Cuando la suma del colesterol sintetizado más el obtenido en la dieta supera la cantidad requerida para la síntesis de membranas, sales biliares y esteroides, se desarrollan acumulaciones patológicas de colesterol en los vasos sanguíneos con el resultado de obstrucción de los vasos sanguíneos conocido como aterosclerosis.

La forma como la célula reconoce los niveles de colesterol es a través de una familia de factores de transcripción *SREBP* que regulan a varios genes involucrados en la biosíntesis y captura de los lípidos. Hay tres isoformas de la proteína *SREBP*, las cuales han sido identificadas y caracterizadas, *SREBP-1a*, *SREBP-1c* y *SREBP-2*. La isoforma *SREBP-2* activa los genes involucrados en la síntesis de colesterol.<sup>44</sup>

### **3.7.2.1 *SREBP-2* (Proteínas de unión a los elementos de respuesta a esteroides)<sup>31,44</sup>**

Las proteínas *SREBPs* activan directamente la expresión de más de 30 genes dedicados a la síntesis y captación de colesterol, ácidos grasos, triglicéridos y fosfolípidos, así como el cofactor NADPH requerido para la síntesis de estas moléculas.

La isoforma *SREBP-2* activa preferentemente genes involucrados en la síntesis de colesterol, tales como el gen que codifica para la enzima de la 3-hidroxi-3-

metilglutaril-CoA-sintasa (HMG-CoA sintasa, HMG-CoA reductasa, la sintasa farnesil-difosfato y la sintasa de escualeno.

Uno de los sitios de mayor importancia en la biosíntesis del colesterol y en su regulación mediada a través de la SREBP-2, es el que se da a nivel de la enzima HMG-CoA reductasa.

### 3.7.2.2 HMG-CoA REDUCTASA (3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa)

La HMG-CoA reductasa, es una de las enzimas clave en la ruta metabólica del mevalonato, la cual esta implicada en la síntesis de esteroides, isoprenoides y otros lípidos . Esta enzima se encuentra anclada en la membrana del retículo endoplásmico y tiene siete dominios transmembranales.

En los humanos el gen que codifica para esta enzima se localiza en el quinto cromosoma.

La enzima HMG-CoA reductasa cataliza la siguiente reacción:<sup>54</sup>



La HMG-CoA reductasa requiere NADPH como cofactor, y se consumen dos moles de NADPH durante la conversión de HMG-CoA a mevalonato. Esta reacción es el paso limitante de la biosíntesis del colesterol, y esta enzima está sujeta a controles de regulación muy complejos.

La enzima es controlada por mecanismos distintos: control de la expresión del gen, índice de degradación de la enzima y fosforilación-defosforilación. Los primeros dos mecanismos de control son ejercidos por el mismo colesterol. El colesterol actúa como inhibidor de la actividad de la HMG-CoA reductasa preexistente así como induciendo la degradación rápida de la enzima.

La transcripción del gen HMGR-CoA reductasa es regulado por la proteína SREBP-2. Cuando la SREBP-2 esta inactiva se encuentra anclada en el retículo endoplásmico o en la membrana nuclear. Cuando los niveles de colesterol bajan, la SREBP se desprende de la membrana por proteólisis y migra hasta el núcleo para comenzar la transcripción. Si los niveles de colesterol aumentan, la proteólisis en la membrana cesa y cualquier proteína en el núcleo es rápidamente degradada.<sup>47,48</sup>

La regulación de la por modificación covalente ocurre como resultado de la fosforilación- defosforilización. La fosforilación de la enzima disminuye su actividad. La HMG reductasa es fosforilada por la proteína-cinasa activada por el AMP (AMPK, por sus siglas en inglés).

La actividad de la HMG reductasa se controla además por la vía de señalización del AMPc. El aumento de insulina lleva a una disminución del AMPc, lo que lleva a la activación de la síntesis de colesterol. Alternativamente, el glucagon y la epinefrina, que aumentan el nivel del AMPc, e inhiben síntesis del colesterol, por lo tanto, estas hormonas regulan indirectamente la actividad de la HMG-CoA reductasa.<sup>32,35</sup>

Algunos fármacos pueden actuar como inhibidores de esta enzima, y son comúnmente utilizados para el tratamiento de pacientes con altos niveles de colesterol en sangre y enfermedades cardiovasculares.

### 3.7.3 ÁCIDOS GRASOS<sup>41,70</sup>

Un ácido graso es una biomolécula orgánica de naturaleza lipídica formada por una cadena hidrocarbonada lineal, de número par de átomos de carbono, en cuyo extremo hay un grupo carboxilo. Cada átomo de carbono se une al siguiente y al precedente por medio de un enlace covalente sencillo o doble. Al átomo de su extremo le quedan libres tres enlaces que son ocupados por átomos de hidrógeno

(H<sub>3</sub>C-). Los demás átomos tienen libres dos enlaces, que son ocupados igualmente por átomos de hidrógeno ( ...-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- ...).

En general, se puede describir un ácido graso genérico como R-COOH, en donde R es la cadena hidrocarbonada que identifica al ácido en particular.

Existen dos tipos de ácidos grasos conocidos como saturados e insaturados. Los ácidos grasos saturados constan de una cadena hidrocarbonada, cuyos carbonos se encuentran unidos entre sí por enlaces covalentes sencillos únicamente, tienden a formar cadenas extendidas y a ser sólidos a temperatura ambiente, excepto los de cadena corta. Los ácidos grasos insaturados, son ácidos grasos con dobles enlaces entre carbonos y suelen ser líquidos a temperatura ambiente.

Los ácidos grasos forman parte de los fosfolípidos y glucolípidos, moléculas que constituyen la bicapa lipídica de todas las membranas celulares. En los mamíferos, incluido el ser humano, la mayoría de los ácidos grasos se encuentran en forma de triglicéridos, moléculas donde los extremos carboxílico (-COOH) de tres ácidos grasos se esterifican con cada uno de los grupos hidroxilos (-OH) del glicerol). Los triglicéridos se almacenan en el tejido adiposo.

Los ácidos grasos son moléculas muy energéticas y necesarias en todos los procesos celulares en presencia de oxígeno, ya que por su contenido en hidrógenos pueden oxidarse en mayor medida que los glúcidos u otros compuestos orgánicos que no están reducidos.

Cuando es demasiado bajo el nivel de insulina o no hay suficiente glucosa disponible para utilizar como energía en los procesos celulares, el organismo metaboliza ácidos grasos para ese fin.

Algunos ácidos grasos son precursores de las prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, moléculas con una gran actividad biológica, que intervienen en la regulación y control de numerosos procesos vitales, como la respuesta

inflamatoria, regulación de la temperatura corporal, procesos de coagulación sanguínea, contracción del músculo liso, etc.

La alimentación es una fuente importante de ácidos grasos. Esta contribución es vital para mantener un nivel de lípidos estable y para suministrar al cuerpo los ácidos grasos esenciales. Los ácidos grasos calificados de *esenciales* incluyen los omega-3 y omega-6. El cuerpo humano no puede sintetizarlos, o los sintetiza en cantidades insuficientes, es necesaria por tanto una contribución mínima y regular por medio de la alimentación.

### 3.7.4 BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS <sup>41,70</sup>

El primer paso en la biosíntesis de ácidos grasos es la síntesis de ácido palmítico, ácido graso saturado de 16 carbonos; los demás ácidos grasos se obtienen por modificaciones del ácido palmítico.

El ácido palmítico se sintetiza secuencialmente en el citosol de la célula, gracias a la acción de la enzima FAS, por adición de unidades de dos carbonos aportadas por el acetil coenzima A; el proceso completo consume 7 ATP y 14 NADPH; la reacción global es la siguiente:<sup>2</sup>



La fuente principal de acetil-CoA proviene del citrato, que es transportado desde la matriz mitocondrial al citosol por un transportador específico de la membrana interna mitocondrial; una vez en el citosol, el citrato es transformado en oxalacetato y acetil-CoA, reacción que consume 1 ATP. El poder reductor, en forma de NADPH, lo suministra la ruta de la pentosa fosfato.



En realidad, las unidades de dos carbonos que se añaden secuencialmente son aportadas por el malonil-CoA que, a su vez, es sintetizado por la enzima acetil-CoA carboxilasa, que adiciona un grupo carboxilo al acetil-CoA.

El cuerpo humano puede sintetizar casi todos los ácidos grasos que requiere a partir del ácido palmítico, mediante la combinación de estos mecanismos:

- **Alargamiento.** Mediante este proceso, que tienen lugar en el retículo endoplasmático y en la mitocondrias, se adicionan unidades de dos carbonos a la cadena de C<sub>16</sub> del ácido palmítico, obteniéndose ácidos grasos de hasta C<sub>24</sub>.
- **Desaturación.** Mediante este proceso, que se produce en el retículo endoplasmático, se introducen dobles enlaces *cis* en la cadena hidrocarbonada de ácidos grasos saturados; el proceso es complejo e implica al NADPH, al citocromo b<sub>5</sub> y diversos enzimas.

#### 3.7.4.1 SREBP-1

Como se mencionó anteriormente la familia de factores de transcripción SREBP, regulan el metabolismo y homeostasis de lípidos.

La isoforma SREBP-1 activa preferentemente a los genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos, incluyendo al gene de la enzima ACC y la enzima FAS, siendo este último el más importante.<sup>44</sup>

#### 3.7.4.2 FAS (Sintasa de ácidos grasos)<sup>2,59</sup>

Los ácidos grasos son fundamentales para la producción y almacenamiento de energía, estructuras celulares y como intermediarios en la biosíntesis de hormonas y otras moléculas de importancia biológica. Son sintetizados a partir de una serie de descarboxilaciones y reacciones de condensación. Una de la principales enzimas implicadas en la síntesis de ácidos grasos es la FAS.

La sintasa de ácidos grasos (FAS) es un sistema enzimático de 272 kDa, la cual contiene tres dominios catalíticos. En los mamíferos, FAS consiste de dos cadenas idénticas de polipéptidos, y sus tres dominios catalíticos se encuentran en el extremo N-terminal.

La sintasa de ácidos grasos cataliza la siguiente reacción, en la ruta metabólica de la síntesis de ácidos grasos:



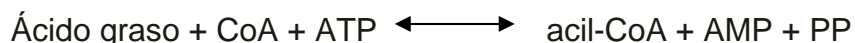
El principal ácido graso sintetizado por la FAS es el palmitato. El palmitato entonces es liberado desde la enzima y puede ser elongado y/o desaturado para producir otras moléculas de ácidos grasos.

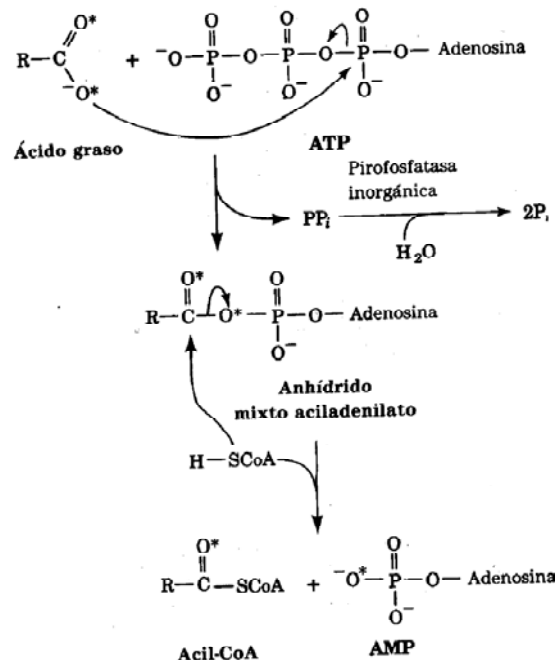
El metabolismo y homeóstasis de la sintasa de ácidos grasos es regulada transcripcionalmente SREBP-1, su actividad también es regulada por la insulina por los periodos de ingestión y ayuno. La insulina estimula la síntesis de FAS, mientras que, el ayuno lleva a una disminución en la síntesis de estas enzimas.

### 3.7.5. OXIDACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS <sup>41,70</sup>

Una de las principales funciones de los ácidos grasos es la de proporcionar energía a la célula a partir de los depósitos de triglicéridos.

Antes de que puedan oxidarse los ácidos grasos deben “activarse” para que suceda una reacción de acilación dependiente de ATP, a fin de formar acil-CoA. Este proceso de “activación” está catalizado por una familia de, al menos, tres acil-CoA sintetetasas (llamadas también tiocinasas). Estas enzimas, que se hallan asociados con el retículo endoplasmático o con la membrana mitocondrial externa, catalizan la reacción





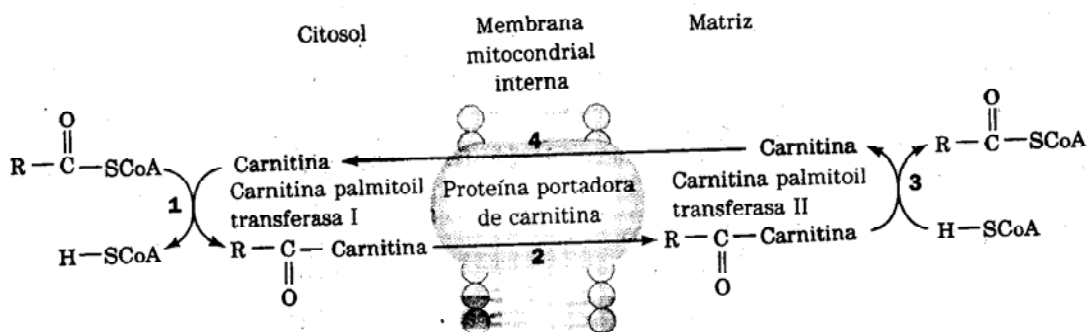
**Figura 3.4 Mecanismo de “activación” de un ácido graso catalizado por la acil-CoA sintasa <sup>70</sup>**

Aunque los ácidos grasos se activan para su oxidación en el citosol, se oxidan en la mitocondria. La membrana mitocondrial interna es impermeable a los acil-CoA, por lo tanto, debe usarse un transportador, la carnitina, para traslocar las moléculas de acil-CoA al interior de la matriz mitocondrial.

La carnitina, también reconocida como vitamina B11, es un aminoácido que participa en el circuito vascular reduciendo niveles de triglicéridos y colesterol en sangre. Se produce naturalmente en el hígado a partir de los aminoácidos L-metionina y la L-lisina.

La carnitina se encarga de llevar los grupos acilo al interior de la matriz mitocondrial por medio del siguiente mecanismo:

1. La enzima CPT I une una molécula de acil-CoA a la carnitina originando la acilcarnitina.
2. La translocasa, una proteína transportadora de la membrana mitocondrial interna, transloca la acilcarnitina a la matriz mitocondrial.
3. La acil-CoA se regenera por la carnitina palmitoiltransferasa II.
4. La carnitina se devuelve al espacio intermembrana por la proteína transportadora y reacciona con otro acil-CoA.



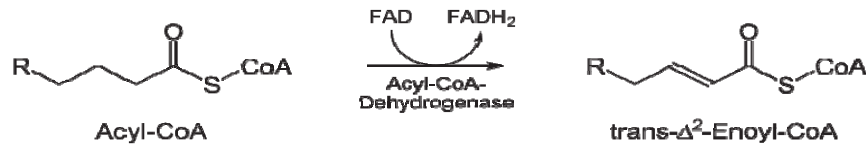
**Figura 3.5 Transporte de los ácidos grasos al interior de la mitocondria <sup>70</sup>**

Una vez que la molécula de acil-CoA se encuentra dentro de la matriz mitocondrial, se lleva a cabo la  $\beta$ -oxidación. Este proceso ocurre mediante cuatro reacciones:

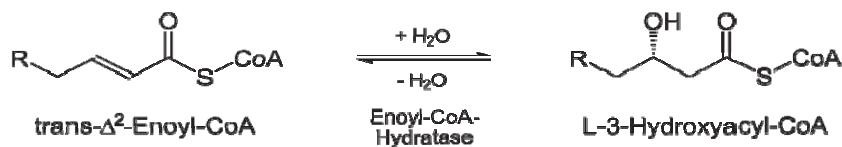
1. Formación de un enlace doble trans- $\alpha,\beta$  mediante deshidrogenación que cataliza una enzima flavínica, la acil-CoA deshidrogenasa.
2. Hidratación del enlace doble por la enoil-CoA hidratasa, para formar 3-L-hidroxiacil-CoA.
3. Deshidrogenación del  $\beta$ -hidroxiacil-CoA, anterior por la 3-L-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa con formación del correspondiente  $\beta$ -cetoacil-CoA.
4. Escisión del enlace  $C\alpha-C\beta$ , en una reacción de tiólisis con CoA, catalizada por la  $\beta$ -cetoacil-CoA tiolasa a fin de formar acetil-CoA y

un acil-CoA nuevo que contiene dos átomos de C menos que el original.

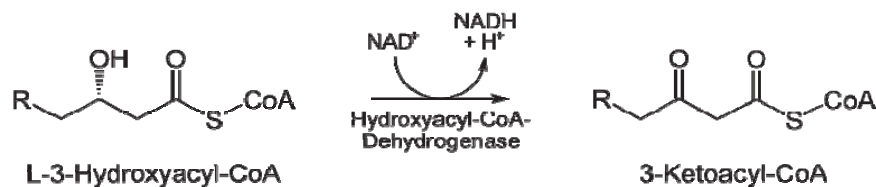
1. El primer paso es la oxidación del ácido graso por la acil-CoA deshidrogenasa. La enzima cataliza la formación de un doble enlace entre C-2 (carbono  $\alpha$ ) y C-3 (carbono  $\beta$ ).



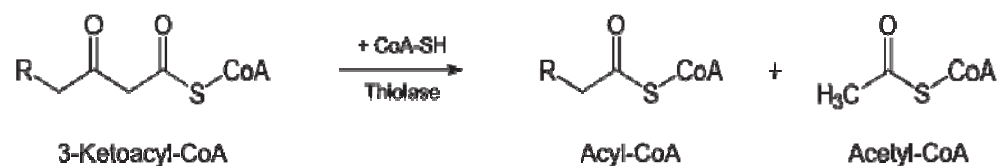
2. El siguiente paso es la hidratación del enlace entre C-2 y C-3.



3. El tercer paso es la oxidación del L-3-hidroxiacil CoA por el  $\text{NAD}^+$ , lo que convierte el grupo hidroxilo ( $-\text{OH}$ ) en un grupo cetona ( $=\text{O}$ ).



4. El paso final es la separación del 3-cetoacil CoA por el grupo tiol de otra molécula de CoA. El tiol es insertado entre C-2 y C-3. Se obtiene una molécula de acetil- CoA.



Los cuatro pasos anteriores constituyen un ciclo de la  $\beta$ -oxidación. Durante cada ciclo posterior se separa un fragmento de 2 carbonos, llamado acetil-CoA, el ciclo continúa hasta que en su último ciclo se rompe una acil-CoA de cuatro carbonos para formar dos moléculas de acetil-CoA.

Las moléculas de acetil-CoA se van al ciclo del ácido cítrico (ciclo de Krebs), para la producción de energía o a la síntesis de isoprenoides.

### 3.7.5.1 CPT-1 (Carnitina Palmitoil Transferasa 1)<sup>41,70</sup>

La carnitina palmitoiltransferasa I (CPT-1) es una enzima mitocondrial. En el músculo y otros tejidos no hepáticos, se encuentra unida lábilmente a la membrana mitocondrial externa, y participa en el transporte de ácidos grasos desde el citosol a la matriz mitocondrial, uniéndolos a moléculas de carnitina. Este proceso está regulado por malonil-CoA, el inhibidor fisiológico de CPT 1.

La oxidación de los ácidos grasos ocurre en la mitocondria. El transporte de la acil-CoA grasa al interior de la mitocondria se logra vía un intermediario de acil-carnitina, el que es generado por acción de la carnitina aciltransferasa I. La molécula de acil-carnitina es entonces transportada a la mitocondria en donde la carnitina aciltransferasa II cataliza la regeneración de la molécula de acil-CoA grasa.



Se conocen tres genes que codifican distintas isoformas de carnitina palmitoiltransferasas tipo I.

La carnitina palmitoiltransferasa 1A ( CPT IA, CPT 1A ) es la forma que se obtuvo de hígado. El gen que la codifica se localiza en el cromosoma 11. Se localiza en la membrana mitocondrial externa.

La carnitina palmitoiltransferasa IB ( CPT IB, CPT1B ) es la forma que se obtuvo de músculo. Su gen se localiza en el cromosoma 22. Se han descrito 4 variantes de mRNA, que originan 2 isoformas distintas conocidas de CPT IB ( CPT IBa y CPT IBb ). Se localiza en la membrana mitocondrial externa.

La carnitina palmitoiltransferasa IC ( CPT IC) es una forma poco conocida de la enzima. Su gen se localiza en el cromosoma 19 ( 19q13.33 ). Se desconoce su localización subcelular. No se ha descrito en membrana mitocondrial.

Diversos estudios presentan a la enzima CPT 1 como potencial diana para el tratamiento de la obesidad y la diabetes tipo 2.

Las deficiencias en esta enzima afectan sobre todo al hígado y llevan a la disminución en la oxidación de ácidos grasos y a cetogénesis. La deficiencia de CPT-I resulta en dolor muscular recurrente y fatiga y mioglobinuria luego del ejercicio vigoroso. Las aciltransferasas de carnitina se pueden también inhibir por las drogas sulfonilurea tales como tolbutamida y gliburide.

En el proceso de oxidación mitocondrial de ácidos grasos se liberan especies reactivas de oxígeno (EROs), las cuales reaccionan con las lipoproteínas, transformándose en lipoproteínas oxidadas. La formación de lipoproteínas oxidadas parece ser la vía más importante del daño renal causado por lípidos. La formación a nivel glomerular de oxígeno, activa la secreción de diversas citocinas proinflamatorias.

### 3.8 INFLAMACIÓN <sup>46,49</sup>

La inflamación es la forma de manifestarse de muchas enfermedades. Se trata de una respuesta inespecífica frente a las agresiones del medio, y está generada por los agentes inflamatorios. La respuesta inflamatoria ocurre sólo en tejidos conectivos vascularizados y surge con el fin defensivo de aislar y destruir al agente dañino, así como reparar el tejido u órgano dañado.

El mayor problema que surge de la inflamación es que la defensa se dirija tanto hacia agentes dañinos como a no dañinos, de manera que provoque lesión en tejidos u órganos sanos.

El proceso de inflamación sigue la siguiente secuencia

Activador → Precursor → Mediador → Efector → Efecto

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Colágeno subendotelial</li> <li>• Cuerpos extraños</li> <li>• Microorganismos</li> <li>• Células muertas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Células endoteliales</li> <li>• Plaquetas</li> <li>• Leucocitos</li> <li>• Macrófagos</li> <li>• Linfocitos</li> <li>• Mastocitos</li> <li>• Fibroblastos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Factor de necrosis tumoral (TNF)</li> <li>• Interleucinas</li> <li>• Interferones</li> <li>• Factor de crecimiento de plaquetas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Moléculas de adhesión</li> <li>• Radicales libres</li> <li>• Fosfolipasa A</li> <li>• Derivados del ácido araquidónico</li> <li>• Enzimas lisosomales</li> <li>• Oxido nítrico</li> <li>• Complemento o activado</li> <li>• Quininas, serotonina, histamina</li> <li>• Colágeno</li> <li>• Fibrina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dilatación</li> <li>• Agregación celular</li> <li>• Microtrombosis</li> <li>• Angiogenesis</li> <li>• Fiebre</li> <li>• Fibrosis</li> </ul>
--	---	---	--	--

**Tabla 3.1 Secuencia del proceso inflamatorio <sup>49</sup>**



Cuando está presente algún agente extraño o cuando se libera el contenido celular por algún daño al tejido, los agentes activadores interactúan con los precursores modificando su estructura y función, induciéndolo a producir mediadores inflamatorios y efectores.

Los precursores son células o sustancias que existen en forma nativa en los tejidos y están en forma de reposo hasta que son activados y producen mediadores y efectores. Los mediadores son una señal a demanda (solo cuando se necesita), su función es amplificar la respuesta inflamatoria. Los efectores producen el cambio tisular directo y su función es la alteración del comportamiento de los tejidos involucrados en el proceso inflamatorio.

El efecto es el cambio producido en los tejidos debido a la acción de los efectores. Su intensidad depende de la cantidad de mediadores producidos.

El comportamiento celular está gobernado por una serie de sustancias que han sido denominadas colectivamente mediadores de la inflamación porque durante la inflamación su producción está aumentada, aunque muchas participan en la fisiología del glomérulo sano.

En el riñón el estrés oxidativo es la principal causa de las lesiones inflamatorias. Las especies reactivas del oxígeno (EROs) se han identificado como promotores de la respuesta inflamatoria que ocurre en las células mesangiales, debido a que activan la secreción de moléculas proinflamatorias. Las principales moléculas inflamatorias involucradas en el daño glomerular son TNF- $\alpha$  y la IL-6.<sup>13</sup>

### 3.8.1 TNF- $\alpha$ (Factor de necrosis tumoral alfa)

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF alfa) es una citocina que posee propiedades reguladoras, inmunitarias, inflamatorias, antitumorales y que actúa en estrecha coordinación con otras citocinas como las interleucinas. Además de su función inflamatoria y antitumoral se conoce su influencia en la mitogénesis, diferenciación e inmunorregulación de diferentes tipos celulares, lo que sugiere un importante papel de esta citocina en condiciones tanto fisiológicas como patológicas.

El TNF es una proteína de 157 aminoácidos, de unos 17,3 kDa. Su forma activa la constituye un trímero formado por tres subunidades idénticas de 157 aminoácidos que se asocian para formar un trímero con forma de cono.

A bajas concentraciones, el TNF cumple funciones homeostáticas, como la reparación tisular, mientras que a altas concentraciones provoca daño endotelial, microtrombosis y daño tisular. El TNF es un polipéptido de bajo peso molecular derivado principalmente de los monocitos y macrófagos activados y de los linfocitos T.<sup>57</sup>

El gene del TNF se encuentra ubicado en el brazo corto del cromosoma 6.

Las funciones del TNF se deben a su unión a 2 receptores celulares diferentes que se localizan en diferentes células como neutrófilos, células endoteliales y fibroblastos. Estos receptores se conocen como TNF-R1 y TNF-R2. Parece que ambos receptores del TNF participan en la muerte celular, aunque el TNF-R1 es más potente y más frecuentemente responsable de la apoptosis que el TNF-R2.<sup>22</sup>

El TNF esta formado por dos citocinas fuertemente relacionadas, TNF- $\alpha$  y TNF- $\beta$ .

El TNF- $\alpha$  esta formado por 185 aminoácidos. Esta relacionado con los glóbulos rojos de la sangre, el endotelio y otros tejidos en el transcurso de distintas

agresiones celulares como por ejemplo las infecciones. En algunos órganos como el riñón, aumenta la resistencia a la insulina.<sup>12</sup>

La liberación de TNF- $\alpha$  produce activación local del endotelio vascular, liberación de óxido nítrico con vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular, que conduce al reclutamiento de las células inflamatorias, inmunoglobulinas y complemento, provocando la activación de los linfocitos T y B. También aumenta la activación y adhesión plaquetaria y, probablemente, la oclusión vascular sea la causa de la necrosis tumoral, de donde proviene su nombre.<sup>57</sup>

Se ha encontrado que TNF- $\alpha$ , es un mediador de la inflamación en diversas patologías renales incluidas la glomerulonefritis y el daño túbulo intersticial.

### **3.8.2 IL 6 (Interleucina 6)**

La comunicación entre células inmunes e inflamatorias es mediada en gran parte por proteínas llamadas interleucinas. Las interleucinas son un conjunto de citocinas que son sintetizadas principalmente por los leucocitos. Ejecutan múltiples funciones vinculadas con el crecimiento celular, inmunidad, diferenciación tisular, inflamación, etc. Se conocen no menos de 33 interleucinas, las cuales difieren entre sí tanto desde el punto de vista químico como del biológico. Mientras algunas de ellas presentan esencialmente efectos favorables, otras paralelamente a su función defensiva, pueden también ser deletéreas para el organismo.<sup>34</sup>

La IL-6 es un péptido sintetizado por los macrófagos, células T, células endoteliales y fibroblastos. Se encuentra localizado en el cromosoma 7, su liberación está inducida por la IL-1 y se incrementa en respuesta a la TNF- $\alpha$ . Entre las funciones de esta interleucina destaca su capacidad para estimular diferenciación y maduración de las células  $\beta$ . Es una citocina con actividad antiinflamatoria y proinflamatoria, es un mediador de la respuesta inmune en fase aguda ya que estimula la síntesis de fibrinógeno.<sup>53</sup>

En el riñón las células endoteliales y mesangiales también son capaces de producir IL-6. La IL-6 aumenta la proliferación de células mesangiales cultivadas y podría ser un factor de supervivencia. Su producción aumenta en las nefropatías glomerulares y desarrolla proliferación mesangial.<sup>52</sup>

Se ha encontrado relación entre los niveles de IL-6 en orina con la intensidad de las lesiones histológicas y con la evolución de la función renal.<sup>38</sup>

### **3.9 FIBROSIS** <sup>75</sup>

La fibrosis es la formación o desarrollo en exceso de tejido conectivo fibroso en un órgano o tejido como consecuencia de un proceso reparativo o reactivo, en contraposición a la formación de tejido fibroso como constituyente normal de un órgano o tejido. La fibrosis se produce por un proceso inflamatorio crónico.

La mayoría de las glomerulonefritis primarias son de origen inmunológico. Sin embargo, es más frecuente el daño glomerular secundario, en el seno de una enfermedad sistémica, como diabetes e hipertensión.

El glomérulo es un vaso especializado con dos componentes fundamentales: células y matriz extracelular. Durante el desarrollo del daño glomerular se activan procesos de regulación del número de células y del fenotipo celular y del depósito de matriz extracelular. Como consecuencia de estos procesos, la morfología de las enfermedades glomerulares es muy dispar y oscila desde la normalidad óptica del síndrome nefrótico de cambios mínimos al exceso de células de la glomerulonefritis postinfecciosa y a la práctica sustitución del ovillo glomerular por matriz extracelular en los estadios avanzados de obsolescencia glomerular.

El daño glomerular puede evolucionar a un estadio de cicatrización glomerular, caracterizado por la desaparición progresiva de las células glomerulares y por la aparición de matriz extracelular cicatricial. La progresión del daño glomerular se debe a la persistencia de la causa que lo originó o, a pesar del cese de la causa original, a un fallo de los mecanismos de reparación glomerular.<sup>5</sup>

#### **3.9.1 TGF- $\beta$ (Factor de transformación tumoral)**

Los factores de transformación tumoral beta (TGF- $\beta$ , por sus siglas en inglés, transforming growth factor) son una familia de citocinas con actividades multifuncionales que regulan diversos eventos del desarrollo embrionario, la carcinogénesis, la inflamación, la regeneración tisular, la cicatrización y la respuesta inmunológica.<sup>33</sup>

En los mamíferos existen tres isoformas de TGF- $\beta$  que son: TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3. Predomina el TGF- $\beta$ 1 que es producido por diversas células del sistema inmunológico, incluidos los linfocitos, monocitos y macrófagos.<sup>43</sup>

El TGF- $\beta$  es un factor esencial en la regulación de la respuesta inflamatoria. El proceso de inflamación y reparación tisular se caracteriza por el reclutamiento ordenado de células inflamatorias. En esta fase inicial de la inflamación existen bajas concentraciones de TGF- $\beta$ , al progresar la respuesta inflamatoria hay una mayor cantidad de células participantes que constituyen otra fuente de TGF- $\beta$ , por lo cual aumenta su concentración. En estas concentraciones, el TGF- $\beta$  activa los monocitos, incrementando la expresión genética de citocinas proinflamatorias como las interleucinas y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Durante estas etapas de la inflamación el TGF- $\beta$  participa en el inicio de la regeneración y cicatrización del tejido lesionado, al atraer quimiotácticamente y activar a fibroblastos y células endoteliales.<sup>33</sup>

Cuando el TGF- $\beta$  alcanza altas concentraciones actúa como una citocina antiinflamatoria, por lo tanto el efecto regulador del TGF- $\beta$  en la inflamación es dependiente de sus concentraciones.<sup>43</sup>

La actividad biológica del TGF- $\beta$  es también controlada por otras citocinas, factores de crecimiento y hormonas, las cuales también están presentes en el microambiente de la respuesta inflamatoria.

Además de la respuesta inflamatoria el TGF- $\beta$  induce apoptosis (muerte celular).

Algunos factores que regulan la activación de TGF- $\beta$  son las proteasas, pH y algunas especies reactivas de oxígeno. Es bien conocido que cambios de estos factores pueden llevar a alteraciones en los niveles de TGF- $\beta$  y causar serias complicaciones como desordenes autoinmunes, fibrosis y cáncer, entre otras.<sup>33</sup>

En el riñón el TGF- $\beta$  es la citocina mayormente involucrada en el proceso de inflamación y fibrosis, siendo el paso limitante entre uno y otro. El TGF- $\beta$  aumenta

la producción de matriz extracelular glomerular, la cual aparece únicamente cuando hay lesión glomerular.

### **3.9.2 COLÁGENA TIPO IV (Colágeno IV)**

La colágena es una molécula proteica, formada por tres cadenas  $\alpha$  conformadas helicoidalmente . Es el componente más abundante en la piel y los huesos. La colágena se origina por una proteína precursora llamada tropocolágeno.

La principal función de la colágena es la formación de estructuras resistentes.<sup>16</sup>

La colágena no es una proteína única, se considera una familia de moléculas estrechamente relacionadas pero genéticamente distintas. Se describen doce tipos de colágena (colágena I-XII).<sup>61</sup>

La colágena de tipo IV es una macromolécula que se localiza específicamente en las membranas basales. Este tipo de colágena no se polimeriza en fibrillas, es sintetizado por células epiteliales y endoteliales y su principal función es la de sostén y filtración.

Esta compuesto por tres subunidades de cadenas  $\alpha$ , de las cuales han sido identificadas seis tipos diferentes ( $\alpha 1$ -  $\alpha 6$ ). Este colágeno constituye un heterodímero, con dos cadenas  $\alpha$  genéticamente iguales y una cadena  $\alpha$  diferente.<sup>16</sup>

La síntesis de las cadenas  $\alpha$  de la colágena tipo IV esta codificada por seis genes, COL4A1, -A2, -A3, -A4, -A5 y -A6 situados en pares en los cromosomas 13 (COL4A1 y COL4A2), 2 (COL4A3 y COL4A4) y X (COL4A5 y COL4A6).<sup>61</sup>

Las cadenas  $\alpha$ -1 y  $\alpha$ -2 se encuentran presentes en todas las membranas basales, mientras que las cadenas  $\alpha$ -3,  $\alpha$ -4, y  $\alpha$ -5, se encuentran en la membrana basal renal, por lo tanto, mutaciones en los genes que las codifican pueden producir diversas nefropatías.<sup>16</sup>

En el riñón el colágeno tipo IV, es un buen indicador de daño glomerular. Durante el daño glomerular no sólo varía la síntesis de matriz extracelular glomerular normalmente presente en el glomérulo, sino que además se sintetizan moléculas que normalmente están ausentes en el glomérulo sano. Una de estas moléculas anormales es el colágeno tipo IV.<sup>58</sup>

Para entender un poco mas sobre como afecta toda esta serie de padecimientos asociados a la obesidad a la función renal, es necesario conocer la fisiología y anatomía de los riñones.



### 3.10 FUNCIÓN RENAL <sup>30</sup>

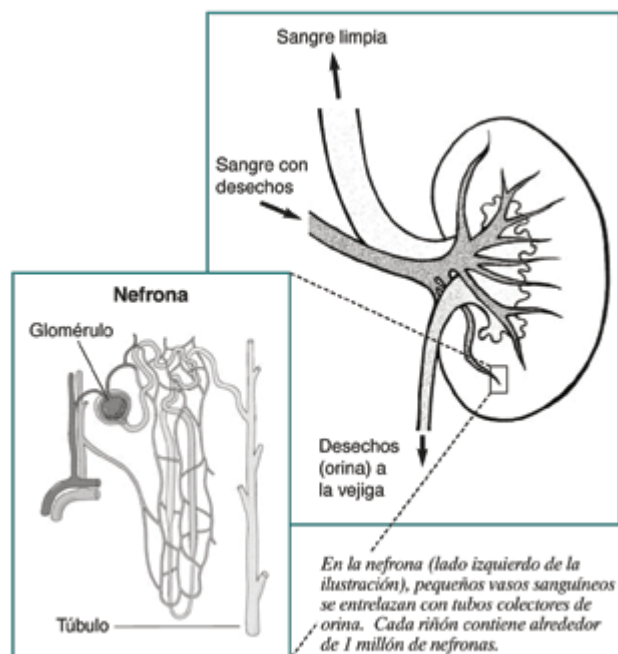
El riñón es uno de los órganos más importantes del cuerpo humano, ya que cumple funciones muy complejas e importantes: formación de orina y equilibrio electrolítico, equilibrio ácido-base, mantenimiento del volumen sanguíneo y la presión arterial, desintoxicación sanguínea, entre otras. Es un órgano par retroperitoneal ubicado a cada lado de la columna vertebral, pesa alrededor de 135 a 150 g cada uno y tienen un color café rojizo. Los riñones miden de 10 a 12 cm de longitud, 7 cm de ancho y de 2 a 3 cm de espesor, aunque el riñón izquierdo es algo más largo y grande que el derecho y, por la presencia del hígado, el riñón derecho se encuentra 1-1.5 cm más bajo que el izquierdo. Presentan una cara anterior y posterior (que son aplanadas), borde externo (que es convexo) e interno (que es cóncavo) y polos superior e inferior. Debido a todas estas características es generalmente comparada con un frijol. Son una compleja maquinaria de reprocesamiento. A diario, purifican unos 190 litros de sangre para filtrar unos 1.9 litros de desechos y exceso de agua. Los desechos y el exceso de agua se convierten en orina, que fluye a la vejiga a través de tubos llamados uréteres. La vejiga almacena la orina hasta el momento de orinar.

Los desechos en la sangre se forman por la descomposición normal de los tejidos activos y de los alimentos consumidos. El cuerpo usa los alimentos como fuente de energía y para su propia reparación. Después de que el cuerpo toma lo que necesita de los alimentos, se envían los desechos por la sangre. Si los riñones no filtraran estos desechos, se acumularían en la sangre y dañarían al cuerpo.

La filtración ocurre en pequeñas unidades dentro de los riñones llamadas nefronas. Cada riñón tiene alrededor de un millón de nefronas. En la nefrona, un pequeño vaso sanguíneo o capilar llamado glomérulo se entrelaza con un pequeño tubo colector de orina llamado túbulo. Se produce un complicado intercambio de sustancias químicas a medida que los desechos y el agua salen de la sangre y entran al sistema urinario (Figura 3.6).

Al principio, los túbulos reciben una mezcla de desechos y sustancias químicas que el cuerpo todavía puede usar. Los riñones miden las sustancias químicas, tales como el sodio, el fósforo y el potasio. Luego las envían de regreso a la sangre, que a su vez las devuelve al cuerpo. De esa manera, los riñones regulan los niveles de esas sustancias en el cuerpo. Además de eliminar los desechos, los riñones liberan tres hormonas importantes:

- Eritropoyetina (EPO, por sus siglas en inglés), que estimula la producción de glóbulos rojos mediante la médula ósea
- Renina, que regula la presión arterial
- Calcitrol, la forma activa de la vitamina D, que ayuda a mantener el calcio para los huesos y para el equilibrio químico normal en el cuerpo



**Figura 3.6 Filtración renal**<sup>30</sup>

Si los dos riñones del cuerpo están sanos, la función renal es del 100 por ciento. De hecho, una función renal del 100 por ciento es más de la necesaria. Algunas personas nacen con un solo riñón y llevan una vida normal y sana. Muchas personas donan un riñón con fines de trasplante a un familiar o a un amigo. Es

posible que una pequeña reducción de la función renal no cause ningún problema. Sin embargo, muchas personas con una función renal reducida tienen una enfermedad renal que empeorará con el tiempo. Si se tiene menos de 25 por ciento de la función renal completa, se tendrán problemas de salud graves. Si se reduce a menos de 10 a 15 por ciento, no se vivirá por mucho tiempo sin alguna forma de terapia de reemplazo de la función renal, ya sea diálisis o transplante.

### **3.10.1 ANATOMIA DEL RIÑÓN <sup>9,66</sup>**

#### **3.10.1.1 NEFRONA**

La Nefrona es la unidad funcional del riñón. Se trata de una estructura microscópica, en número de aproximadamente 1.200.000 unidades en cada riñón, compuesta por el glomérulo, cápsula de Bowman y el túbulo. Existen dos tipos de nefronas, unas superficiales, ubicadas en la parte externa cortical (85%), y otras profundas, cercanas a la unión corticomedular, llamadas yuxtamedulares caracterizadas por un túbulo que penetra profundamente en la médula renal.

#### **3.10.1.2 GLOMÉRULO**

Es una estructura compuesta por un ovillo de capilares, originados a partir de la arteriola aferente, que tras formar varios lobulillos se reúnen nuevamente para formar la arteriola eferente. Ambas entran y salen, respectivamente, por el polo vascular del glomérulo. La pared de estos capilares está constituida, de dentro a fuera de la luz, por la célula endotelial, la membrana basal y la célula epitelial. A través de esta pared se filtra la sangre que pasa por el interior de los capilares para formar la orina primitiva.

Los capilares glomerulares están sujetos entre sí por una estructura formada por células y material fibrilar llamada mesangio, y el ovillo que forman está recubierto por una cubierta esférica, denominada cápsula de Bowman, que actúa como recipiente del filtrado del plasma y que da origen, en el polo opuesto al vascular, al túbulo proximal.

### **3.10.1.3 TÚBULOS RENALES**

Del glomérulo, por el polo opuesto a la entrada y salida de las arteriolas, sale el túbulo contorneado proximal que discurre un trayecto tortuoso por la zona cortical. Posteriormente el túbulo adopta un trayecto rectilíneo en dirección al seno renal y se introduce en la médula hasta una profundidad variable según el tipo de nefrona (superficial o yuxtamedular); finalmente, se incurva sobre sí mismo y asciende de nuevo a la corteza. A este segmento se le denomina asa de Henle. En una zona próxima al glomérulo sigue nuevamente un trayecto tortuoso, denominado túbulo contorneado distal, antes de desembocar en el túbulo colector que va recogiendo la orina formada por otras nefronas, y que desemboca finalmente en el cáliz a través de la papila.

### **3.10.2 FISIOLÓGÍA RENAL<sup>9</sup>**

Las funciones básicas del riñón son tres :

1. Excreción de productos de desecho del metabolismo. Por ejemplo, urea, creatinina, fósforo, etc.
2. Regulación del medio interno cuya estabilidad es imprescindible para la vida. Equilibrio hidroelectrolítico y ácido-básico.
3. Función endócrina. Síntesis de metabolitos activos de la vitamina D, sistema Renina-angiotensina, síntesis de eritropoyetina, quininas y prostaglandinas.

Estas funciones se llevan a cabo en diferentes zonas del riñón. Las dos primeras, es decir, la excretora y reguladora del medio interno, se consiguen con la formación y eliminación de una orina de composición adecuada a la situación y necesidades del organismo. Tras formarse en el glomérulo un ultrafiltrado del plasma, el túbulo se encarga, en sus diferentes porciones, de modificar la

composición de dicho ultrafiltrado hasta formar orina de composición definitiva, que se elimina a través de la vía excretora al exterior

### **3.10.2.1 FILTRACIÓN GLOMERULAR** <sup>9,66</sup>

Las paredes de los capilares glomerulares, están especializadas gracias a los poros de la capa endotelial y los podocitos en dejar pasar solo las moléculas pequeñas mediante un proceso de filtración que sigue las leyes de la física. La tasa de filtración glomerular depende de los siguientes factores (que pueden estar relacionados entre sí):

- Flujo de sangre en el glomérulo (flujo renal).
- Permeabilidad de la pared capilar que actúa como filtro.
- Presión hidrostática en el interior de los capilares glomerulares. Debida a su posición entre las arterias aferente y eferente, esta presión es bastante elevada.
- Presión osmótica debida a las diferentes concentraciones de solutos a ambos lados de la pared.
- Presión hidrostática en el interior de la cápsula de Bowman

En la funcionalidad de la barrera de filtración del riñón las proteínas podocina y nefrina tienen un papel fundamental. Esta barrera es crucial para mantener el balance de agua y electrolitos sin perder proteínas a través de la orina.

### **3.10.2.2 PODOCINA Y NEFRINA**

La nefrina es una proteína identificada recientemente (1998), que consta de 1241 aminoácidos, junto a la podocina y otras proteínas; forma parte estructural de los podocitos que rodean el epitelio de los capilares de los glomérulos. Se localiza específicamente en la hendidura diafragmática la cual es esencial para el mantenimiento de los podocitos. Tiene un papel fundamental en la funcionalidad

de la barrera de filtración del riñón. También participa en la transducción de señales intracelulares, importantes para la funcionalidad y supervivencia del podocito.

La nefrina es una proteína de la familia de las inmunoglobulinas. El gen que codifica (NPHS1) se encuentra en el cromosoma 19. El gen NPHS1 se expresa en riñón, páncreas, cerebro y médula ósea.

Estudios recientes indican que alteraciones en el metabolismo de la nefrina son un buen indicador de enfermedades renales genéticas y adquiridas. Se ha observado una redistribución de la nefrina en riñón asociado a proteinuria, independiente del origen de la enfermedad.<sup>28</sup>

La podocina es una proteína de 383 aminoácidos. El gen que codifica para la podocina es el NPHS2. Al igual que la nefrina forma parte estructural de los podocitos, se encuentra en la hendidura diafragmática y tiene un papel importante en la barrera de filtración glomerular.

La podocina está estructuralmente relacionada con una familia de proteínas llamadas estomatinas que son proteínas transmembranales involucradas en el andamiaje del citoesqueleto.

Se ha observado que cuando la podocina falta o se encuentra alterada hay aparición de síndrome nefrótico.

La podocina y la nefrina se expresan tanto en la superficie celular como extracelularmente.

Para determinar la aparición del síndrome nefrótico es importante el análisis de la función renal, el cual se puede realizar mediante el monitoreo de algún parámetro bioquímico. La medición de la creatinina es un parámetro bioquímico que nos sirve para analizar la función renal.<sup>71</sup>

### 3.10.3 ENFERMEDAD RENAL <sup>60</sup>

La enfermedad renal crónica (ERC) constituye un importante problema de salud pública. La manifestación más avanzada de la ERC, insuficiencia renal crónica terminal y la consiguiente necesidad de un de tratamiento sustitutivo de la función renal mediante diálisis o trasplante renal, presenta una incidencia y una prevalencia crecientes en las últimas décadas.

La ERC se define como una disminución en la función renal, expresada por un filtrado glomerular (FG) o un aclaramiento de creatinina estimado  $< 60 \text{ mL/ min / } 1.73 \text{ m}^2$  o como la presencia de daño renal en ambos casos de forma persistente durante al menos 3 meses.

Los principales factores de riesgo para la enfermedad renal crónica son: hipertensión arterial, diabetes, y otros factores de riesgo cardiovascular como obesidad, dislipidemia y tabaquismo.

En el año 2002, la National Kidney Foundation estadounidense, propuso la clasificación de la enfermedad renal crónica en 5 estadios. El daño renal o el nivel de función renal, independientemente de la causa de la enfermedad renal, determinan el estadio de la clasificación.

En el estadio 1, existe daño renal con filtrado glomerular normal o ligeramente aumentado ( $\text{FG} \geq 90 \text{ mL/ min / } 1.73 \text{ m}^2$ ). Situaciones representativas de este estadio son los casos con microalbuminuria o proteinuria (presencia de proteína en la orina) persistente con FG normal o ligeramente aumentado.

El estadio 2 corresponde a situaciones de daño renal acompañadas de una ligera reducción del filtrado glomerular (FG entre 60 y 89 mL/ min /  $1.73 \text{ m}^2$ ).

En el estadio 3 la ERC es una disminución moderada del filtrado glomerular (FG entre 30 y 50 mL/ min /  $1.73 \text{ m}^2$ ). En este estadio se observa un riesgo claramente aumentado de progresión de la ERC y de complicaciones cardiovasculares. Pueden aparecer complicaciones clásicas de la insuficiencia renal como la anemia o las alteraciones del metabolismo fosfo-cálcico. Los pacientes con ERC en estadio 3 deben ser evaluados en forma global desde el punto de vista

cardiovascular y recibir el tratamiento adecuado para la prevención a ambos niveles y en su caso, para las complicaciones que se detecten.

El estadio 4 es una disminución grave del filtrado glomerular (FG entre 15 y 29 mL/ min / 1.73 m<sup>2</sup>). Tanto el riesgo de progresión de la insuficiencia renal al estadio 5 como el riesgo de complicaciones cardiovasculares son muy elevados.

El estadio 5 de la ERC es un FG < a 15 mL/ min / 1.73 m<sup>2</sup> y se denomina también fallo renal. La valoración de la indicación del tratamiento sustitutivo es necesaria, especialmente cuando se presentan síntomas o signos urémicos.

El diagnóstico precoz de la ERC en los estadios 1 y 2 resulta fundamental para la posible prevención de la pérdida de la función renal y de las complicaciones cardiovasculares. El diagnóstico precoz se basa en la realización de pruebas complementarias básicas para poder establecer el diagnóstico y el estadio de la ERC independientemente de la causa.

Las exploraciones complementarias son tres:

- 1) Determinación de la creatinina sérica y la correspondiente estimación del FG o de la depuración de creatinina.
- 2) Determinación del índice albúmina / creatinina en una muestra de orina.
- 3) Análisis del sedimento urinario.

### **3.10.3.1 DEPURACIÓN DE CREATININA**

Normalmente, se considera que el flujo glomerular es la mejor estimación global de la función renal y, por tanto, se debe utilizar para evaluar el inicio y progresión de una nefropatía. La estimación del flujo glomerular puede realizarse con la depuración de creatinina, el cual se basa en un modelo de regresión desarrollado a partir de muestras de orina de 24 horas. Un aspecto importante de este método de estimación del flujo glomerular es la determinación de la concentración de creatinina sérica.<sup>9</sup>



La creatinina es un compuesto orgánico que se genera a partir de la degradación de la creatina. Es un producto de desecho del metabolismo normal de los músculos, que se filtra libremente por el glomérulo, por lo que se puede utilizar como un marcador de la filtración glomerular, se produce continuamente por el metabolismo del músculo esquelético y cuyos niveles se mantienen relativamente constantes durante intervalos cortos de tiempo, su eliminación es casi exclusivamente renal, el aumento de los niveles plasmáticos de creatinina en plasma indica con gran posibilidad una disminución de la función glomerular, la secreción tubular de creatinina varía en el tiempo y según el grado de la función renal.<sup>5</sup>

La formación de creatinina, está fundamentalmente, determinada por la masa muscular y la ingestión dietética<sup>5</sup>, la composición de la dieta puede tener un efecto importante sobre la concentración sérica. Por ejemplo; la concentración de creatinina sérica en equilibrio puede cambiar como consecuencia de un cambio prolongado en la ingestión de proteínas en la dieta; es decir una ingestión alta o baja de proteínas animales aumenta y disminuye, respectivamente, la concentración sérica en equilibrio.<sup>9</sup>

Existe una eliminación extrarrenal de creatinina, al degradarse ésta a dióxido de carbono y a metilamina por las bacterias intestinales. Esta degradación es, proporcionalmente, mayor a medida que la función renal desciende y las concentraciones de creatinina se elevan.

La depuración de creatinina, calculado a partir de la concentración sérica de creatinina y de su excreción en orina de 24 horas, es el método empleado más frecuentemente para medir filtración glomerular, el cual no se ve afectado por la masa muscular.

Estudios recientes han demostrado que dietas altas en proteína en presencia de lesión renal incrementan la hiperfiltración glomerular, favoreciendo el daño renal a través de efectos inflamatorios.<sup>37</sup>

### 3.11 DIETAS ALTAS EN PROTEÍNA

Las dietas altas en proteína han sido utilizadas como una estrategia para la pérdida de peso, en pacientes con obesidad, sin embargo, aun no se han realizado estudios suficientes que garanticen su eficacia y seguridad, especialmente con respecto al tejido renal.<sup>37</sup>

Generalmente este tipo de dietas se asocia además a un alto consumo de grasa saturada y colesterol debido a que la proteína, la mayoría de las veces, proviene de alimentos de origen animal.

Al consumir una dieta alta en proteína, se tiene una pérdida rápida de peso debido a que se suprime el consumo de hidratos de carbono, lo que ocasiona la eliminación de fluidos corporales. La disminución en el consumo de hidratos de carbono provoca un aumento en la cantidad de grasa corporal que es oxidada para la obtención de energía.<sup>55</sup>

En este tipo de dietas al ser tan altas en proteína se producen unas sustancias llamadas cetonas las cuales provocan disminución del apetito, lo que significa que además de la pérdida de fluidos corporales y el aumento en la cantidad de grasa metabolizada, ingiere menor cantidad de alimento, a esto se debe la eficacia de estas dietas, sin embargo, esta pérdida de peso en tan poco tiempo puede ocasionar diversos problemas de salud.

Diversos estudios<sup>37,55</sup> demuestran que el consumo de dietas altas en proteína pueden ocasionar a largo plazo daño renal, afectando principalmente la filtración glomerular y disminuyendo la depuración de creatinina. Sin embargo, también se ha encontrado que el consumo de proteína de soya tiene efectos benéficos en la función renal, debido a que reduce la acumulación de lípidos y la inflamación.

En este estudio se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de proteína de origen vegetal y animal en la función renal. Como proteína animal se utilizó caseína y como proteína vegetal un aislado de proteína de soya.

### 3.11.1 SOYA

La soya (*Glycine max*) es una planta de la familia de las leguminosas fabáceas, cultivada por sus semillas, legumbres de alto valor proteico (cercano al 35%) utilizadas en alimentación y para la producción de aceite. Esta planta, es originaria de China, y su nombre viene del Japón, no obstante, se comercializa en todo el mundo, debido a sus múltiples usos. Es usada para una infinidad de productos que pueden reemplazar a otros de origen animal. La soya es utilizada también como alimento para animales, en forma de harina de soya.<sup>8</sup>

Su uso en la alimentación humana es sumamente importante. El alto valor proteico de la legumbre lo hace un excelente sustituto de la carne en las naciones pobres. De la soya se producen subproductos como la leche de soya y la carne de soya. Es uno de los principales alimentos en países orientales como China y Japón donde se obtienen distintos derivados como el aceite, la salsa de soya, los brotes de soya, el Tofu, entre otros.<sup>64</sup>

En la siguiente tabla se muestra el contenido y composición de proteína, lípidos y fibra dietaria de la soya, así como los efectos que tienen estos nutrimentos sobre la salud.

CARACTERÍSTICAS NUTRICIONALES DEL FRIJOL DE SOYA				
NUTRIMENTO	%	COMPOSICION		EFFECTOS EN LA SALUD
Proteína	36	mg de AA indispensables / g proteína		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cubre los requerimientos de AA indispensables en niños y adultos</li> <li>- Reduce la concentración de colesterol LDL y total plasmático</li> <li>- Atenúa la elevación de insulina postprandial</li> </ul>
		His	26	
		Ile	49	
		Leu	82	
		Met + Cis	26	
		Fen + Tir	90	
		Tre	38	
		Trp	13	
Val	50			

Lípidos	19	Ac. grasos saturados Ac. grasos monoinsaturados Ac. grasos poliinsaturados - Ac. Linoleico - Ac. Linolénico	15% 24% 60% 85% 12%	- El frijol de soya es rico en ácidos grasos poliinsaturados y ácido linoleico que tiene efecto en la prevención de enfermedades coronarias.
Hidratos de carbono	30	Hidratos de carbono complejos (almidón) Hidratos de carbono simples	70% 30%	
Fibra dietaria	17	Fibra soluble Fibra insoluble	7 g 10 g	- Disminuye la glucosa postprandial - Reduce ligeramente el colesterol plasmático

\*AA= aminoácidos

**Tabla 3.2 Características nutricionales del frijol de soya.<sup>64</sup>**

Los frijoles de soya proveen una variedad importante de fitoquímicos, los cuales pueden tener una función importante en la reducción del riesgo de desarrollar enfermedades crónicas. Los fitoquímicos presentes en el frijol de soya son: Inhibidores de tripsina, saponinas, ácido fítico, oligosacáridos e isoflavonas.

La mayoría de los beneficios sobre la salud del consumo de soya son atribuidos a las isoflavonas. Las isoflavonas son compuesto polifenólicos, que pueden actuar como estrógenos en el cuerpo y tener funciones protectoras, ya que actúan como potentes antioxidantes. Dentro de las isoflavonas encontramos la daidzeína y Igenisteína. La soya contiene aproximadamente 3 mg/g de isoflavonas.<sup>8,64</sup>

Algunos estudios han mostrado los efectos hipocolesterolémicos del consumo de soya, principalmente de la fracción proteica, la cual trataremos mas adelante.



**Figura 3.7 Frijol de soya**

#### **3.11.1.1 PROTEÍNA DE SOYA**

El componente mas utilizado de la soya es su proteína en virtud de su elevada concentración y su alta calidad respecto a otras leguminosas.<sup>64</sup>

El aislado de proteína de soya por si solo, satisface los requerimientos de aminoácidos azufrados y lisina y no es necesario que sea complementada con metionina para satisfacer los requerimientos de aminoácidos de los adultos.

El consumo de la proteína de soya genera una disminución significativa de 9.3 % del colesterol total y 12.9% del colesterol LDL (lipoproteínas de baja densidad). En consecuencia algunas instituciones como la FDA ( Food & Drug Administration) y la AHA ( American Heart Association a partir de 1999, empezaron a recomendar el consumo de la proteína de soya para disminuir las concentraciones de colesterol LDL, esto es de gran importancia ya se ha demostrado que una

reducción del 3% del colesterol da lugar a una disminución hasta del 10% del riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares.<sup>8</sup>

Además, se ha demostrado que el consumo de proteína de soya mantiene las concentraciones séricas de ácidos grasos y leptina dentro de los límites normales, lo que evita que estos se depositen en órganos que no sean el tejido adiposo, lo cual anula el proceso de lipotoxicidad.

Se ha demostrado en estudios experimentales que el consumo prolongado de proteína de soya reduce la proteinuria y la reacción inflamatoria durante el síndrome nefrótico y que atenúa el daño oxidativo.<sup>8,64</sup>

Los efectos benéficos de la proteína de soya sobre el daño oxidativo, se deben a las isoflavonas, debido a que protegen a las proteínas LDL de la oxidación<sup>17</sup>. En la obesidad, debido a la acumulación y la excesiva oxidación de lípidos, se producen especies reactivas del oxígeno (EROs), las cuales reaccionan con los residuos de tirosina de las proteínas afectando sus funciones. Las isoflavonas reaccionan competitivamente con las EROs previniendo el daño.<sup>63,65</sup>

El uso de proteína de soya en personas con padecimientos renales, en contra del uso de proteína de origen animal se ha postulado como un nuevo tratamiento preventivo. La proteína de soya tiene efectos benéficos en el riñón, mejorando la filtración glomerular y la depuración de creatinina.<sup>63</sup>

### 3.11.2 CASEINA <sup>6</sup>

El nombre de caseína proviene del latín “*caseus*” que significa queso. Las caseínas son por definición las fosfoglucoproteínas que precipitan de la leche descremada a pH 4.6 y 20°C, por eso se les conoce también como proteína insoluble de leche.

Las caseínas se encuentran en la leche y algunos de sus derivados. En la leche se encuentra en la fase soluble asociada al calcio en un complejo que se denomina caseinógeno.

Por otra parte y aunque las proteínas que se denominan caseínas son específicas de cada especie, se clasifican en los siguientes grandes grupos de acuerdo con su movilidad electroforética:  $\alpha_{s1}$ -caseína,  $\alpha_{s2}$ -caseína,  $\beta$ -caseína y  $\kappa$ -caseína.

La caseína  $\alpha_{s1}$  es la mayoritaria en la leche de vaca. La variante más común tiene 199 aminoácidos en su secuencia, con 8 ó 9 grupos fosfato. Desde el punto de vista estructural, está formada por tres regiones hidrofóbicas, con dos de ellas situadas en los extremos y una zona muy polar.

La caseína  $\alpha_{s2}$  está formada, en la vaca, por 207 aminoácidos. Esta caseína tiene un puente disulfuro entre las cisteínas que ocupan las posiciones 36 y 40 de la secuencia y es más hidrofílica que la caseína  $\alpha_{s1}$ , con tres regiones de carga neta negativa, una de ellas en el extremo N-terminal. En la zona del extremo C-terminal se sitúan aminoácidos hidrofóbicos y con carga neta positiva.

La caseína  $\beta$  es la caseína más hidrofóbica, y presenta además estructura particular, con una clara división en dos zonas. La que corresponde al extremo C-terminal es particularmente hidrofóbica, mientras que los aminoácidos más hidrofílicos y todos los grupos fosfato unidos a serinas, se concentran en el extremo N-terminal. La variante genética más común en la vaca está formada por 209 aminoácidos, con cinco grupos fosfato.

La caseína  $\kappa$  tiene una estructura claramente distinta de la de las otras caseínas. Es algo más pequeña; está formada, en la vaca, por 169 aminoácidos. Además

está muy poco fosforilada, teniendo solamente un grupo de fosfato. Esto hace que interaccione con el ión calcio mucho menos que las otras caseínas. Sin embargo, comparte con la caseína  $\beta$  la propiedad de tener zonas predominantemente hidrofílicas e hidrofóbicas bien marcadas y separadas.

Para evaluar el efecto de la concentración y tipo de proteína en la función renal en condiciones de obesidad e hiperinsulinemia, se utilizó el modelo animal de la rata Zucker<sup>fa/fa</sup>. Las ratas Zucker<sup>fa/fa</sup> son animales genéticamente modificados (ob/ob), que carecen de receptores funcionales para leptina y son hiperfágicos, obesos y diabéticos.<sup>73</sup>



### 3.12 MODELO ANIMAL (RATA ZUCKER <sup>fa/fa</sup>)

La obtención en la década de los sesenta por Lois y Theodore Zucker de una cepa de ratas (denominadas desde entonces ratas "Zucker") por el cruce de ratas Sherman con Merck Stock M, que mostraban obesidad de aparición juvenil, aumento de la ingestión de alimentos, disminución del gasto energético y resistencia insulínica ha proporcionado a los investigadores un excelente modelo experimental que ha sido utilizado frecuentemente para el estudio de muchas enfermedades como la obesidad, la hiperlipemia, el fallo renal, la diabetes, las alteraciones en el sistema inmunitario. Adicionalmente, ha supuesto un extraordinario avance en el conocimiento de los mecanismos involucrados en la regulación de la ingestión de alimentos, el peso corporal y el gasto energético.<sup>1</sup>

La rata Zucker<sup>fa/fa</sup> es uno de los modelos de obesidad heredable, con carácter autosómico recesivo. La obesidad se manifiesta únicamente en los animales homocigotos (fa/fa) mientras que los heterocigotos (Fa/fa) tienen fenotipo normal. En las cuatro o cinco primeras semanas de vida las ratas homocigotas y heterocigotas son fenotípicamente indistinguibles, pero a partir de ese momento se instaura la obesidad en las homocigotas. Después y a lo largo de toda la vida, la ganancia de "peso" será siempre mayor en las ratas homocigotas, y el incremento de "peso" regular y mantenido. La acumulación de grasa es tanto intra-abdominal como subcutánea, llegando a alcanzar grados de obesidad extremos. Este modelo de obesidad se manifiesta con hiperfagia, hiperinsulinemia e hipertrigliceridemia-hipercolesterolemia, con hepatomegalia, aumento de la actividad de la enzima lipoproteína-lipasa (LPL) y de los niveles circulantes de ácidos grasos libres y aparición láctica del suero.<sup>73,74</sup>

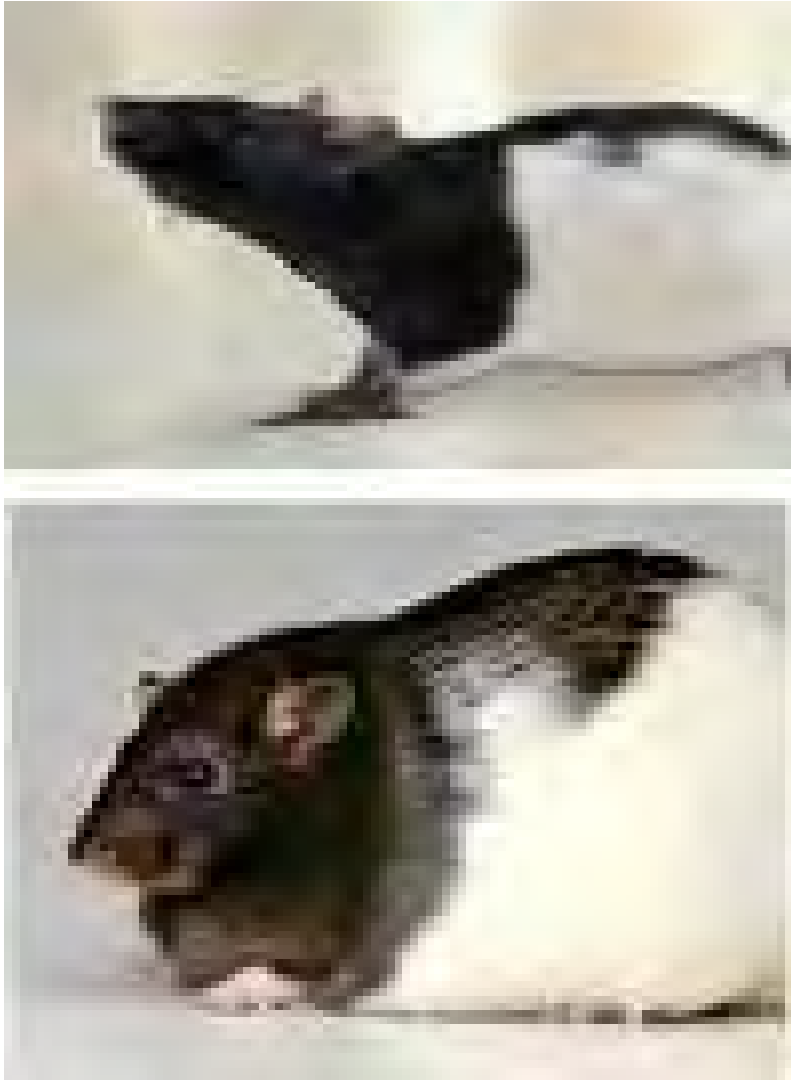
En este modelo animal, el defecto genético radica en el receptor de la leptina. Esta hormona controla el "peso" corporal y se interrelaciona estrechamente con la secreción y la acción de la insulina periférica.

Las características más destacables de este modelo de obesidad son el aumento de la eficacia metabólica en la utilización de sustratos, con disminución en la

termogénesis postprandial a expensas de la grasa (dependiente del tono simpático, que está disminuido y de la secreción de insulina); la resistencia a la insulina en el músculo esquelético, pero no en el tejido graso e hígado, lo que causa hiperinsulinismo con aumento de la lipogénesis y de la actividad de la lipoproteína lipasa tisular, la hiperfagia, que probablemente es secundaria al hiperinsulinismo, y la falta de sensibilidad a las señales de saciedad postprandial, en la que probablemente intervienen varios neuropéptidos hipotalámicos, y que se presenta como la posibilidad más probable de explicar la alteración primaria heredable causante de la obesidad.<sup>50</sup>

Por otro lado, se ha detectado una disminución importante a la colecistocinina (CCK) que es producida en duodeno y yeyuno en respuesta a la presencia de ácidos grasos libres en la luz intestinal y que no sólo induce la secreción biliar para emulsionar y digerir la grasa, sino que además interviene de forma importante a nivel hipotalámico sobre el centro de la saciedad y disminuye la ingestión de alimentos. El neuropéptido Y (NPY, 36 aa) parece estar muy relacionado con la conducta alimentaria. Los niveles de NPY hipotalámicos en ratas Zucker<sup>fa/fa</sup> obesas son anormalmente altos, simulando un estado de ayuno permanente.<sup>73,74</sup>

La expresión del NPY es dependiente de insulina y glucocorticoides. Esto hace improbable que el defecto genético primario que produce la obesidad en la rata Zucker<sup>fa/fa</sup> se localice en el gen del NPY.



**Figura 3.8 Modelo animal de la rata Zucker <sup>fa/fa</sup>**

## **CAPÍTULO IV**

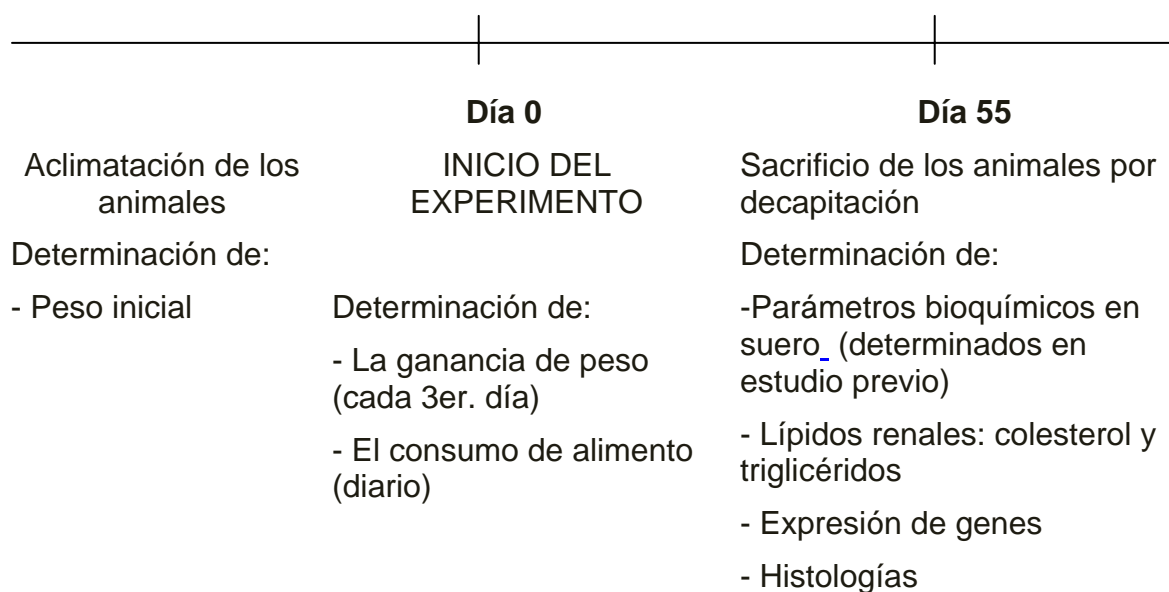
### **HIPÓTESIS**

Si se administra una dieta con niveles moderados de proteína de origen vegetal, entonces deberá disminuir la lipogénesis intrarrenal, por lo tanto, disminuirá la inflamación y habrá un mejoramiento del perfil de la función renal.

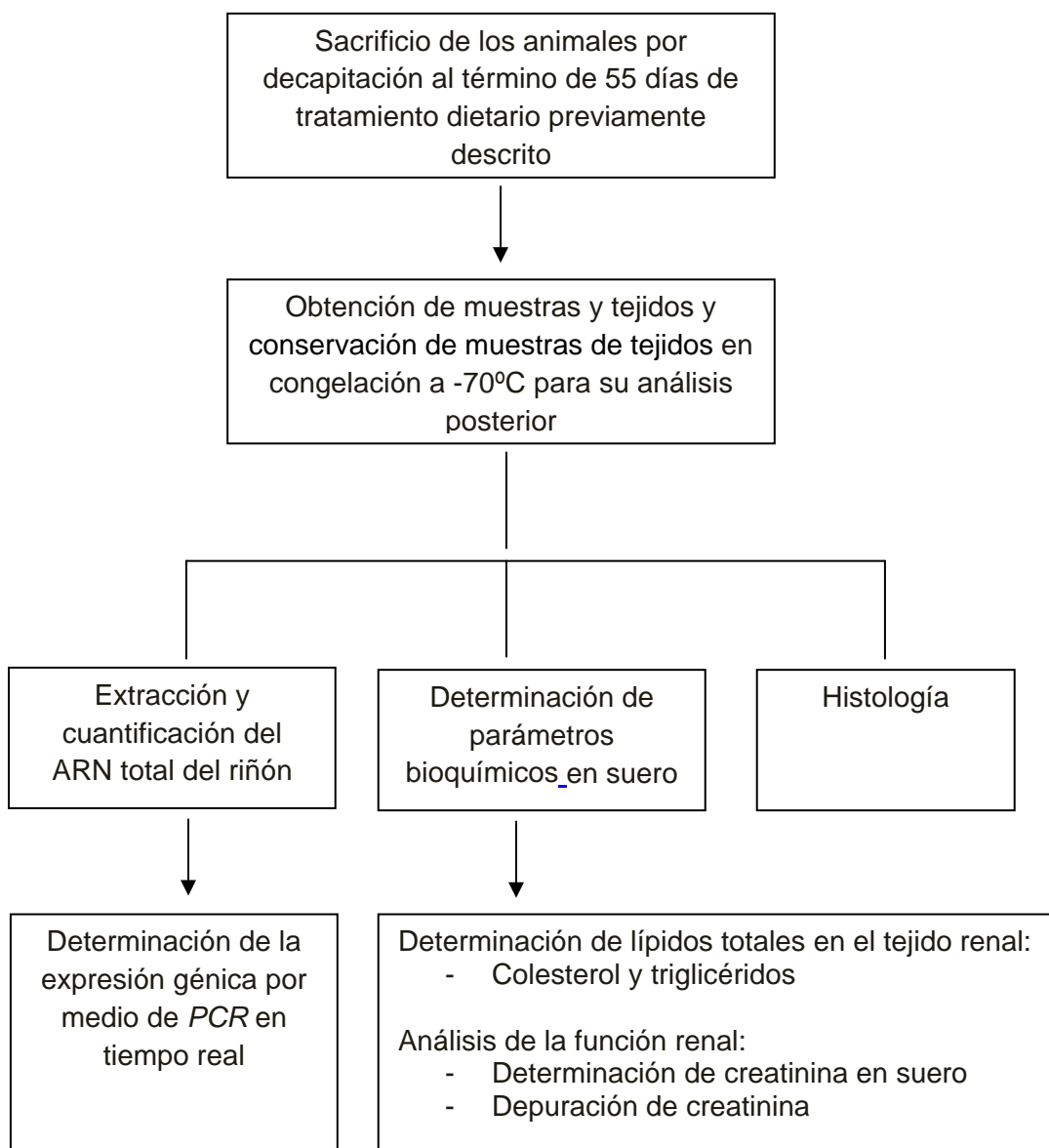
## CAPÍTULO V

### DISEÑO EXPERIMENTAL

Durante la investigación se trabajó con Rata Zucker <sup>fa/fa</sup> machos provenientes de Harlan EE.UU. El diseño experimental utilizado se muestra a continuación.



## 5.1. DIAGRAMA DE FLUJO



**Figura 5.1 Diagrama de bloques de la metodología a emplear en la investigación**

OBTENCIÓN DE MUESTRAS Y TEJIDOS: Al término de los 55 días experimentales, los animales fueron sacrificados por decapitación, con previa inhalación e

inmovilización con CO<sub>2</sub>. Se colectó la sangre en tubos con gel separador y activador de la coagulación para la determinación de parámetros bioquímicos (glucosa, triglicéridos y colesterol). Se extrajo y se pesó el riñón derecho de cada animal. Todos los tejidos se mantuvieron en congelación a -80°C.

**EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS RENALES:** La extracción de los lípidos renales se realizó mediante la técnica de Folch, en la cual la muestra fue extraída con una solución de cloroformo: metanol 2:1, se tomó con un embudo de separación la fase orgánica, se lavó con una solución salina y a continuación se evaporó para calcular el contenido total de grasa y con una alícuota determinar los ácidos grasos.

**DETERMINACIÓN DE COLESTEROL Y TRIGLICÉRIDOS EN TEJIDO RENAL:** Se llevó a cabo una extracción de lípidos totales en riñón por el método de Folch. Este método se basa en la separación de la fracción lipídica de un tejido al ser homogeneizado en una solución solvente. Al añadir agua y centrifugar se forman dos fases. En la superior se encuentran los compuestos hidrosolubles y en la inferior los hidrofóbicos en la solución solvente, la cual al evaporarse concentra el contenido total de lípidos en el fondo del tubo. La porción lipídica se resuspende en isopropanol/tritón al 10% y finalmente se determina la concentración de colesterol y triglicéridos en el extracto mediante un kit de diagnóstico para colesterol y triglicéridos "Diagnostic Systems International" proveniente de Holzheim Alemania.

**EXTRACCIÓN DE ARN DEL RIÑÓN:** La extracción del ARN total del tejido renal se realizó por el método del tiocianato de guanidina, el cual consiste en una digestión con sarcosil, seguida de una extracción con tiocianato de guanidina y una precipitación con cloruro de cesio.

**DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA:** El ARN de la corteza y médula renal fue sometido a la acción de la transcriptasa reversa para obtener el ADNc. Con el ADNc se realizó el análisis de *PCR* en tiempo real utilizando oligonucleótidos específicos para cada uno de los genes a amplificar.

**HISTOLOGÍAS:** Las preparaciones histológicas se utilizan para obtener cortes de tejido montados sobre un cubreobjetos con imágenes de estructuras contrastadas para su estudio y observación mediante microscopía óptica

## **5.2 MODELO ANIMAL Y TRATAMIENTOS DIETARIOS**

Se utilizaron 48 ratas Zucker fa/fa (cepa origen) macho de 4 a 5 semanas de edad, provenientes de Harlan, EE UU y se mantuvieron en el bioterio del INN CMSZ. En todo momento se siguieron las guías internacionales para el cuidado de los animales. El Comité Consultivo Institucional de Investigación y Cuidado de Animales del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, S.Z. , aprobó el protocolo para conducir este proyecto. Los animales estuvieron en jaulas individuales con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas con libre acceso a la dieta y al agua. Las ratas se dividieron en 6 grupos de 8 ratas cada uno como se muestra a continuación.

Grupo 1:	<b>(C20)</b>	Caseína	20%
Grupo 2:	<b>(S20)</b>	Soya	20%
Grupo 3:	<b>(C30)</b>	Caseína	30%
Grupo 4:	<b>(S30)</b>	Soya	30%
Grupo 5:	<b>(C45)</b>	Caseína	45%
Grupo 6:	<b>(S45)</b>	Soya	45%

## **5.3 MÉTODOS**

### **5.3.1 DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA**

#### **5.3.1.1 EXTRACCIÓN DEL ARN TOTAL**

**USO:** Esta técnica se utilizó para llevar a cabo la separación de ARN para su posterior uso y análisis.



FUNDAMENTO: El ARN se degrada con mucha facilidad, por lo que su aislamiento requiere un cuidado especial. Los métodos más utilizados consisten en la lisis de células con detergentes no iónicos como el sarcosil en compuestos que inactiven las ARNsas como el tiocianato de guanidina. Las ARNsas son enzimas excepcionalmente estables y evitar su actividad es el objetivo principal cuando se trata de obtener el ARN.

El ARN se separa del ADN aprovechando sus diferencias físico-químicas. Uno de los métodos más comunes de purificación es el de centrifugación en gradiente de cloruro de cesio: el ARN es más denso que el ADN cromosómico. Otro método es la precipitación del ADN, primero con alcohol absoluto y, posteriormente, con etanol al 70%.

MATERIAL: Gradilla, 40 tubos "falcón", piseta, 6 tubos "corex" de 30 mL, pipeta estéril desechable, micropipetas, puntas de micropipeta, cortador ("cutter"), 6 tubos Eppendorf de 1.5 mL y "vortex".

MUESTRAS: Riñón de rata Zucker<sup>fa/fa</sup> conservado en congelación (-70°C).

REACTIVOS: Etanol al 100%, etanol al 70%, pirocarbonato de dietilo (*DEPC*, *Diethyl pyrocarbonate*, por sus siglas en inglés), tiocianato de guanidina, β-mercaptoetanol, sarcosil al 10%, cloruro de cesio y acetato de sodio.

#### PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- a) Agua DEPC (pirocarbonato de dietilo) al 0.1% ( 3000 mL)
- Dietil pirocarbonato      3 mL
  - Agua desionizada          3000 mL

Se agitó por 4 horas y se esterilizó en autoclave 15 min/ 121°C.

- b) Citrato de sodio 1M    pH = 7.0 ( 500 mL)
- Citrato de sodio            147.05 g
  - Agua DEPC                aforar a 500 mL

Se filtró con membrana de nylon 0.22 µm y se guardó a temperatura ambiente.

- c) Tiocianato de Guanidina (500 mL)
- Citrato de sodio 1 M pH= 7.0 12.5 mL
  - Tiocianato de guanidina 236.37 g
  - Agua DEPC aforar a 500 mL

Se calentó en baño María 30 minutos a 40°C, se dejó enfriar en hielo. Se esterilizó por filtración con membrana de nylon 0.22 µm y se guardó a 4 °C.

- d) Acetato de sodio 3 M pH= 5.2 (50 mL)
- Acetato de sodio (anhidro) 20.415 g
  - Agua DEPC aforar a 50 mL

Se esterilizó por filtración con membrana de nylon 0.22 µm y se guardó a temperatura ambiente (se ajustó el pH con HCl concentrado).

- e) Lauril sarcosina al 10 % (100 mL)
- N- lauril- sarcosina sal de sodio 10 g
  - Agua DEPC aforar a 100 mL

Se mezcló por 1 hora hasta que se disolviera, se dejó reposar por 15 min. para que desaparecieran las burbujas. Se esterilizó por filtración con membrana de nylon 0.22 µm y se guardó a temperatura ambiente.

- f) Cloruro de Cesio (250 mL)
- Cloruro de cesio 230 g
  - Acetato de sodio 3 M pH= 5.2 2 mL
  - Agua DEPC aforar a 250 mL

Se esterilizó por filtración con membrana de nylon 0.22 µm y se guardó a temperatura ambiente.

#### EQUIPO:

- Ultracentrifuga Beckman (XL-90 Ultracentrifuge)
- Centrifuga Beckman (JC-MC Centrifuge)

- Polytron Kinematica
- Ultracongelador BioFreezer (Forma Scientific)
- Centrifuga Eppendorf (5804 R 15 amp)
- Termobloque Multiblock Heater (Lab line)

## PROCEDIMIENTO

### DÍA 1

- Se limpió el área de trabajo con etanol y DEPC.
- Se encendieron las centrífugas y se ajustaron.
  - Centrífuga: Rotor JA-20, 15 min, 18°C, 14000 rpm
  - Ultracentrífuga: Rotor SW-40Ti no.   serie 10814, 18 horas, 18°C, 29000 rpm
- Se colocaron 6 camisas delgadas en el rotor de la centrífuga.
- Se colocaron en una gradilla 40 tubos “falcón”.
- Se añadió a cada uno 4.5 mL de agua DEPC con una pipeta.
- Se colocaron en una gradilla 6 tubos “corex” de 30 mL.
- Se colocaron 8 mL de tiocianato de guanidina en cada tubo con pipeta estéril desechable.
- Se agregaron 56  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol a cada tubo.
- Se taparon los tubos con papel aluminio y se dejan en la campana.
- Se enjuagaron las pinzas con agua *DEPC*.
- Se ajustó el “politrón” en 3 y siempre que se encienda debe tener un tubo con agua.
- Se lavó 6 veces con los tubos “falcón”.
- Se sacaron del ultracongelador los tejidos, uno por uno según se fueran usando.
- Se depositó el tejido congelado ( $\pm$ 500 mg) en un tubo “corex” con tiocianato y se homogenizó con el politrón.

- Se lavó el politrón 4 veces, se limpió con una toalla de papel especial de laboratorio y se observó que no tuviera residuos de tejido y se lavó una vez más.
- Se agregaron 400  $\mu$ L de sarcosil al 10% a cada tubo, se vertieron por la pared del tubo.
- Se colocó una película aislante (“parafilm”) y se mezcló suavemente por inversión una sola vez.
- Se centrifugó por 15 min, a 18°C y 14000 rpm.
- A 6 tubos de polialómero, se les colocaron 4 mL de cloruro de cesio con pipeta desechable y se numeraron.
- A los tubos centrifugados se les localizó la “pastilla” y se metió la punta de la pipeta en el lado contrario para tomar 8 mL de sobrenadante cuidando de no llevarse residuos sólidos y se vertió suavemente por las paredes del tubo con cloruro de cesio para no romper el gradiente (se usó una pipeta por muestra).
- Se colocaron los tubos en la centrifuga y se centrifugó durante 18 horas, a 18°C y 29000 rpm en condiciones de vacío.

## DÍA 2

- Pasando las 18 horas extrajeron los tubos, se vertió todo el sobrenadante en un vaso de plástico y se mantuvieron invertidos en una gradilla con una toalla de papel especial para laboratorio en la base.
- Se rotularon 6 tubos Eppendorf de 1.5 mL.
- Con cortador (“cutter”) previamente lavado con *DEPC* se cortó el tubo con las pastilla de ARN a  $\pm 2$  cm de la base.
- Se disolvió la pastilla con 200 $\mu$ L de agua *Sigma*, “pipeteando” para disolverla un poco.
- Se colocó en el tubo y se repitió la operación para obtener un volumen final de 400 $\mu$ L.
- Se agitó en un “vortex” hasta que la pastilla se disolviera por completo.
- Se le añadieron 40  $\mu$ L de acetato de sodio 3M a pH 5.2 y 1000 $\mu$ L de etanol frío al 100% para precipitar el ARN.

- Se agitó en un “vortex” y se almacenó por 24 horas a -70°C.

### DÍA 3

- Se colocaron todas las muestras en hielo.
- Se encendió el termobloque a 70°C.
- Se sacaron las muestras del ultracongelador, y se descongelaron en agua con hielo.
- Se centrifugaron durante 30 min.
- Se desechó el etanol cuidando de que la pastilla no se desprendiera del tubo.
- Se dejó escurrir por inversión.
- Se añadió 1 mL de etanol frío al 70% y se agitó con un “vortex” hasta que la pastilla se desprendiera.
- Se centrifugó 15 min a 4°C y 14000 rpm.
- Se eliminó el etanol con más cuidado porque la pastilla está más “floja” y se secó el borde del tubo con papel de baño sin pelusa sin llegar a tocar la pastilla.
- Se resuspendió en 500 µL de agua Sigma.
- Se incubó a 70°C por 5 min.
- Una vez perfectamente disuelto el ARN se cuantificó y almacenó a -70°C.

NOTA: Cuando se desee descongelar las muestras nuevamente, primero se descongelan en agua con hielo, una vez que se han descongelado por completo, se calientan a 70°C por 5 minutos pues el agua Sigma hace que el ARN vuelva a su estructura secundaria y el cambio de temperatura desdobla la cadena.

\*Nunca se descongelan las muestras de ARN con la mano

### 5.3.1.2 CUANTIFICACIÓN DEL ARN POR ESPECTROFOTOMETRÍA

USO: Esta técnica se empleó para conocer la concentración del ARN extraído.

FUNDAMENTO: La espectrofotometría de absorción UV-Vis involucra la absorción de luz UV/visible por parte de una molécula promoviendo el paso de un electrón desde un orbital molecular fundamental a un orbital excitado. La parte de la molécula que absorbe la luz UV se llama grupo cromóforo. Los ácidos nucleicos tienen en su estructura grupos cromóforos, los cuales absorben a una longitud de onda de 260 a 280 nm, debido a esto su cuantificación es posible mediante esta técnica.

MUESTRAS: ARN disuelto en 500  $\mu$ L de agua Sigma, almacenado en congelación a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

MATERIAL: Celdas de cuarzo, micropipetas, tubos Eppendorf, vortex.

EQUIPO:

- Espectrofotómetro Beckman (DU-640)
- Centrifuga Eppendorf (Centrifuge 5415c)
- Termobloque Eppendorf (Thermostat plus 1.5 mL)

REACTIVOS: Buffer TE (Tris HCl- EDTA) pH 7.5

PREPARACIÓN DE REACTIVOS:

- a) Buffer TE (tris HCL- EDTA) pH = 7.5 ( 1000 mL)
- Tris HCL 1.576 g
  - EDTA 0.5 M pH 8.0 2 mL

Se disolvió el Tris - HCl en 800 mL de agua desionizada, se ajustó el pH con NaOH, se añadió el EDTA y se aforó .

PROCEDIMIENTO

El ARN se cuantificó midiendo su absorbancia a 260 nm por espectrofotometría.



### 5.3.1.3 ELECTROFORESIS DEL ARN EXTRAIDO

USO: Esta técnica se utilizó para comprobar la pureza e integridad del ARN extraído.

FUNDAMENTO: El término electroforesis se usa para describir la migración de una partícula cargada bajo la influencia de un campo eléctrico. Muchas moléculas importantes biológicamente (aminoácidos, péptidos, proteínas, nucleótidos, ácidos nucleicos, etc.) poseen grupos ionizables y existen en solución como especies cargadas. Estas especies cargadas se van a separar en función de su carga cuando se aplica un voltaje a través de los electrodos.

Los materiales más comunes para separar moléculas de ácidos nucleicos son polímeros como la poliacrilamida o la agarosa. Estos geles se colocan en la cámara de electroforesis, sumergidos en un buffer que se debe encontrar a un pH de 7. De esta forma, las moléculas de ARN sometidas a electroforesis se desplazarán al polo positivo ya que a pH superiores a 5 poseen carga negativa. Los geles se comportan como un tamiz molecular y permiten separar moléculas cargadas en función de su tamaño y forma.

En el caso de los geles de agarosa, se le añade bromuro de etidio, sustancia que se intercala entre las bases del ADN y es fluorescente cuando se ilumina con luz ultravioleta. Tras la electroforesis, se visualiza el gel con una lámpara de luz UV, y se verán las bandas correspondientes a las muestras de ARN.

MATERIAL: Balanza, matraces, probetas, horno de microondas, pipetas, burbuja, cámara de electroforesis, micropipetas, tubos Eppendorf.

EQUIPO:

- Centrífuga Eppendorf (centrifuge 5415c)
- Termobloque Eppendorf (thermostat plus 1.5 mL)
- Foto/prep by Fotodyne (Kodak EDAS 290)



MUESTRAS: ARN disuelto en 500  $\mu$ L de agua Sigma, almacenado en congelación a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

REACTIVOS: Buffer MOPS (ácido -N-morfalino propano sulfónico) 10 X, MOPS 1 X, formaldehído, formamida, bromuro de etidio (200  $\mu\text{g}$  / mL), Glicerol al 50%, EDTA (etilendiamino tetracético) 0.5 M, Azul de bromofenol al 0.25%, Cianolxileno al 0.25%, agarosa, pirocarbonato de dietilo (*DEPC*, *Diethyl pyrocarbonate*, por sus siglas en inglés).

#### PREPARACIÓN DE REACTIVOS

a) MOPS (ácido morfalino propano sulfónico) 10 X (1000 mL)

- Ácido morfalino propano sulfónico 41.86 g
- Acetato de sodio trihidratado 2.72 g
- EDTA 0.5 M pH= 8.0 20 mL

Se disolvió el MOPS en 900 mL de agua DEPC, se ajustó el pH con NaOH y posteriormente se agregaron el resto de los reactivos. Se guardó en un frasco ambar para proteger de la luz.

b) MOPS 1X (1000 mL)

- MOPS 10 X 100 mL
- Agua desionizada 900 ML

c) EDTA pH = 8.0 0.5 M (200 mL)

- EDTA dihidratado, sal sódica 37.22 g

Se disolvió el reactivo en agua DEPC, se ajustó el pH con NaOH y se aforó a 200 mL.

d) Bromuro de Etidio 200  $\mu\text{g}$  / mL (10 mL)

- Bromuro de etidio 2 mg
- Agua DEPC

Se disolvió el bromuro de etidio en agua DEPC. Se filtró con filtro Millex y se guardó a  $4^{\circ}\text{C}$  protegido de la luz.

- e) Buffer de carga LB (loading buffer) 10 X ( 50 mL)
- Glicerol al 50 % en DEPC 49 mL
  - EDTA 0.5 M pH= 8.0 1 mL
  - Azul bromofenol al 0.25% 125 mg
  - Cianoxileno al 0.25% 125 mg

Se disolvió el EDTA, azul de bromofenol y cianolxileno en los 100mL de glicerol al 50%. Se filtró con filtro Millex y se guardó a 4 °C.

## PROCEDIMIENTO

- a) Preparación del gel de agarosa al 1.5%
- Se lavó la cámara de electroforesis, la caja y el peine con agua DEPC, se colocaron en la campana y se niveló con la burbuja.
  - Se pesó en papel aluminio 1.5 g de agarosa grado biología molecular (sin espátula).
  - Se midieron 72 mL de agua DEPC.
  - Se disolvió la agarosa en el agua DEPC en un matraz calentando en microondas y agitando.
  - Se dejó enfriar aproximadamente a 50°C y se agregaron 10 mL de MOPS 10 X y 18 mL de formaldehído.
  - Se vació la agarosa sobre la caja, se revisó que no queden burbujas y se dejó solidificar una hora.
  - Se agregaron aproximadamente 700 mL de buffer MOPS 1 X frío a la caja y se cubrió con plástico adherible hasta que las muestras estuvieran listas para ser cargadas.
- b) Preparación de las muestras y electroforesis.
- Se preparó el buffer de carga LB (loading buffer).
  - Se descongelaron las muestras de ARN.
  - Se calentaron las muestras de ARN en el termobloque a 70 °C durante 5 min.
  - Se les dio un spin a las muestras de ARN en la centrifuga.
  - En tubos Eppendorf nuevos se colocó:

- MOPS 10 X                      1.7  $\mu\text{L}$
  - Formaldehído            2.3  $\mu\text{L}$
  - Bromuro de etidio            1  $\mu\text{L}$
  - Buffer de carga            2  $\mu\text{L}$
- Se calculó la cantidad de ARN y de formamida que se va a agregar como se indica en la sección de “Cálculos”.
  - Se agregó la formamida.
  - Se agregó el ARN.
  - Se cargaron 18  $\mu\text{L}$  de muestra en el gel.
  - Se corrió el gel 2.5 horas a 95 V.
- c) Análisis y fotografía del ARN en el gel de agarosa.
- Se visualizó el gel en el transluminador sobre plástico adherible y se tomó la foto con el equipo Kodak Digital Imaging .

\*Se observaron dos bandas muy claras que corresponden al rARN 28 S y 18 S. En un ARN no degradado la banda 28 S es dos veces más brillante que la 18 S.

## CÁLCULOS

- a) Calcular cuantos microlitros de ARN se requieren para cargar 5  $\mu\text{g}$  de ARN.

1  $\mu\text{L}$   $\rightarrow$  X'  $\mu\text{g}$  de ARN\*

X  $\mu\text{L}$   $\rightarrow$  5  $\mu\text{g}$  de ARN

\*El valor de X'  $\mu\text{g}$  de ARN es el obtenido en la cuantificación del ARN previamente realizada.

- b) Calcular los  $\mu\text{L}$  de ARN y formamida que se van a agregar.

$\mu\text{L}$  de formamida +  $\mu\text{L}$  de ARN = 11  $\mu\text{L}$

$\mu\text{L}$  de formamida = 11 – (  $\mu\text{L}$  de ARN para 5  $\mu\text{g}$  de ARN\*\* )

\*\*Valor calculado como se indica en el inciso a)

#### 5.3.1.4 REACCION RT (transcriptasa reversa por sus siglas en inglés)

USO: Esta técnica se utilizó para convertir el ARN extraído en ADNc el cual es mucho menos lábil, es más fácil manejarlo y es lo que se requiere para posteriormente realizar la técnica de PCR tiempo real.

FUNDAMENTO: Esta técnica permite obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN en particular, partiendo de un mínimo. Sirve para amplificar un fragmento de ADN y así poder analizar el ARN mensajero con el fin de estudiar la expresión de un gen específico. La técnica de *RT* se fundamenta en la propiedad de la ADN-polimerasa para replicar las hebras de ADN, empleando ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación. A continuación, se deja que vuelvan a unirse al ADN Taq-polimerasa, para que vuelvan a duplicarse. La técnica de PCR considera los siguientes parámetros:

1. Sustrato abundante de iniciadores y desoxinucleótidos trifosfato (dNTP).
2. Fuente renovada de ADN-polimerasa.
3. Ciclos periódicos de cambio de temperatura.

Estos permitirán la desnaturalización del ADN a 100%, alineamiento de los iniciadores con la secuencia de interés entre 50-65°C y la síntesis del ADN a 72°C. Estas temperaturas pueden variar de acuerdo a las condiciones de la reacción.

MUESTRAS: ARN disuelto en 500 µL de agua Sigma (agua libre de ARNsas, estéril, reactivo específico), almacenado en congelación a -70°C.

MATERIAL: tubos Eppendorf, cubeta para hielo, micropipetas.

EQUIPO:

- Campana de flujo laminar (Forma Scientific)
- Termociclador Perkin Elmer (Gene Amp PCR System 9600)
- Centrifuga Mini Spin Eppendorf

REACTIVOS: Etanol al 70%, buffer 5X, Oligo dT, dNTP, DTT, Inhibidor, Enzima transcriptasa reversa (TR), agua sigma estéril

## PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- a) DTT 1 M (1 mL)
  - DTT 154.25 mg
  - Agua DEPC aforar a 1 mL
- b) Mezcla dNTP's (400 mL)
  - dCTP 8  $\mu$ L
  - dGTP 8  $\mu$ L
  - dATP 8  $\mu$ L
  - dTTP 8  $\mu$ L
  - Agua sigma 368  $\mu$ L

## PROCEDIMIENTO

- Se prepararon 500  $\mu$ L de ARN con una concentración de 150 ng/  $\mu$ L.
- Se cuantificaron las diluciones de ARN (como se indicó anteriormente).
- Se prendió y limpió la campana de flujo laminar con etanol al 70%.
- Se colocaron los reactivos en hielo.
- Se encendió el termociclador.
- Se calculó la cantidad de ARN y agua que se va a usar como se indica en la sección de "Cálculos".
- En un tubo Eppendorf se preparó un Mix de la siguiente manera (al número total de muestras se le añade uno):
  - Buffer 5X 4  $\mu$ L
  - Oligo dT 2  $\mu$ L
  - dNTP 4  $\mu$ L
  - DTT 2  $\mu$ L
  - Inhibidor 1  $\mu$ L
  - Enzima\* 0.5  $\mu$ L
- Se agregaron 13.5  $\mu$ L del Mix a cada tubo.
- Se agregaron el ARN y el agua sigma.
- Se agitaron en el "vortex" y se dio un spin en la centrifuga.

- Se metieron al termociclador a las siguientes condiciones: 42°C/ 1 hr, 95°C/ 5 min, 4°C / 10 min).

\*La enzima se saca del refrigerador hasta que se va a usar, no se agita, se agrega al mix y se regresa inmediatamente al refrigerador

## CÁLCULOS

Para ajustar la cantidad de agua y ARN:

$$\mu\text{L Agua sigma} + \mu\text{L ARN} = 6.5 \mu\text{L}$$

Se quiere una concentración de 300 ng.

$$1 \mu\text{L} \longrightarrow X' \text{ ng de ARN} *$$

$$X \mu\text{L} \longrightarrow 300 \text{ ng de ARN}$$

\*El valor de X'  $\mu\text{g}$  de ARN es el obtenido en la cuantificación del ARN previamente realizada.

### 5.3.1.5 PCR TIEMPO REAL (Reacción en cadena de la polimerasa)

USO: La importancia de la *PCR* (reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés) radica en la posibilidad de amplificar millones de veces una secuencia específica y seleccionar oligonucleótidos o indicadores complementarios con la secuencia de nucleótidos de los extremos opuestos de las cadenas que flanquean a la secuencia específica, a partir de los cuales se inicia la elongación o síntesis de nuevas cadenas en el extremo 3' de cada indicador.

FUNDAMENTO: La técnica de *PCR* en tiempo real permite obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN en particular, partiendo de un mínimo. Esta técnica sirve para amplificar un fragmento de ADN y así poder analizar el ARN mensajero con el fin de estudiar la expresión de un gen específico. La técnica de *PCR* se fundamenta en la propiedad de la ADN-polimerasa para replicar las hebras de ADN, empleando ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación. A continuación, se deja que vuelvan a unirse al ADN Taq-polimerasa, para que se vuelvan a duplicar. La técnica de *PCR* considera los siguientes parámetros:

4. Sustrato abundante de iniciadores y desoxinucleótidos trifosfato (dNTP).
5. Fuente renovada de ADN-polimerasa.
6. Ciclos periódicos de cambio de temperatura.

Estos permitirán el 100 % de desnaturalización del ADN, alineamiento de los iniciadores con la secuencia de interés entre 50-65°C y la síntesis del ADN a 72°C. Estas temperaturas pueden variar de acuerdo a las condiciones de la reacción.

MUESTRAS: cADN obtenido de la reacción de transcriptasa reversa realizada previamente, almacenadas en congelación a -70 °C

EQUIPO:

- ABIPRISM 7000 de Applied Biosystems
- Campana de flujo laminar (Forma Scientific)

- Centrifuga Mini Spin Eppendorf

MATERIAL: Micropipetas, placa para PCR, tubos Eppendorf, film para la placa de PCR

REACTIVOS: Agua DEPC, etanol al 70%, Master Mix\*, Sonda A\_o\_D\*\* (assay on demmand)

## PROCEDIMIENTO

- Se prendió y limpió la campana de flujo laminar con etanol al 70%.
- Se colocaron los reactivos en hielo.
- Se preparó el Mix de la siguiente manera (al número de muestras se le sumó uno):
  - Agua DEPC 4  $\mu$ L
  - Master Mix 6  $\mu$ L
  - Sonda AoD 0.6  $\mu$ L
- Se agregaron 10.6  $\mu$ L de Mix a cada tubo de la placa .
- Se agregaron 1.4  $\mu$ L de cADN a cada tubo de la placa.
- Se introdujo la placa en el equipo de PCR tiempo real.
- Se corrieron los programas de la siguiente manera:
  - 1 ciclo: (95°C/5 min, T°A<sup>\*\*\*</sup>/ 1 min, 72°C/1 min)
  - 33 ciclos: (95°C/5 min, T°A<sup>\*\*\*</sup>/ 1 min, 72°C/1 min)
  - 1 ciclo: (95°C/5 min, T°A<sup>\*\*\*</sup>/ 1 min, 72°C/1 min)
- Se obtuvo la gráfica y los datos de PCR.
- Se analizaron los resultados.

\* Master Mix: Es un preparado de la marca Applied Biosystems que ya incluye la enzima (Taq polimerasa), buffer de PCR, Cloruro de magnesio y mezcla de dNTPs.

\*\*Sonda AoD (assay on demmand): incluye el upper primer y lower primer para el gen que se desee estudiar.



\*\*\*T°A = temperatura de alineamiento ( 50-65°C)

NOTA.- La reacción de PCR en tiempo real se realizó para el gen constitutivo que en este caso es ciclofilina y para el o los genes que se deseen estudiar.

## CÁLCULOS

El equipo de PCR tiempo real arrojó un valor llamado “ ct”.

- Se obtuvo el promedio de los valores de ct del grupo control (Caseína 20 %) tanto de ciclofilina como del gen que se quiere estudiar.
- Se calculó  $\delta ct$  y  $\delta\delta ct$  para el promedio del grupo control.
- Se calculó  $\delta ct$  y  $\delta\delta ct$  para el resto de las muestras (individualmente, no por grupo).
- Se calculó el valor de la expresión génica de cada muestra.
- Se obtuvo el promedio de la expresión génica de cada grupo.
- Se comparó el promedio de expresión génica de cada grupo con el grupo control.
- Se obtuvo la estadística de los valores para determinar si son estadísticamente diferentes.

Para calcular el valor de expresión génica:

$$ct \text{ SREBP-1} - ct \text{ Ciclofilina} = \delta ct \text{ muestra}$$

\*\*Donde: Ciclofilina es el gen constitutivo.

$$\delta ct \text{ muestra} - \delta ct \text{ grupo control} = \delta\delta ct$$

$$2^{-\delta\delta ct} = \text{valor de expresión génica}$$

## **5.3.2 DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS EN TEJIDO RENAL**

### **5.3.2.1 EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS (MÉTODO DE FOLCH)**

USO: Esta técnica se utilizó para llevar a cabo la extracción de los lípidos renales para su posterior cuantificación.

FUNDAMENTO: La mezcla cloroformo/metanol 2:1 extrae el total de lípidos. La extracción y purificación de lípidos a partir del tejido animal se desarrolló en dos operaciones: 1) los lípidos fueron extraídos por homogenización del tejido con la mezcla de solventes cloroformo/metanol 2:1 y centrifugando el homogenizado; 2) el homogenizado, el cual contiene los lípidos de los tejidos acompañado de sustancias no lipídicas, es liberado de éstas por la adición de NaCl al 0.9%. Se obtuvo un sistema bifásico. La fase superior fue desechada. La fase inferior contiene esencialmente el total de lípidos de los tejidos.

MATERIAL: Gradilla, tubos esmerilados, tubos “falcón”, piseta, tubos “corex” de 30 mL, pipeta estéril desechable, micropipetas, puntas de micropipeta, pipetas Pasteur, cortador (“cutter”), tubos con rosca, “vortex”.

MUESTRAS: Riñón de rata Zucker<sup>fa/fa</sup> conservado en congelación (-70°C).

REACTIVOS: Solución Cloroformo/metanol 2:1, NaCl al 0.9%, Isopropanol/Triton al 10%.

#### **PREPARACIÓN DE REACTIVOS**

a) Solución cloroformo/ metanol 2:1 ( 120 mL)

- Cloroformo            80 mL

- Metanol                40 mL

b) NaCl al 0.9% (100 mL)

- NaCl                    0.9 g

Aforar a 100 mL con agua destilada

c) Isopropanol/Triton al 10% (50mL)

- Isopropanol (2-propanol)            45 mL

- Triton X100                                5 mL

#### EQUIPO:

- Centrifuga Beckman (JC-MC Centrifuge)
- Polytron Kinematica
- Vórtex
- Aireador

#### PROCEDIMIENTO

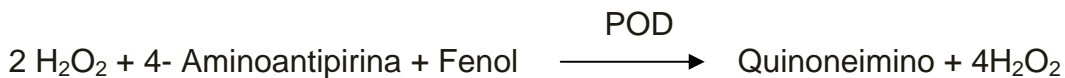
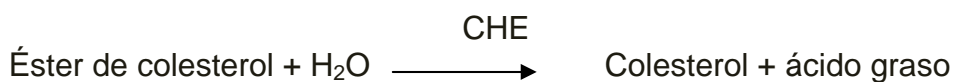
- Se pipetearon 6 mL de solución cloroformo/metanol en tubos esmerilados.
- Se colocaron 150 mg de tejido y se homogenizaron con "Polytron" por 1 minuto.
- Se taparon con aluminio y se dejaron reposar 15 min a temp. ambiente.

### 5.3.2.2 CUANTIFICACIÓN DE COLESTEROL EN TEJIDO RENAL

#### COLESTEROL FS\* (\*Fluid Stable = líquido estable)

USO: Se utilizó esta técnica para realizar una determinación cuantitativa *in vitro* de colesterol total presente en el tejido renal de los animales analizados.

FUNDAMENTO: Determinación del colesterol después de la hidrólisis enzimática y la oxidación. El indicador colorimétrico es el quinoneimino que se genera de 4-aminoantipirina y fenol por el peróxido de hidrógeno bajo la acción catalítica de la peroxidada (Reacción de Trinder).



CHE: colesterol esterasa

CHO: colesterol oxidasa

POD: peroxidasa

MATERIAL: Reactivo de colesterol, pipetas automatizadas, cronómetro, tubos de ensayo, espectrofotómetro con capacidad de leer a 520nm, Termobloque multiblock Heater (Lab line), estándar o calibrador de triglicéridos, sueros control de colesterol con concentración conocida.

REACTIVOS:

Solución amortiguadora	pH 6,7	50 mmol/L
Fenol		5mmol/L
4- Aminoantipirina		0,3 mmol/L

Colesterol esterasa	(CHE)	$\geq 200$ U/L
Colesterol oxidasa	(CHO)	$\geq 50$ U/L
Peroxidasa	(POD)	$\geq 3$ kU/L
Estándar	200 mg/dL	5,2 mmol/L

## PROCEDIMIENTO

- Longitud de onda 500 nm - 546 nm
- Paso óptico 1cm
- Temperatura 20 – 25°C / 37°C
- Medición Respecto al blanco de reactivo
- Mezclar
- Se incubó durante 20 minutos a 20 – 25°C o durante 10 minutos a 37°C.
- Se leyó la absorbancia dentro de 60 minutos contra el blanco de reactivo.

## CÁLCULOS

Con estándar o calibrador.

$$\text{Colesterol [mg / dL]} = \frac{\Delta A \text{ Muestra}}{\Delta A \text{ Estd. / Cal}} \times \text{Conc. Estd. / Cal [mg / dL]}$$

Para convertir de mg/ dL de colesterol a mmol/L se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Colesterol [mg / dL]} \times 0,02586 = \text{Colesterol [mmol/L]}$$

## VALORES DE REFERENCIA

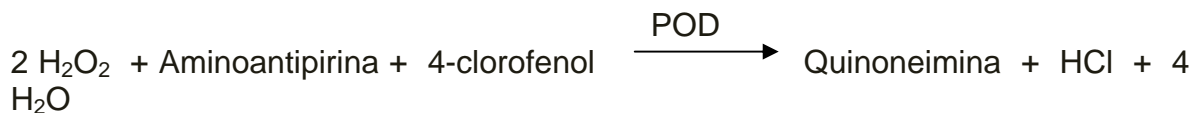
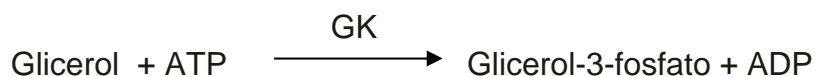
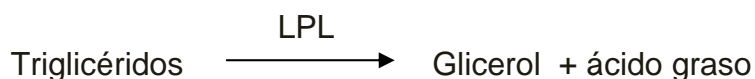
Deseable	$\leq 200$ mg /dL (5,2 mmol/L)
Límite de alto riesgo	200 – 240 mg /dL (5,2 – 6,2 mmol/L)
Alto riesgo	> 240 mg/dL (>6,2 mmol/L)

### 5.3.2.3 CUANTIFICACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS EN TEJIDO RENAL

#### Triglicéridos FS\* (\*Fluid Stable = líquido estable)

USO: Se utilizó esta técnica para realizar una determinación cuantitativa *in vitro* de los triglicéridos totales presentes en el tejido renal de los animales analizados.

FUNDAMENTO: Determinación de los triglicéridos después de la división enzimática con lipoproteína lipasa. El indicador es la quinoneimina la cual se genera a partir de la 4-aminoantipirina y el 4-clorofenol por el peróxido de hidrógeno bajo la acción catalítica de la peroxidasa.



LPL: lipoproteína lipasa

GK: Glicerocinasa

GPO: Glicerol 3-fosfato oxidasa

POD:peroxidasa

#### REACTIVOS

Componentes y concentraciones en el test

Reactivo:

Amortiguadora de "Good"	pH 7.2	50 mmol/L
4-Clorofenol		4 mmol/L
ATP		2 mmol/L
Mg <sup>2+</sup>		15 mmol/L
Glicerocinasa	(GK)	≥0.4 kU/L
Peroxidasa	(POD)	≥ 2 kU/L
Lipoproteínlipasa	(LPL)	≥ 2 kU/L
4-Aminoantipirina		0.5 mmol/L
Glicerol-3-fosfato-oxidasa	(GPO)	≥ 0.5 kU/L
Estándar:		200 mg/ dL (2.3 mmol/L)

MATERIAL: Reactivo de triglicéridos, pipetas automatizadas, cronómetro, tubos de ensayo, espectrofotómetro con capacidad de leer a 520nm, Termobloque Multiblock Heater (Lab line), estándar o calibrador de triglicéridos, sueros control de triglicéridos con concentración conocida.

#### PROCEDIMIENTO

- Longitud de onda 500 nm, Hg 546 nm
- Paso óptico 1cm
- Temperatura 20 – 25°C / 37°C
- Se midió respecto al blanco de reactivo
- Se mezcló
- Se incubó durante 20 minutos a 20 – 25°C o durante 10 minutos a 37°C.
- Se leyó la absorbancia dentro de 60 minutos contra el blanco de reactivo.

## CÁLCULOS

Con estándar o calibrador.

$$\text{Triglicéridos [mg / dL]} = \frac{\Delta A \text{ Muestra}}{\Delta A \text{ Estd. / Cal}} \times \text{Conc. Estd. / Cal [mg / dL]}$$

## VALORES DE REFERENCIA

Deseable  $\leq 200$  mg /dL (en ayuno) (2,3 mmol/L)

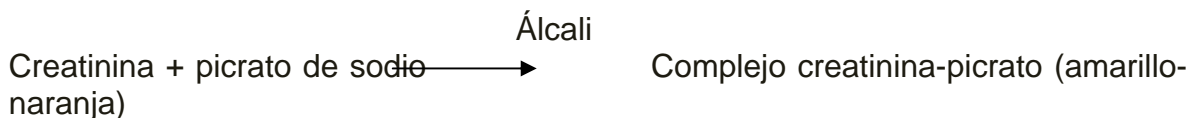
Límite de alto riesgo 200 – 240 mg /dL (2,3 – 4,5 mmol/L)

Alto riesgo  $> 400$  mg/dL (4,5 mmol/L)

### 5.3.3 DETERMINACIÓN DE CREATININA EN SUERO

USO: Se realizó la determinación cuantitativa de creatinina presente en suero y orina de los animales analizados, para obtener el nivel de depuración de creatinina y de esta manera conocer la evolución del daño renal.

FUNDAMENTO: La creatinina reacciona con el ácido pícrico en condiciones alcalinas para formar un complejo de color que absorbe a 510 nm. La razón de formación del color es proporcional a la creatinina en la muestra



## REACTIVOS

Creatinina reactivo 1: Buffer alcalino

Creatinina reactivo 2: Ácido Pícrico 40 mM. Surfactante



MATERIAL: Creatinina R1, creatinina R2, pipetas automatizadas, cronómetro, tubos de ensayo, espectrofotómetro con celda de temperatura controlada, bloque térmico (37°C).

## PROCEDIMIENTO

- Longitud de onda            510 nm
- Tipo de ensayo              razón inicial
- Razón muestra/reactivo 1:20
- Dirección de la reacción incremento
- Temperatura                    37°C
- Tiempo lag                    60 seg
- Tiempo de lectura            60 seg
- Valor normal bajo            0.40
- Valor normal alto            1.40
- Se colocó la celda del espectrofotómetro a 37°C.
- Se pipeteó 1 mL del reactivo de trabajo en cada tubo.
- Se ajustó a cero respecto el espectrofotómetro con blanco de reactivo a 510 nm.
- Se agregó 50 µL de muestra al reactivo, se mezcló e inmediatamente se colocó en la celda.
- Se leyó exactamente después de 60 segundos y se anotó la absorbancia (A1).
- Se volvió a leer exactamente 60 segundos después de A1, y se anotó la absorbancia (A2).
  - Se calculó el cambio de absorbancia (A1-A2).
  -

## CÁLCULO

Con estándar o calibrador.

$$\text{Creatinina [mg / dL]} = \frac{\text{Abs Muestra}}{\text{Abs Estd}} \times \text{Conc.Estd.[mg / dL]}$$

## VALORES DE REFERENCIA

0.40-1.40 mg/dL                    en humanos

35,36-44,20  $\mu\text{mol/ L}$                     en rata Zucker<sup>fa/fa</sup>

Depuración de creatinina (mL /min) =  $\frac{\text{Flujo urinario (mL/min)} * \text{Creatinina urinaria (mg/dL)}}{\text{Creatinina sérica (mg/dL)}}$

En donde:

$$\text{Flujo urinario (mL /min)} = \frac{\text{Vol. orina 24 h (mL)}}{1440 \text{ min}}$$

### 5.3.4 TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

#### 5.3.4.1 OBTENCIÓN DE PREPARACIONES HISTOLÓGICAS

USO.- Se utilizan para obtener preparaciones histológicas de cortes de tejido montados sobre un cubreobjetos con imágenes de estructuras contrastadas para su estudio y observación mediante microscopía óptica.

Nota: Este procedimiento se utiliza para tinciones que no se llevan a cabo en fresco.

FUNDAMENTO.- Para obtener una preparación histológica deben llevarse a cabo una serie de etapas hasta la inclusión en parafina. Las etapas son las siguientes:

- Fijación : se trata el tejido con sustancias químicas con la finalidad de conservarlo lo mas parecido posible a su estado *in vivo*, interrumpir los procesos celulares *post mortem*, destruir microorganismos, aumentar la dureza para facilitar la preparación de películas finas.
- Deshidratación: la muestra se hace pasar por concentraciones crecientes de etanol, empezando con etanol al 70% hasta etanol absoluto. El objetivo es eliminar el agua del tejido.
- Aclaramiento: El tejido se pasa a una solución miscible tanto con el etanol como con la parafina la sustancia comúnmente utilizada es el xilol. Se llama aclaramiento ya que el tejido se torna transparente, esto se debe a que cambia su índice de refracción.
- Inclusión: A fin de que los cortes puedan ser suficientemente finos y ser observados al microscopio deben ser envueltos en alguna sustancia de consistencia firme, en este caso la parafina.
- Corte: el bloque de parafina se corta en un equipo llamado micrótomo. El grosor del corte debe ser de 3 a 10 micrómetros, deben ser lo suficientemente delgadas para permitir el paso de la luz y así puedan ser observadas en el microscopio.
- Tinción.- Los cortes carecen de color y no son aptos para su observación en el microscopio, por lo tanto, se le realizan distintos tipos de tinciones dependiendo de que es lo que se quiera analizar.

EQUIPO.- Estufa, micrótomo

MATERIAL.- casete de inclusión, vasos de precipitados, equipo de disección, guillotina,

REACTIVOS.- etanol al 70%, etanol al 80%, etanol al 90%, etanol al 96%, etanol absoluto, formalina al 10%, xilol, parafina

## PREPARACIÓN DE REACTIVOS

### Formalina al 10%

- Formalina comercial 100 mL
- Fosfato de sodio monobásico 3.4 g
- Fosfato de sodio dibásico 6.1 g
- Agua destilada 900 mL

Disolver el fosfato de sodio monobásico y el fosfato de sodio dibásico en el agua destilada. Agregue la formalina y mezcle bien.

### PROCEDIMIENTO

1.- Se obtuvo el tejido renal

#### Fijación

2.- Se introdujo el tejido en formalina al 10% durante 24 hrs.

#### Deshidratación

3.- Se sumergió el tejido en etanol al 70% durante 1 hr.

4.- Se sumergió el tejido en etanol al 80% durante 1 hr.

5.- Se sumergió el tejido en etanol al 90% durante 1 hr.

6.- Se sumergió el tejido en etanol al 96% durante 1 hr.

7.- Se sumergió el tejido en etanol absoluto durante 1 hr.

#### Aclaramiento

8.- Se sumergió el tejido en xilol durante 1 hr.

#### Inclusión

9.- Se colocó la muestra de tejido en un recipiente y se agregó la parafina fundida a 60°C

10.- Se colocó la muestra en la estufa durante 2 hrs. a 60°C

11.- Se colocó la muestra en el cassette de inclusión y se rellenó con parafina fundida.

Corte

12.- Se cortó la muestra en el micrótopo con un grosor de 3 a 5 micrómetros.

#### **5.3.4.2 TINCIÓN TRICRÓMICA DE MASSON**

USO.- La tinción tricrómica de Masson se utiliza para la coloración de fibras de colágeno elásticas.

FUNDAMENTO.- Las coloraciones tricrómicas usan dos o más colorantes para teñir diferencialmente las diversas estructuras histológicas, según su basofilia / acidofilia o por su apetencia por un colorante específico. Es una técnica para la coloración de fibras colágenas y elásticas. Se observan 3 colores distintos: estructuras basófilas (como la cromatina) de color pardo-marrón a negro, las estructuras débilmente acidófilas de rojo a naranja y las fuertemente acidófilas (como las fibras de colágeno) de azul a verde.

EQUIPO.- Estufa

MATERIAL.- Portaobjetos, cubreobjetos, vasos de precipitados, frascos con goteros, piseta, frascos para reactivos

REACTIVOS.- Xilol, etanol absoluto, etanol al 96%, etanol al 70%, agua destilada, colorante hematoxilina de Weigert, colorante fucsina de Ponceau, ácido fosfomolibdico, colorante verde luz, bálsamo de Canadá, cloruro férrico, ácido clorhídrico 1 N.

#### **PREPARACIÓN DE REACTIVOS**

Cloruro Férrico al 29 %

- Cloruro férrico 29 g
- Agua destilada 100 mL

Se disolvió el cloruro en el agua destilada y se mezcló bien.

Hematoxilina de Weigert

Solución A:

- Hematoxilina 1 g
- Etanol al 96 % 100 mL

Se disolvieron los cristales de hematoxilina en el etanol y se mezcló bien.

Solución B:

- Cloruro Férrico al 29% 4 mL
- ácido clorhídrico 1 N 1 mL
- Agua destilada 95 mL

Se mezcló bien

\*\* Se mezcló antes de usarse partes iguales de solución A y B (mezclar siempre B sobre A).

Fucsina de Ponceau (fucsina ácida)

- Fucsina 1 g
- Etanol al 70% 100 mL

Se disolvieron los cristales de fucsina en el etanol y se mezcló bien.

Verde Luz

- Verde luz 1 g
- destilada 100 mL

Se disolvieron los cristales de verde luz en agua destilada y se mezcló bien.

ácido fosfomolibdico

- ácido fosfomolibdico            5 mg
- Agua destilada                    100 mL

Se disolvió el ácido fosfomolibdico en el agua destilada y se mezcló bien.

## PROCEDIMIENTO

Desparafinado

- 1.- Se calentó la muestra en estufa durante 20 min a 60°C.
- 2.- Se sumergió la muestra en xilol durante 15 min.

Hidratación

- 3.- Se sumergió en etanol absoluto durante 5 min.
- 4.- Se sumergió en etanol al 96% durante 5 min.
- 5.- Se sumergió en etanol al 70% durante 5 min.
- 6.- Se lavó con agua destilada.

Tinción

- 7.- Se bañó la muestra con el colorante hematoxilina de Weigert y se dejó durante 5 min.
- 8.- Se enjuagó con agua corriente durante 10 min.
- 9.- Se enjuagó con agua destilada.
- 10.- Se bañó la muestra con el colorante fucsina de Ponceau y se dejó durante 5 min.

- 11.- Se enjuagó con agua destilada.
- 12.- Se agregó la solución de ácido fosfomolibdico y se dejó durante 5 min.
- 13.- Se enjuagó con agua destilada.
- 14.- Se volvió a agregar solución de ácido fosfomolibdico y se dejó durante 5 min.
- 15.- Se enjuagó con agua destilada.
- 16.- Se bañó la muestra con el colorante verde luz y se dejó de 5 a 7 min.

#### Deshidratación

- 17.- Se sumergió en etanol al 70% durante 5 min.
- 18.- Se sumergió en etanol al 96% durante 5 min.
- 19.- Se sumergió en alcohol absoluto durante 5 min.
- 20.- Se sumergió en Xilol durante 5 min.
- 21.- Se lavó con agua destilada.

#### Montaje

- 22.- Se mantuvieron los portaobjetos en xilol hasta el momento de ser procesados.
- 23.- Se limpió el portaobjetos suavemente para quitar el exceso de xilol.
- 24.- Se añadió al portaobjetos 1- 3 gotas de bálsamo de Canadá (medio de montaje).
- 25.- Se colocó la muestra sobre el portaobjetos.
- 26.- Se colocó el cubreobjetos de tal manera que todas las gotas de medio de montaje lo toquen para así evitar que se formen burbujas.
- 27.- Se retiró con una toalla de papel el exceso de medio de montaje.
- 28.- Se colocó el portaobjetos en la estufa a 42 °C y se dejó que se seque.



### 5.3.4.3 TINCIÓN DEL ÁCIDO PERYÓDICO DE SCHIFF (PAS)

USO.- La reacción de PAS tiñe hidratos de carbono, y se usa para detectar: gránulos de glucógeno, membranas basales de los epitelios y fibras reticulares de tejido conjuntivo.

FUNDAMENTO.- Se basa en la reacción con el reactivo de Schiff de los grupos aldehído liberados de los grupos glicol presentes en los hidratos de carbono tras su oxidación con ácido peryódico. El reactivo de Schiff contiene fucsina básica (o pararrosanilina), que en solución ácida y en presencia de SO<sub>2</sub> da lugar a una forma no coloreada (ácido N-sulfónico). Este reactivo reacciona con los grupos aldehído libres formando un compuesto insoluble de color púrpura. Esta técnica se utiliza sobre cortes obtenidos de tejido incluido en parafina o de tejido congelado.

Se observan los hidratos de carbono de color púrpura.

EQUIPO.- Estufa

MATERIAL.- Portaobjetos, cubreobjetos, vasos de precipitados, frascos con goteros, piseta, papel filtro, frascos para reactivos

REACTIVOS.- Xilol, etanol absoluto, etanol al 96%, etanol al 70%, agua destilada, ácido peryódico, reactivo de Schiff, bisulfito de sodio, hematoxilina, bálsamo de Canadá, ácido clorhídrico 1 N, color vegetal, fucsina básica, sulfato aluminico potásico, iodato de sodio.

#### PREPARACIÓN DE REACTIVOS

ácido peryódico al 0.5% acuoso

- ácido peryódico      0.5 g
- Agua destilada      100 mL

Se disolvió el ácido peryódico en el agua destilada y se mezcló bien.

#### Reactivo de Schiff

- Fucsina básica                    1 g
- Agua destilada                    200 mL
- HCl 1 N                            20 mL
- bisulfito de Sodio                1 g
- Color vegetal                    0.5 g

Se disolvió la fucsina en agua destilada caliente y se calentó hasta que hirvió. Se dejó enfriar hasta aproximadamente 50 °C y se filtró. Se añadió el HCl y se dejó enfriar. Se añadió el bisulfito de sodio. Se dejó reposar 48 hrs en la oscuridad (debe adquirir un color paja).

Se añadió el color vegetal y se agitó un minuto. Se filtró hasta tener un color claro. Se almacenó en refrigeración en frasco ámbar.

#### Hematoxilina de Mayer

- Agua destilada                    1000mL
- Hematoxilina                    1 g
- Sulfato alumínico potásico    50 g
- Iodato de sodio                    0.2 g

Se disolvió el sulfato alumínico potásico en el agua destilada a temperatura ambiente; una vez disuelto se añadió la hematoxilina y el iodato sódico.

## PROCEDIMIENTO

### Desparafinado

1.- Se calentó la muestra en estufa durante 20 min a 60°C.

2.- Se sumergió la muestra en xilol durante 15 min.

#### Hidratación

3.- Se sumergió en etanol absoluto durante 5 min.

4.- Se sumergió en etanol al 96% durante 5 min.

5.- Se sumergió en etanol al 70% durante 5 min.

6.- Se lavó con agua destilada.

#### Tinción

7.- Se agregó sobre la muestra ácido peryódico y se dejó durante 5 min.

8.- Se lavó con agua corriente durante 5 min.

9.- Se agregó reactivo de Schiff y se dejó durante 5 min.

10.- Se agregó bisulfito de sodio al 2% y se dejó durante 5 min.

11.- Se lavó con agua corriente durante 5 min.

12.- Se agregó hematoxilina de Mayer y se dejó durante 10 min.

13.- Se lavó con agua corriente durante 5 min.

#### Deshidratación

14.- Se sumergió en etanol al 70% durante 5 min.

15.- Se sumergió en etanol al 96% durante 5 min.

16.- Se sumergió en alcohol absoluto durante 5 min.

17.- Se sumergió en Xilol durante 5 min.

18.- Se lavó con agua destilada.

## Montaje

19- Se mantuvieron los portaobjetos en xilol mientras le tocó el turno de ser procesado.

20.- Se limpió el portaobjetos suavemente para quitar el exceso de xilol.

21.-Se añadió al portaobjetos 1- 3 gotas de bálsamo de Canadá (medio de montaje).

22.- Se colocó la muestra sobre el portaobjetos.

23.- Se colocó el cubreobjetos de tal manera que todas las gotas de medio de montaje lo tocaran para así evitar que se formaran burbujas.

24.- Se retiró con una toalla de papel el exceso de medio de montaje.

25.- Se colocó el portaobjetos en la estufa a 42 °C y se dejó secar.

### **5.3.4.4 ANÁLISIS DE LAS PREPARACIONES MEDIANTE MICROSCOPIA**

Una vez que se tienen las laminillas ya teñidas se observaron y analizaron al microscopio, utilizando el programa Leica QWin. Se escogieron las 5 mejores laminillas de cada grupo y en cada laminilla y en cada una se analizaron 10 campos, utilizando el objetivo de 40X, por lo que se tuvo un aumento de 400 veces.

En las laminillas con tinción de PAS se evaluó la expansión mesangial. Se midieron con el programa Leica QWin 10 glomérulos y en cada uno de estos las zonas donde se observó una tinción roja intensa, las cuales indicaron el grado de expansión mesangial.

En las laminillas con tinción de Masson, el procedimiento fue el mismo que en las laminillas con tinción de PAS a diferencia de que en este caso se midieron las

zonas en donde se observó una tinción azul intensa, las cuales indicaron la fibrosis presente en el glomérulo.

Una vez medidos los campos se obtuvo el promedio de cada muestra y posteriormente de cada grupo. Para así obtener el porcentaje de expansión mesangial y el porcentaje de fibrosis respectivamente. Los resultados se graficaron y analizaron.

### **5.3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados se expresaron como el promedio *SEM* (error estándar de la media, por sus siglas en inglés). Cada grupo incluyó aproximadamente siete animales. Los datos fueron analizados por análisis de varianza, ANOVA, cuando el análisis fue significativo se evaluó por medio de la prueba de *t student* para ANOVA. La significancia estadística se acepta a un nivel de  $p < 0.05$ .

## **CAPÍTULO VI**

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

#### **6.1 CUANTIFICACIÓN DE ARN**

Se realizó la extracción del ARN total de tejido renal de ratas de raza Zucker<sup>fa/fa</sup> alimentadas durante 55 días mediante los diferentes tratamientos dietarios antes descritos.

Posterior a la extracción del ARN del riñón, se realizó la cuantificación de éste mediante espectrofotometría. La cuantificación se realizó a 260 nm. También se midió la absorbancia de las muestras a 280 nm, con el objetivo de obtener la relación  $\text{abs. a 260 nm} / \text{abs. a 280 nm}$  la cual ayuda a determinar la pureza del ARN extraído. El valor de la relación  $\text{abs. 260 nm} / \text{abs. a 280 nm}$  se debe encontrar en un rango de 1.9 a 2.2, ya que valores fuera de este rango pueden indicar contaminación de la muestra con proteína. En la Tabla A.I.1 se muestran los valores obtenidos mediante la determinación de absorbancia a 260/280 nm, por lo que los valores dentro del rango indican la pureza y, por lo tanto, las muestras no están contaminadas. La Tabla A.I.2 muestra ya los valores obtenidos de concentración para el ARN.

#### **6.2 ELECTROFORESIS DE ARN**

Para comprobar la integridad del ARN extraído, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. La Tabla A.I.3 muestra los cálculos para que en el cargado del gel todas las muestras tuvieran la misma concentración. En un ARN íntegro (no degradado) deben observarse dos bandas muy claras que corresponden a los fragmentos de ARNr 28 S y 18 S, la banda 28 S debe ser dos veces mas brillante que la banda 18 S. En las Figuras 6.1 a 6.4 se puede observar que en los geles obtenidos se tienen perfectamente separadas las dos bandas de ARNr, una con mayor intensidad que la otra. Incluso, en la parte inferior del gel se pude observar

una banda muy tenue que indica la presencia de ARNm, por lo tanto, el ARN extraído se encuentra íntegro.

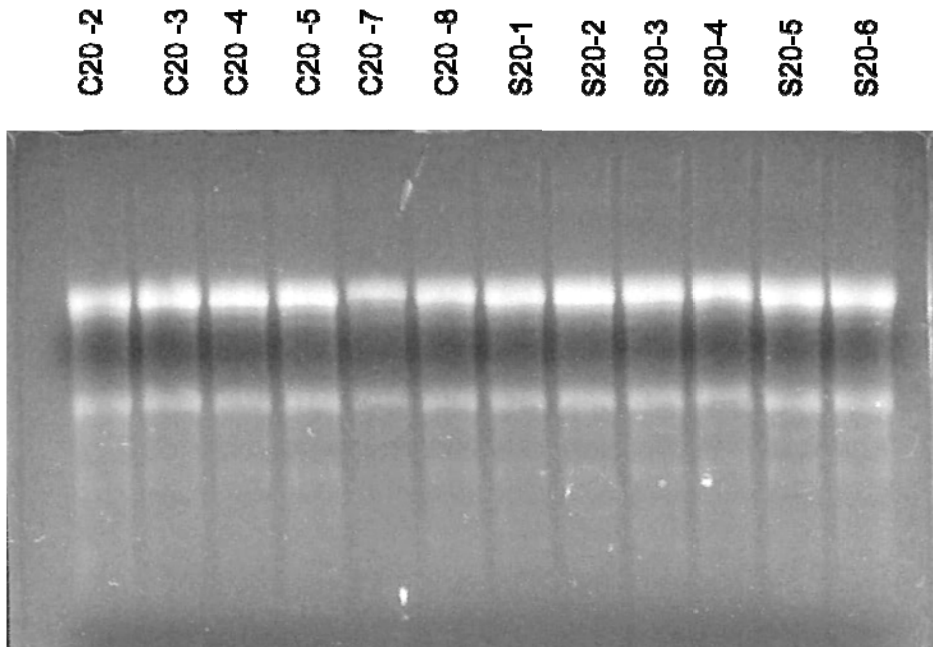


Figura 6.1 Imagen del gel A de agarosa para electroforesis de ARN

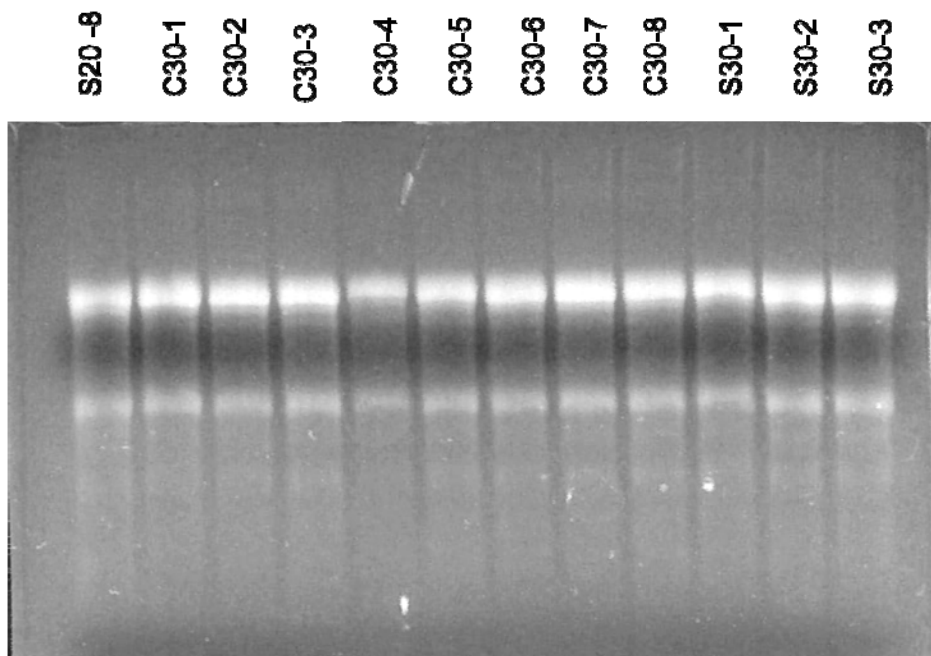


Figura 6.2 Imagen del gel B de agarosa para electroforesis de ARN

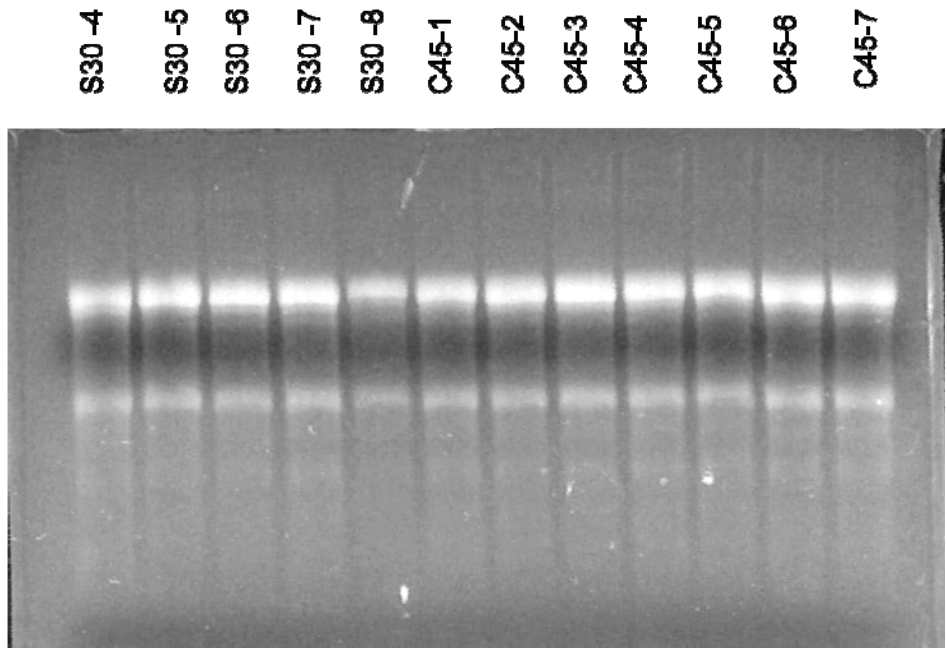


Figura 6.3 Imagen del gel C de agarosa para electroforesis de ARN

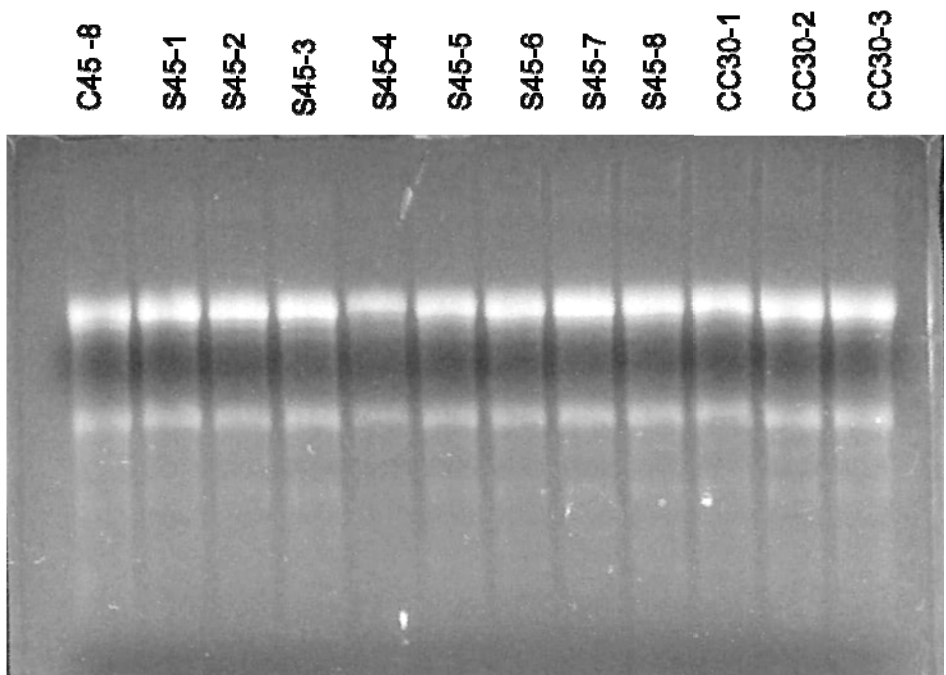


Figura 6.4 Imagen del gel D de agarosa para electroforesis de ARN

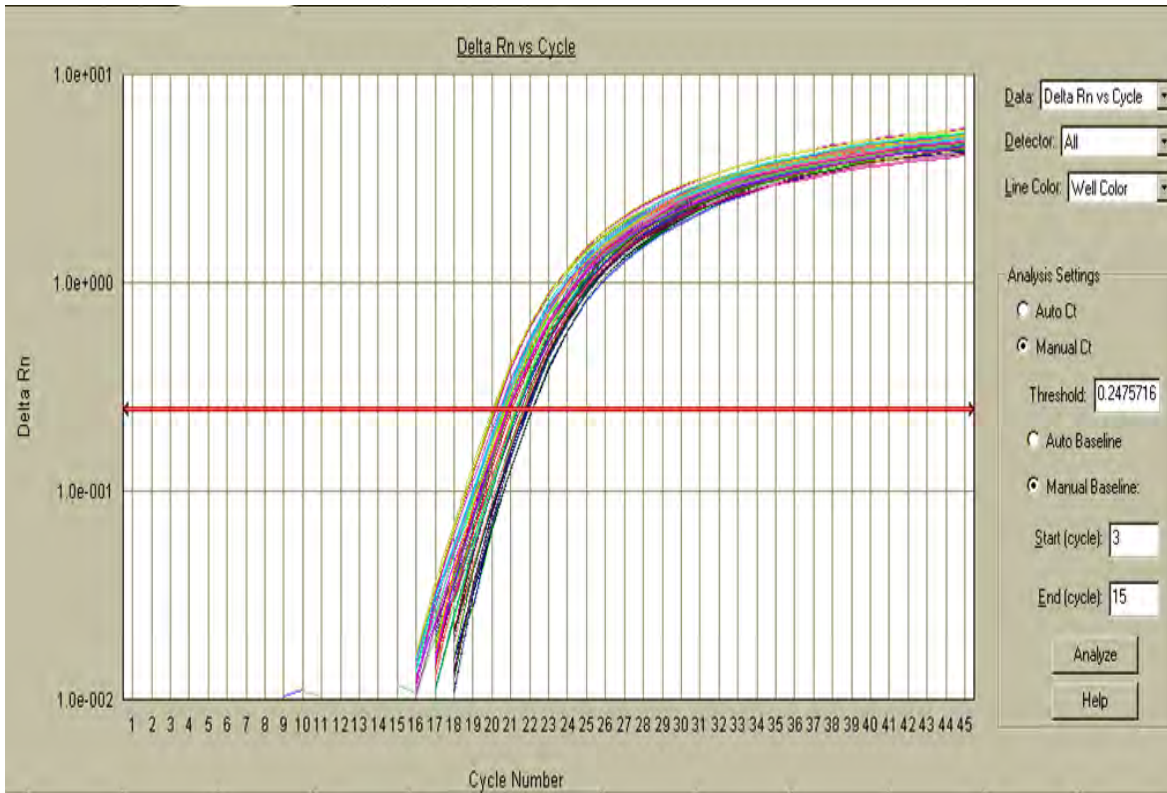


### **6.3. REACCIÓN DE LA TRANSCRIPTASA REVERSA (*RT* por sus siglas en inglés)**

Una vez analizada y corroborada la pureza e integridad del ARN extraído, se realizaron las diluciones correspondientes para poder llevar a cabo la reacción de *RT* (Tabla A.I.4). Las diluciones se cuantificaron para asegurarse de que estuvieran en un rango de 130 a 170 ng/ $\mu$ L (Tabla A.I.5). Con estas diluciones se realizó la reacción de *RT* con lo que se obtuvo el ADNc necesario para realizar el estudio de la reacción en cadena de la polimerasa (*PCR* por sus siglas en inglés) en tiempo real (Tabla A.I.6).

### **6.4 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (*PCR* por sus siglas en inglés)**

Para las determinaciones de *PCR* en tiempo real se requirió primero realizar el estudio con un gen constitutivo o que se exprese en forma continua, el cual independientemente del tratamiento que se le dé al animal no debe cambiar sus niveles de expresión. En este caso se empleó el gen constitutivo de la ciclofilina que se determinó en tejido renal. Se decidió usar este gen ya que al realizar la determinación de expresión génica en tiempo real no varió con los diferentes tratamientos dietarios utilizados. En la figura 6.5 puede observarse que las curvas de expresión génica obtenidas en el *PCR* tiempo real de ciclofilina, son muy cercanas entre sí. Esto indica que la expresión génica de las muestras para el gen constitutivo de la ciclofilina se encuentran en el mismo rango de expresión independientemente del tratamiento dietario administrado.



**Figura 6.5 Pantalla del programa para la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para la amplificación del gel de ciclofilina**

Se evaluó la expresión génica de los factores de transcripción SREBP-1, SREBP-2 y algunos de sus genes blanco, los cuales fueron: FAS, HMG-CoA reductasa, CPT-1. Se evaluaron además algunos genes involucrados en el proceso inflamatorio y de fibrosis, los cuales fueron: TNF- $\alpha$ , IL 6, TGF- $\beta$  y Colágena Tipo IV, así como la expresión de los genes de las proteínas Nefrina y Podocina en tejido renal.

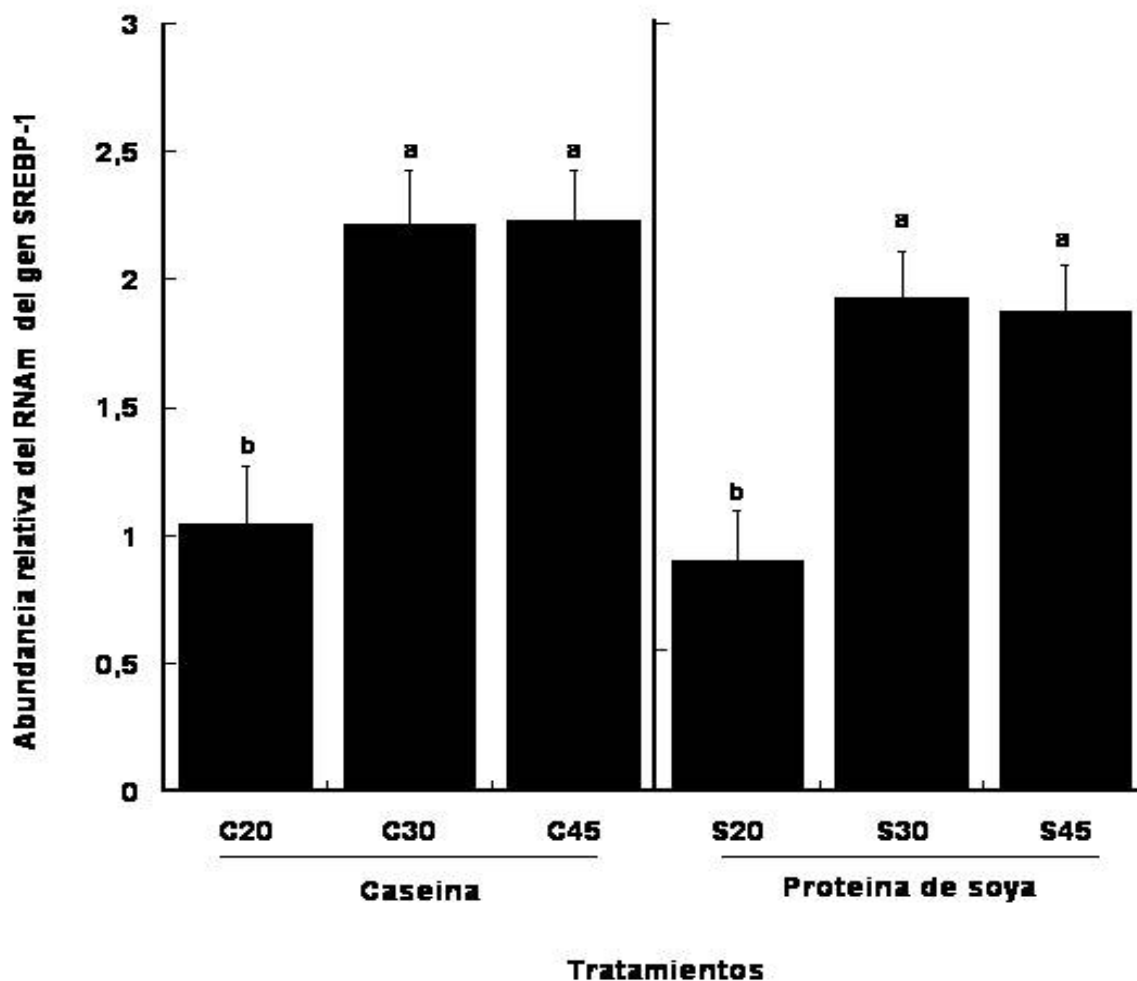
Para evaluar la expresión génica relativa, se utilizó la técnica de análisis de PCR en tiempo real por el método competitivo de ciclo al corte ( $C_T$  por sus siglas en inglés). Se utilizó al grupo de ratas Zucker <sup>fa/fa</sup> alimentadas con 20% de proteína de caseína como grupo control, contra el cual fue evaluada la expresión génica del resto de los tratamientos dietarios. Por metodología se asigna un valor de 1.0 ( $\pm 0.05$ ) a la expresión génica del grupo control.

En las Tablas A.I.7 a A.I.17 se muestran los cálculos..

La expresión génica relativa de cada tratamiento dietario se expresó como el promedio  $\pm$  *SEM* (error estándar de la media, por sus siglas en inglés). Los datos fueron analizados por análisis de varianza, ANOVA, la significancia fue evaluada por medio de una prueba de *t student*, para determinar si existe o no diferencia estadísticamente significativa entre grupos. La significancia estadística se acepta a un nivel de  $p < 0.05$ . Los resultados fueron graficados y se muestran a continuación.

### 6.4.1 SREBP-1

El factor de transcripción SREBP-1 activa los genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos, siendo su principal gen blanco la sintasa de ácidos grasos (FAS).



Gráfica 6.1 Expresión relativa del ARNm del gen SREBP-1/Ciclofilina

Con respecto al grupo alimentado con el tratamiento dietario de caseína al 20% (C20), considerado como el grupo control, se puede observar diferencia estadísticamente significativa en los grupos de animales que fueron alimentados con caseína al 30 y 45% (C30 y C45) y en los grupos de animales que fueron alimentados con proteína de soya al 30 y 45% (S30 y S45), los cuales presentan

una expresión génica del factor de transcripción SREBP-1 mucho mas alta que la del grupo control, especialmente en el caso de los grupos que fueron alimentados con caseína, donde la expresión génica del factor de transcripción SREBP-1 en tejido renal aumenta casi al doble.

El único grupo de animales donde no se observa diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control, es en el grupo de animales alimentados con proteína de soya al 20% (S20). Ambos presentan una expresión génica del factor de transcripción SREBP-1 en tejido renal similar.

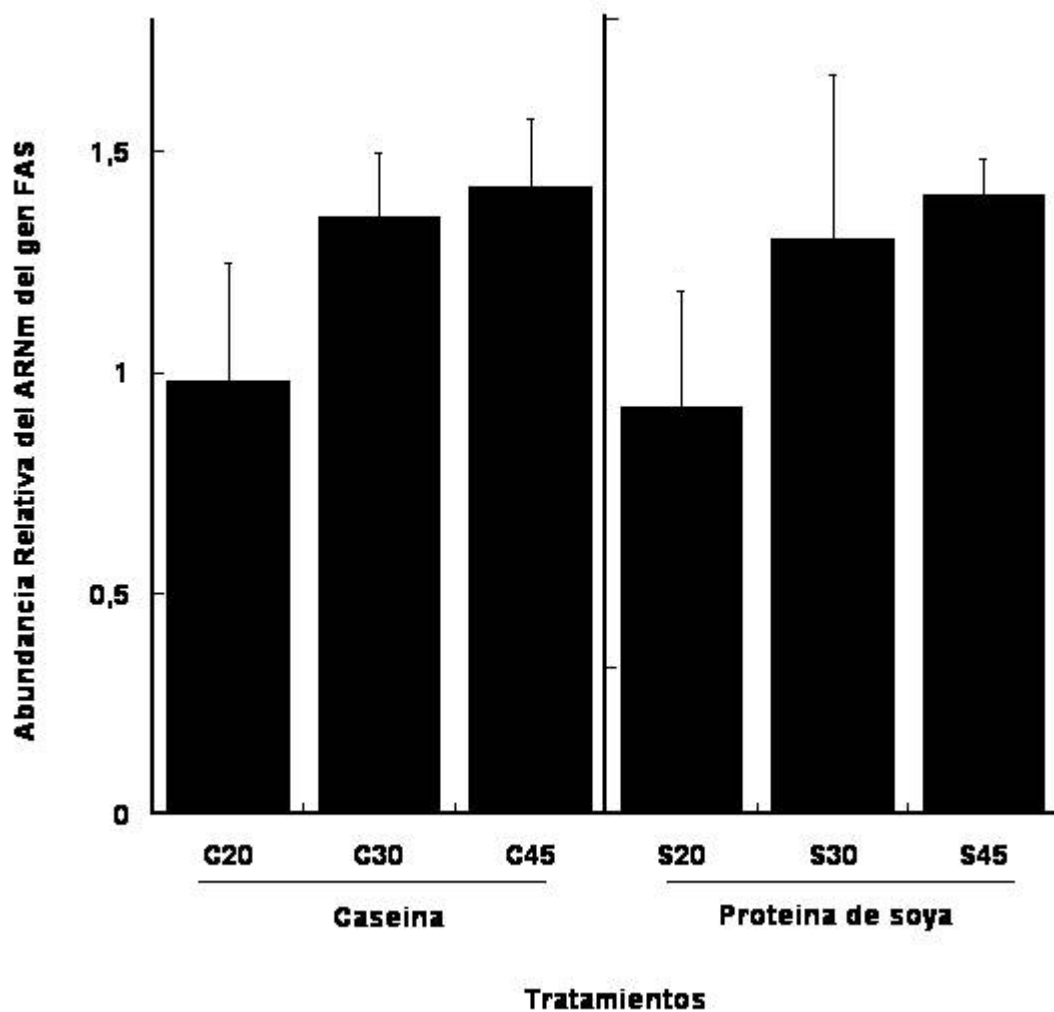
Al comparar los grupos de animales que fueron alimentados con los diferentes tipos de proteína a las mismas concentraciones (C20-S20, C30-S30 y C45-S45) no se observa diferencia estadísticamente significativa entre ellos, sin embargo, se observa la tendencia de que la expresión génica del factor de transcripción SREBP-1 en tejido renal en los grupos que fueron alimentados con proteína de soya son siempre menores que los de los grupos que fueron alimentados con caseína.

Si comparamos los grupos de animales que fueron alimentados con el mismo tipo de proteína (C20-C30-C45 y S20-S30-S45), se observa que la expresión génica del factor de transcripción SREBP-1 en tejido renal aumenta al incrementarse la concentración de proteína en la dieta. Este aumento se observa independientemente del tipo de proteína presente en los tratamientos dietarios administrados .

En base a los resultados obtenidos y que se muestran en la gráfica 6.1, se puede decir que, la expresión del factor de transcripción SREBP-1 en tejido renal, encargado de la síntesis de ácidos grasos, se aumenta en tejido renal al incrementar la concentración de proteína en la dieta, sin embargo este aumento se da en menor proporción al tratarse de proteína de soya, sin alcanzar la diferencia estadística.

### 6.4.2 FAS

La sintasa de ácidos grasos (FAS) cataliza la reacción de malonil CoA a ácidos grasos en la ruta metabólica de la síntesis de ácidos grasos. Su metabolismo y homeóstasis es regulada transcripcionalmente por el factor de transcripción SREBP-1, por lo tanto, se le considera gen blanco de este.



**Gráfica 6.2 Expresión relativa del ARNm del gen FAS/Ciclofilina**

Con respecto al grupo alimentado con el tratamiento dietario de caseína al 20% (C20), considerado como el grupo control, se puede observar que no hay diferencia estadísticamente significativa en la expresión génica de FAS en tejido renal con ninguno de los tratamientos dietarios (C30, C45, S20, S30 y S45).

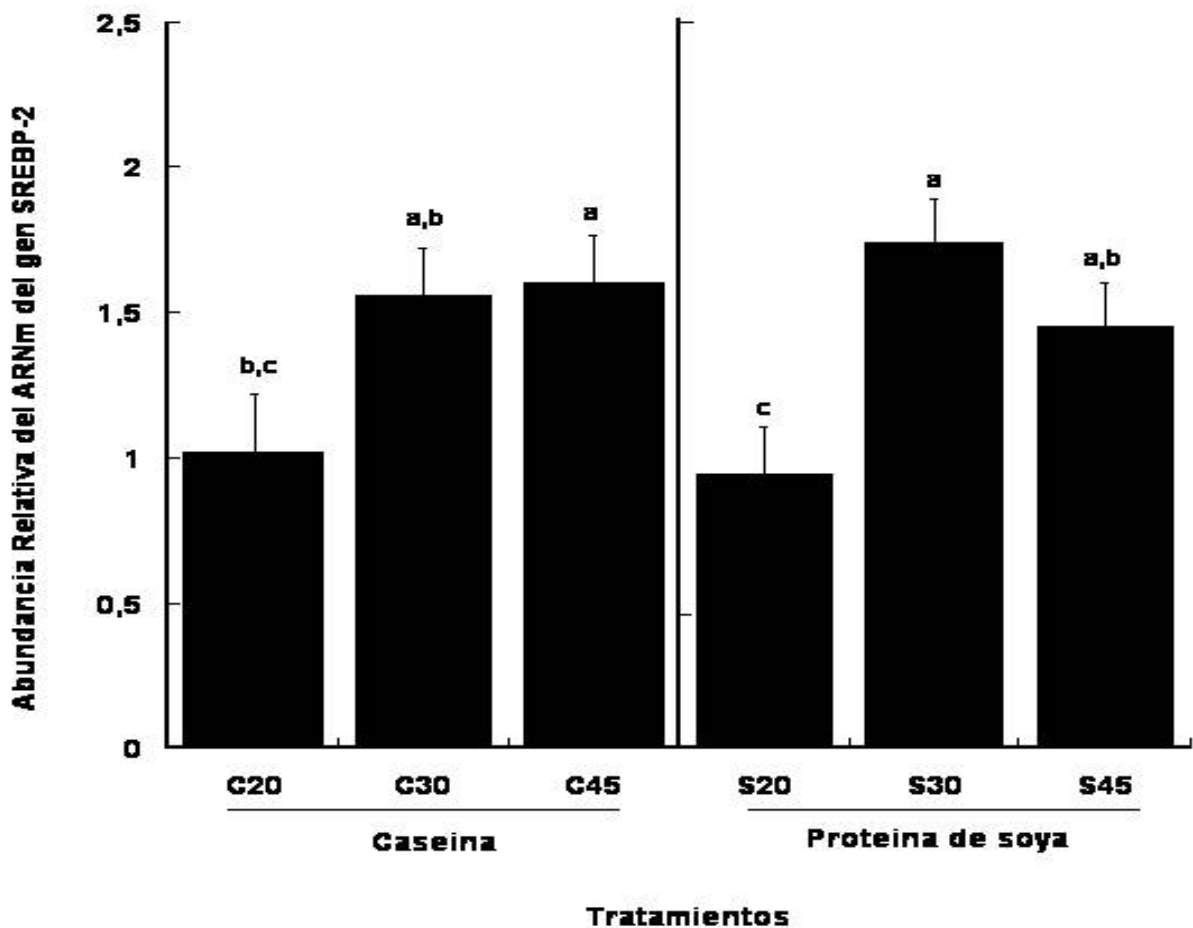
Al comparar los grupos de animales que fueron alimentados con los diferentes tipos de proteína a las mismas concentraciones (C20-S20, C30-S30 y C45-S45) no se observa diferencia estadísticamente significativa entre ellos. La de expresión génica de FAS en tejido renal es similar.

Si comparamos los grupos de animales que fueron alimentados con el mismo tipo de proteína (C20-C30-C45 y S20-S30-S45), se observa que la expresión génica de FAS en tejido renal aumenta al incrementarse la concentración de proteína en la dieta. Este aumento se observa independientemente del tipo de proteína presente en los tratamientos dietarios administrados .

En base a los resultados obtenidos en la gráfica 6.2, se puede decir que, la expresión génica de FAS en tejido renal, encargado de la síntesis de ácidos grasos, se incrementa al aumentar la concentración de proteína en la dieta, sin embargo, este aumento se da en menor proporción al tratarse de proteína de soya, sin alcanzar la diferencia estadística.

### 6.4.3 SREBP-2

El factor de transcripción SREBP-2 está involucrado en la síntesis de colesterol, por lo que uno de sus principales genes blanco es la enzima HMG-CoA reductasa.



**Gráfica 6.3** Expresión relativa del ARNm del gen SREBP-2/Ciclofilina

Con respecto al grupo alimentado con el tratamiento dietario de caseína al 20% (C20), considerado como el grupo control, se puede observar diferencia estadísticamente significativa en el grupo de animales alimentados con caseína al 45% (C45) y en el grupo de animales alimentados con proteína de soya al 30% (S30), los cuales presentan una expresión génica del factor de transcripción SREBP-2 en tejido renal más alta que la del grupo control.



Los grupos donde no se observa diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control son el grupo de animales alimentados con caseína al 30% (C30) y los grupos de animales alimentados con proteína de soya al 20 y 45% (S20 y S45), sin embargo, se observa una expresión génica del factor de transcripción SREBP-2 en tejido renal mayor a la del grupo control.

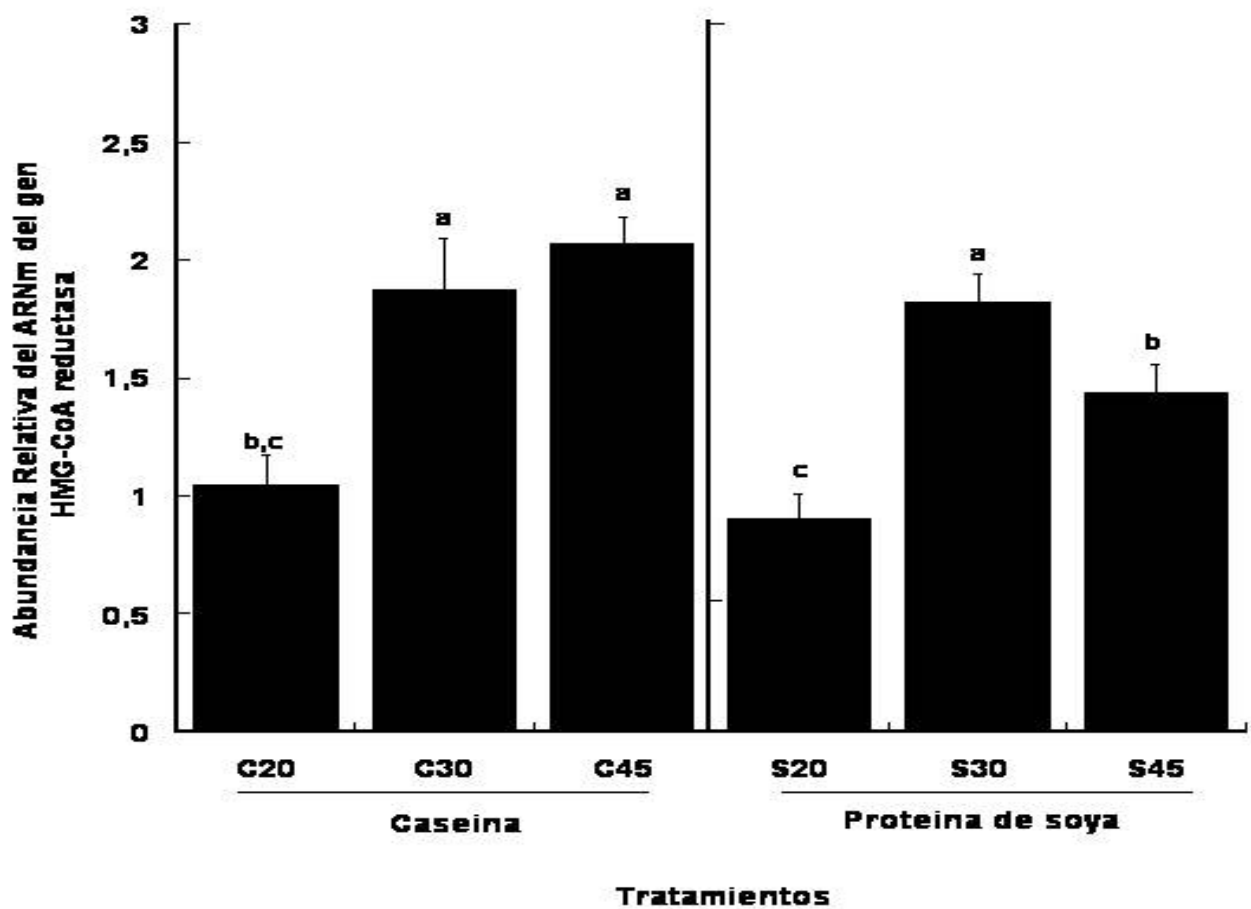
Al comparar los grupos de animales que fueron alimentados con los diferentes tipos de proteína a las mismas concentraciones (C20-S20, C30-S30 y C45-S45) no se observa diferencia estadísticamente significativa entre ellos, sin embargo, se observa la tendencia de que la expresión génica del factor de transcripción SREBP-2 en tejido renal en los grupos de animales que fueron alimentados con proteína de soya son menores que los de los grupos de animales que fueron alimentados con caseína.

Si comparamos los grupos de animales que fueron alimentados con caseína (C20-C30-C45) se observa que la expresión génica del factor de transcripción SREBP-2 en tejido renal aumenta al incrementarse la concentración de proteína en la dieta. En los grupos de animales que fueron alimentados con proteína de soya (S20-S30-S45), se observa un aumento en la expresión génica del factor de transcripción SREBP-2 en tejido renal al incrementarse la concentración de proteína en la dieta de 20 a 30% y posteriormente disminuye cuando se administra una dieta con concentración de proteína de soya de 45%, sin embargo, no se observa diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo S30.

En base a los resultados obtenidos y que se muestran en la gráfica 6.3, se puede decir que, la expresión del factor de transcripción SREBP-2 en tejido renal, encargado de la síntesis de colesterol, se incrementa al aumentar la concentración de proteína en la dieta.

#### 6.4.4 HMG-CoA REDUCTASA

La enzima HMG-CoA reductasa cataliza la reacción de HMG-CoA (hidroxi-metil-glutaril coenzima A), a mevalonato. Esta enzima es limitante en la ruta metabólica de la síntesis del colesterol. Su transcripción está regulada por el factor de transcripción SREBP-2, por lo que se le considera un gen blanco de este.



Gráfica 6.4 Expresión relativa del ARNm del gen HMG-CoA reductasa/Ciclofilina

Con respecto al grupo alimentado con el tratamiento dietario de caseína al 20% (C20), considerado como el grupo control, se puede observar diferencia

estadísticamente significativa en los grupos de animales alimentados con caseína al 30 y 45% y en el grupo de animales alimentados con soya al 30% (S30), los cuales presentan una expresión génica de HMG-CoA reductasa en tejido renal mucho más alta que la del grupo control, especialmente en el caso de los grupos que fueron alimentados con caseína, donde la expresión génica de HMG-CoA reductasa en tejido renal aumenta casi al doble.

Los grupos donde no se observa diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control, son los grupos de animales alimentados con proteína de soya al 20 y 45% (S20 y S45). En el grupo de animales alimentados con proteína de soya al 45%, se observa un valor de expresión génica de HMG-CoA reductasa en tejido renal mayor respecto al control.

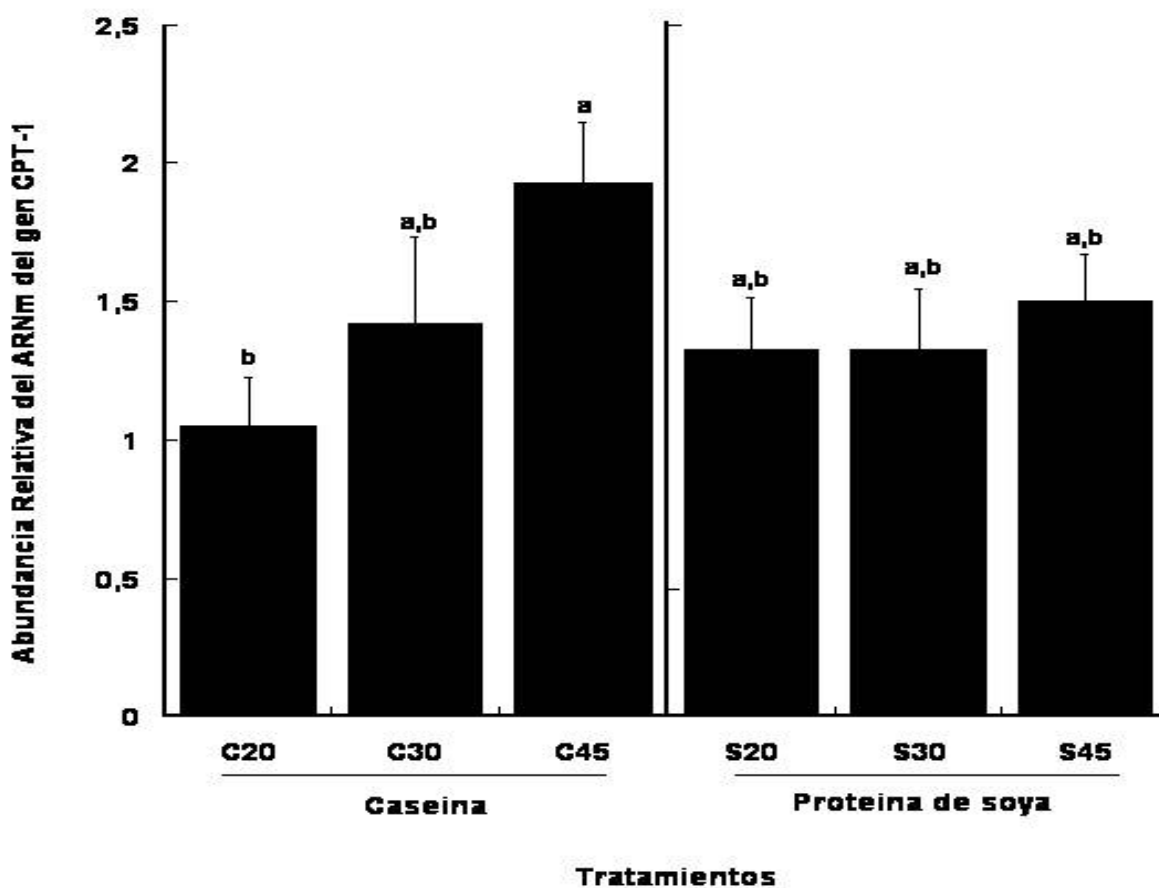
Al comparar los grupos de animales que fueron alimentados con los diferentes tipos de proteína a las mismas concentraciones (C20-S20, C30-S30 y C45-S45) no se observa diferencia estadísticamente significativa entre ellos, excepto en los grupos de animales alimentados con la concentración mas alta de proteína (45%), observándose una expresión génica de HMG-CoA reductasa en tejido renal más alta en el grupo de animales alimentados con caseína. En todos los grupos se observa la tendencia de que la expresión génica de HMG-CoA reductasa en tejido renal en los grupos de animales que fueron alimentados con proteína de soya son siempre menores que los de los grupos de animales que fueron alimentados con caseína.

Si comparamos los grupos de animales que fueron alimentados con caseína (C20-C30-C45) se observa que la expresión génica de HMG-CoA reductasa en tejido renal aumenta al incrementarse la concentración de proteína en la dieta. En los grupos de animales que fueron alimentados con proteína de soya (S20-S30-S45), se observa un aumento en la expresión génica de HMG-CoA reductasa en tejido renal al incrementarse la concentración de proteína en la dieta de 20 a 30% y posteriormente disminuye cuando se administra una dieta con concentración de proteína de soya de 45%, observándose diferencia estadística.

En base a los resultados obtenidos y que se muestran en la gráfica 6.4 , se puede decir que, la expresión del gen HMG-CoA reductasa en tejido renal, encargado de la síntesis de colesterol, se incrementa al aumentar la concentración de proteína en la dieta.

#### 6.4.5 CPT-1

La oxidación de los ácidos grasos ocurre en la mitocondria . El transporte de la molécula de acil CoA grasa al interior de la mitocondria se logra vía un intermediario de acil-carnitina, el que es generado por acción de la carnitina aciltransferasa I (CPT-1).



Gráfica 6.5 Expresión relativa del ARNm del gen CPT-1/Ciclofilina

Con respecto al grupo alimentado con el tratamiento dietario de caseína al 20% (C20), considerado como el grupo control, se puede observar diferencia estadísticamente significativa con el grupo de animales que fueron alimentados con caseína al 45% (C45) el cual presenta una expresión génica de CPT-1 en tejido renal mucho más alta que la del grupo control. La expresión génica de CPT-1 en tejido renal aumenta casi al doble.

Los grupos de animales donde no se observa diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control, son el grupo de animales alimentados con caseína al 30% (C30) y los grupos de animales alimentados con proteína de soya al 20, 30 y 45% (S20, S30 y S45). Todos presentan una expresión génica de CPT-1 en tejido renal mayor a la del grupo control, sin embargo, no se alcanza la diferencia estadística.

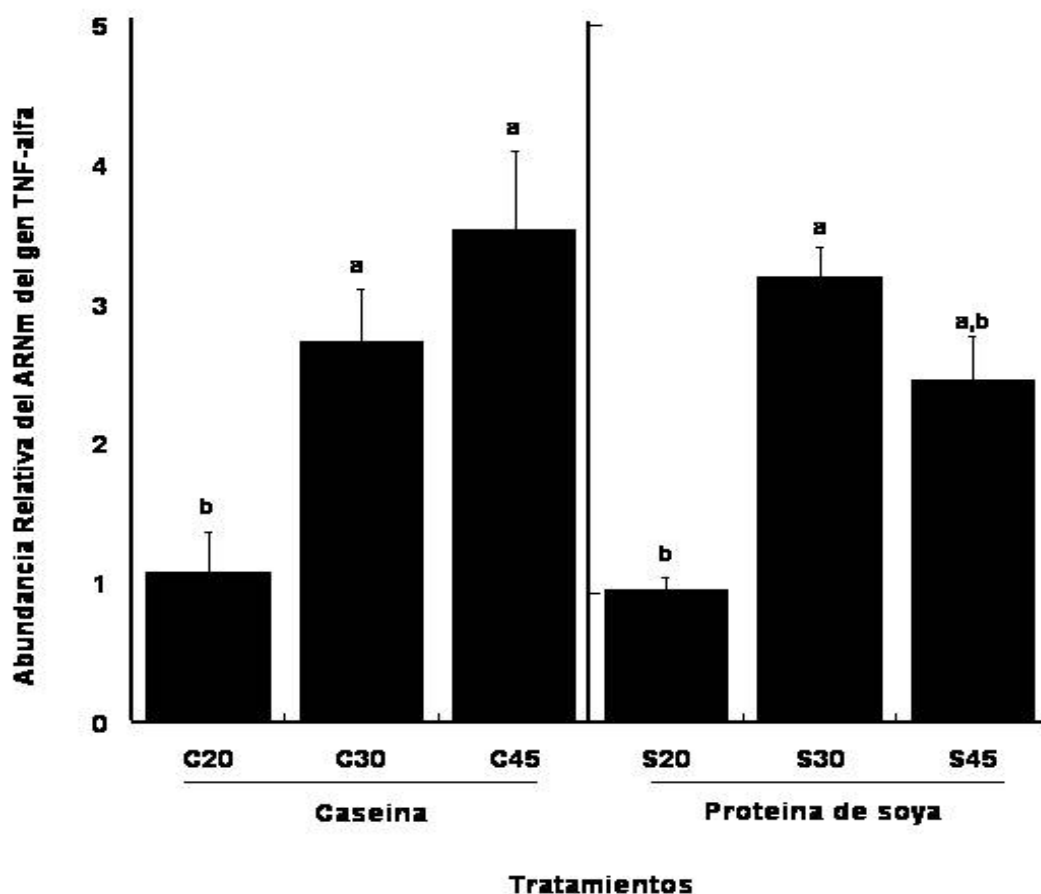
Al comparar los grupos de animales que fueron alimentados con los diferentes tipos de proteína a las mismas concentraciones (C20-S20, C30-S30 y C45-S45) no se observa diferencia estadísticamente significativa entre ellos.

Si comparamos los grupos de animales que fueron alimentados con el mismo tipo de proteína (C20-C30-C45 y S20-S30-S45), se observa que la expresión génica de CPT-1 en tejido renal aumenta al incrementarse la concentración de proteína en la dieta. Este aumento se observa independientemente del tipo de proteína presente en los tratamientos dietarios administrados.

En base a los resultados obtenidos y que se muestran en la gráfica 6.5, se puede decir que, la expresión de CPT-1 en tejido renal, encargado de la oxidación mitocondrial de ácidos grasos, se incrementa al aumentar la concentración de proteína en la dieta, sin embargo este aumento se da en menor proporción al tratarse de proteína de soya, sin alcanzar la diferencia estadística.

#### 6.4.6 TNF- $\alpha$

TNF- $\alpha$  es una citocina producida por el sistema inmune, su liberación conduce al reclutamiento de células inflamatorias e inmunoglobulinas. La presencia de esta citocina proinflamatoria en el riñón, aumenta la resistencia a la insulina.



Gráfica 6.6 Expresión relativa del ARNm del gen TNF- $\alpha$  /Ciclofilina

Con respecto al grupo alimentado con el tratamiento dietario de caseína al 20% (C20), considerado como el grupo control, se puede observar diferencia estadísticamente significativa en los grupos de animales que fueron alimentados con caseína al 30 y 45% (C30 y C45) y en el grupo de animales que fueron alimentados con proteína de soya al 30% (S30), los cuales presentan una expresión génica de TNF- $\alpha$  en tejido renal mucho más alta que la del grupo

control, especialmente en el caso de los grupos que fueron alimentados con caseína, donde la expresión génica de TNF- $\alpha$  en tejido renal aumenta

Los grupos de animales donde no se observa diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control, son los grupos de animales alimentados con proteína de soya al 20 y 45% (S20 y S45). El grupo de animales alimentados con proteína de soya al 20% presenta una expresión génica de TNF- $\alpha$  en tejido renal similar a la del grupo control. El grupo de animales alimentados con proteína de soya al 45% presenta una expresión génica de TNF- $\alpha$  en tejido renal mayor respecto al grupo control.

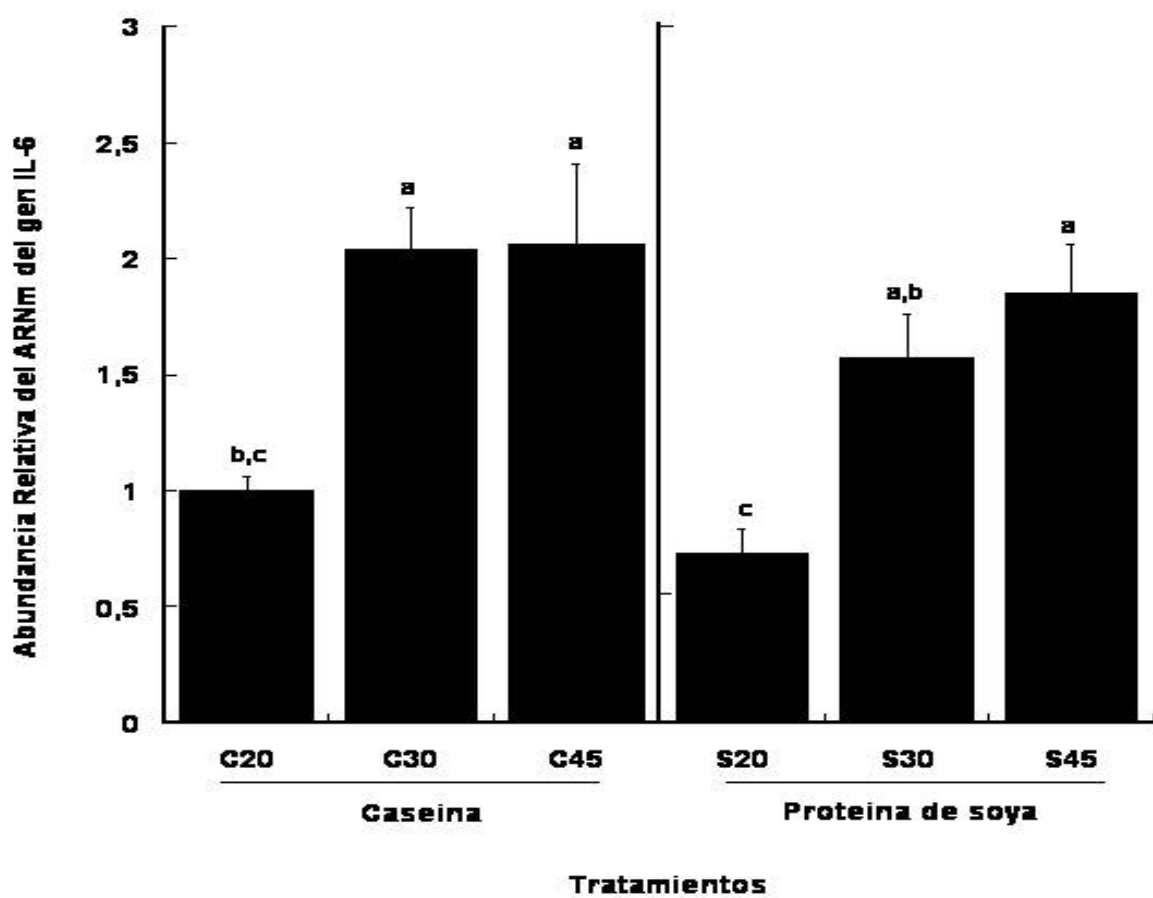
Al comparar los grupos de animales que fueron alimentados con los diferentes tipos de proteína a las mismas concentraciones (C20-S20, C30-S30 y C45-S45) no se observa diferencia estadísticamente significativa entre ellos, sin embargo, se observa la tendencia de que la expresión génica de TNF- $\alpha$  en tejido renal en los grupos que fueron alimentados con proteína de soya son siempre menores que los de los grupos que fueron alimentados con caseína.

Si comparamos los grupos de animales que fueron alimentados con el mismo tipo de proteína (C20-C30-C45 y S20-S30-S45), se observa que la expresión génica de TNF- $\alpha$  en tejido renal aumenta al incrementarse la concentración de proteína en la dieta. Este aumento se observa independientemente del tipo de proteína presente en los tratamientos dietarios administrados .

En base a los resultados obtenidos y que se muestran en la gráfica 6.6, se puede decir que, la expresión génica de TNF- $\alpha$  en tejido renal, involucrado en el proceso de inflamación, incrementa al aumentar la concentración de proteína en la dieta. Este aumento se da en menor proporción al tratarse de proteína de soya.

### 6.4.7 INTERLEUCINA 6

La interleucina-6 es una citocina con actividad proinflamatoria, es un mediador de la respuesta inmune en fase aguda ya que estimula la síntesis de fibrinógeno. En el riñón esta interleucina actúa como factor de crecimiento para las células mesangiales.



Gráfica 6.7 Expresión relativa del ARNm del gen IL-6 /Ciclofilina



Con respecto al grupo alimentado con el tratamiento dietario de caseína al 20% (C20), considerado como el grupo control, se puede observar diferencia estadísticamente significativa en los grupos de animales que fueron alimentados con caseína al 30 y 45% (C30 y C45) y en el grupo de animales que fueron alimentados con proteína de soya al 45% (S45), los cuales presentan una expresión génica de IL-6 mucho más alta que la del grupo control, especialmente en el caso de los grupos que fueron alimentados con caseína, donde la expresión génica de IL-6 en tejido renal aumenta casi al doble.

Los grupos de animales donde no se observa diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control, son los grupos de animales alimentados con proteína de soya al 20 y 30% (S20 y S30).

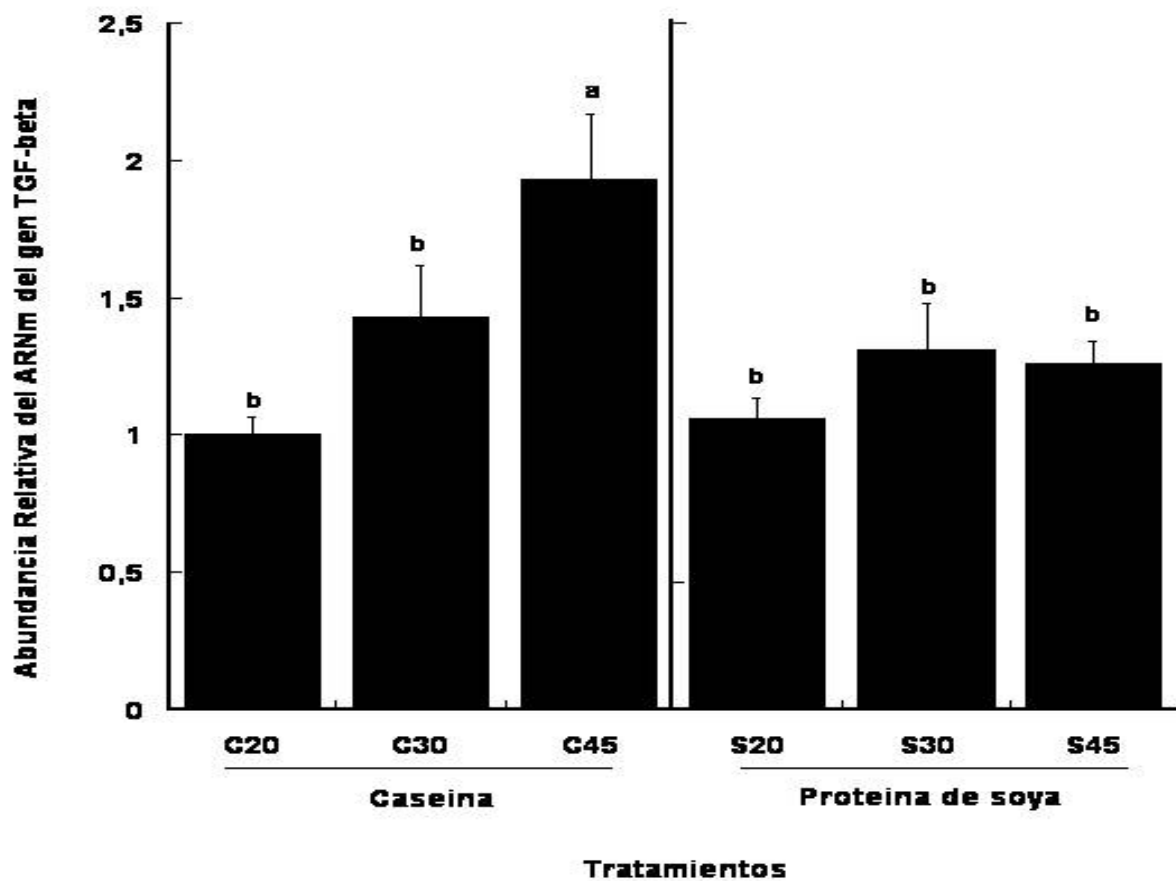
Al comparar los grupos de animales que fueron alimentados con los diferentes tipos de proteína a las mismas concentraciones (C20-S20, C30-S30 y C45-S45) no se observa diferencia estadísticamente significativa entre ellos, sin embargo, se observa la tendencia de que la expresión génica de IL-6 en tejido renal en los grupos que fueron alimentados con proteína de soya son siempre menores que los de los grupos que fueron alimentados con caseína.

Si comparamos los grupos de animales que fueron alimentados con el mismo tipo de proteína (C20-C30-C45 y S20-S30-S45), se observa que la expresión génica de IL-6 en tejido renal aumenta al incrementarse la concentración de proteína en la dieta. Este aumento se observa independientemente del tipo de proteína presente en los tratamientos dietarios administrados.

En base a los resultados obtenidos y que se muestran en la gráfica 6.7, se puede decir que, la expresión de IL-6 en tejido renal, involucrado en el proceso inflamatorio, se incrementa al aumentar la concentración de proteína en la dieta, sin embargo este aumento se da en menor proporción al tratarse de proteína de soya.

### 6.4.8 TGF- $\beta$

El factor de transformación tumoral beta, es una citocina que regula la respuesta inflamatoria, la cicatrización y la respuesta inmunológica.



Gráfica 6.8 Expresión relativa del ARNm del gen TGF- $\beta$  /Ciclofilina

Con respecto al grupo alimentado con el tratamiento dietario de caseína al 20% (C20), considerado como el grupo control, se puede observar diferencia estadísticamente significativa únicamente en el grupo de animales que fueron alimentados con caseína al 45% (C45), el cual presenta una expresión génica de TGF- $\beta$  en tejido renal mucho más alta que la del grupo control. La expresión génica de TGF- $\beta$  en tejido renal aumenta casi al doble.

Los grupos de animales donde no se observa diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control, es el grupo de animales alimentados con caseína al 45% (C45) los grupos de animales alimentados con proteína de soya al 20, 30 y 45% (S20, S30 y S45).

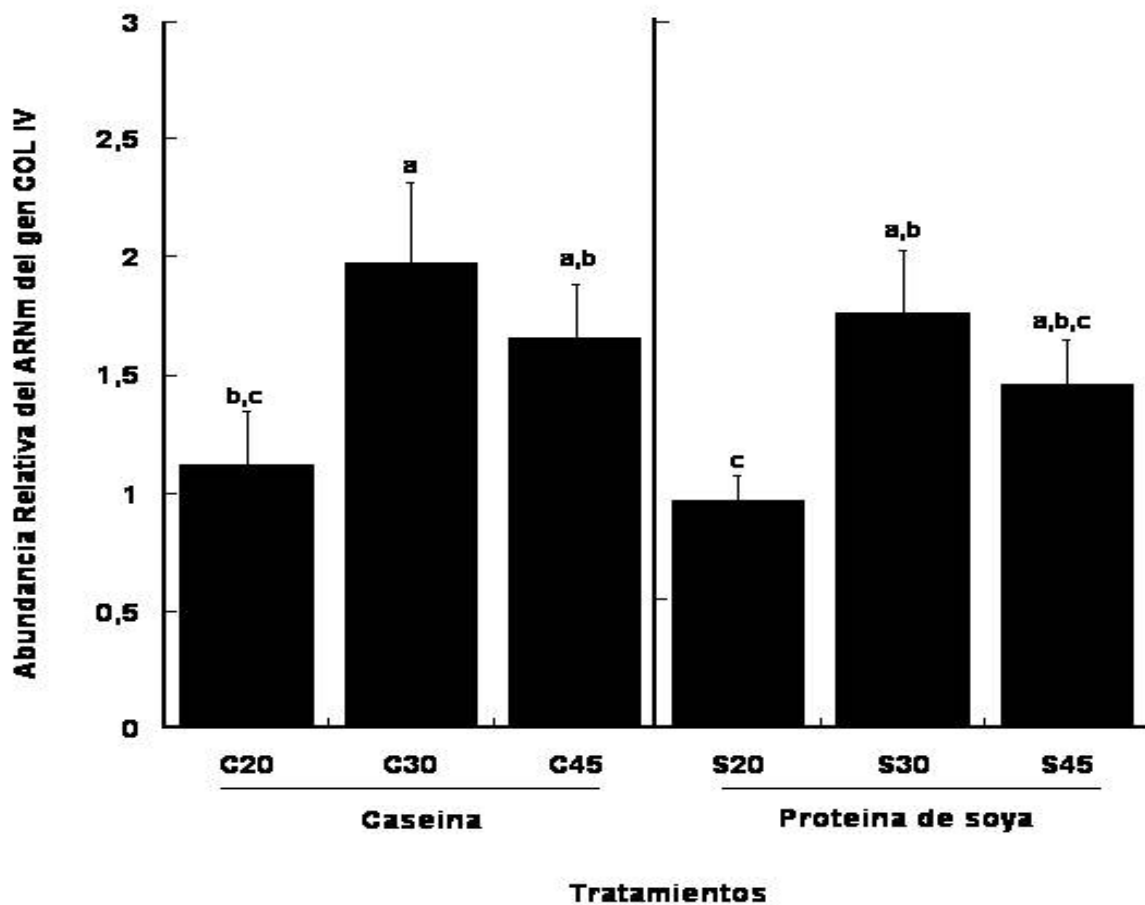
Al comparar los grupos de animales que fueron alimentados con los diferentes tipos de proteína a las mismas concentraciones (C20-S20, C30-S30 y C45-S45) no se observa diferencia estadísticamente significativa entre ellos, excepto en los grupos de animales alimentados con concentraciones de proteína al 45%. Se observa la tendencia de que la expresión génica de TGF- $\beta$  en tejido renal en los grupos que fueron alimentados con proteína de soya son siempre menores que los de los grupos que fueron alimentados con caseína.

Si comparamos los grupos de animales que fueron alimentados con caseína (C20-C30-C45), se observa que la expresión génica de TGF- $\beta$  en tejido renal aumenta al incrementarse la concentración de proteína en la dieta. En el caso de los grupos de animales alimentados con proteína de soya (S20-S30-S45), no se observa diferencia estadísticamente significativa y la expresión génica de TGF- $\beta$  es similar.

En base a los resultados obtenidos y que se muestran en la gráfica 6.8, se puede decir que, la expresión de TGF- $\beta$  en tejido renal, involucrado en el proceso inflamatorio, se aumenta al incrementar la concentración de proteína en la dieta, únicamente cuando esta es de origen animal.

### 6.4.9 COLÁGENA TIPO IV

La colágena tipo IV, es una proteína localizada específicamente en las membranas basales. Su principal función es la de sostén y filtración. Cuando se encuentra en exceso puede conducir al desarrollo de fibrosis.



Gráfica 6.9 Expresión relativa del ARNm del gen Colágena Tipo IV/Ciclofilina

Con respecto al grupo alimentado con el tratamiento dietario de caseína al 20% (C20), considerado como el grupo control, se puede observar diferencia estadísticamente significativa en el grupo de animales que fueron alimentados con caseína al 30 (C30) el cual presenta una expresión génica de colágena tipo IV en tejido renal mucho más alta que la del grupo control. La expresión génica de colágena tipo IV en tejido renal aumenta casi al doble.

Los grupos de animales donde no se observa diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control, es en el grupo de animales alimentados con caseína al 45% (C25) y los grupos de animales que fueron alimentados con proteína de soya al 20, 30 y 45% (S20, S30 y S45) .

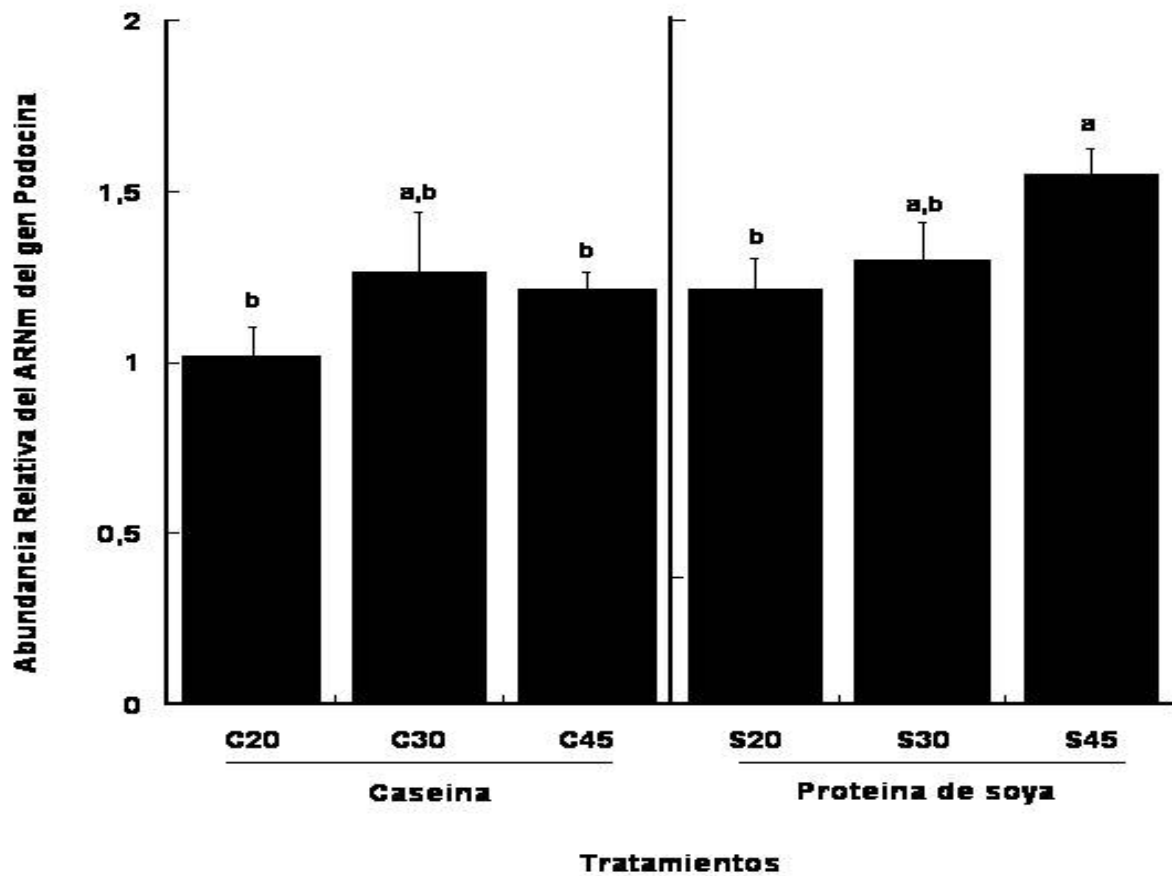
Al comparar los grupos de animales que fueron alimentados con los diferentes tipos de proteína a las mismas concentraciones (C20-S20, C30-S30 y C45-S45) no se observa diferencia estadísticamente significativa entre ellos y presentan una expresión génica de colágena tipo IV en tejido renal similar.

Si comparamos los grupos de animales que fueron alimentados con el mismo tipo de proteína (C20-C30-C45 y S20-S30-S45), se observa que la expresión génica de colágena tipo IV en tejido renal aumenta al incrementarse la concentración de proteína en la dieta. Este aumento se observa independientemente del tipo de proteína presente en los tratamientos dietarios administrados .

En base a los resultados obtenidos y que se muestran en la gráfica 6.9, se puede decir que, la expresión de colágena tipo IV en tejido renal, involucrado en el proceso de fibrosis, se incrementa al aumentar la concentración de proteína en la dieta, sin alcanzar la diferencia estadística.

#### 6.4.10 PODOCINA

La podocina es una proteína forma parte estructural de los podocitos, se encuentra en la hendidura diafragmática y tiene un papel importante en la barrera de filtración glomerular.



Gráfica 6.10 Expresión relativa del ARNm del gen Podocina/Ciclofilina

Con respecto al grupo alimentado con el tratamiento dietario de caseína al 20% (C20), considerado como el grupo control, se puede observar diferencia estadísticamente significativa en el grupo de animales que fueron alimentados proteína de soya al 45% (S45) el cual presentan una expresión génica de la proteína podocina en tejido renal más alta que la del grupo control.

Los grupos de animales donde no se observa diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control, son los grupos de animales alimentados con caseína al 30 y 45% (C30 y C45) y los grupos de animales alimentados con proteína de soya al 20 y 30% (S20 y S30). Todos presentan una expresión génica de la proteína podocina en tejido renal similar a la del grupo control.

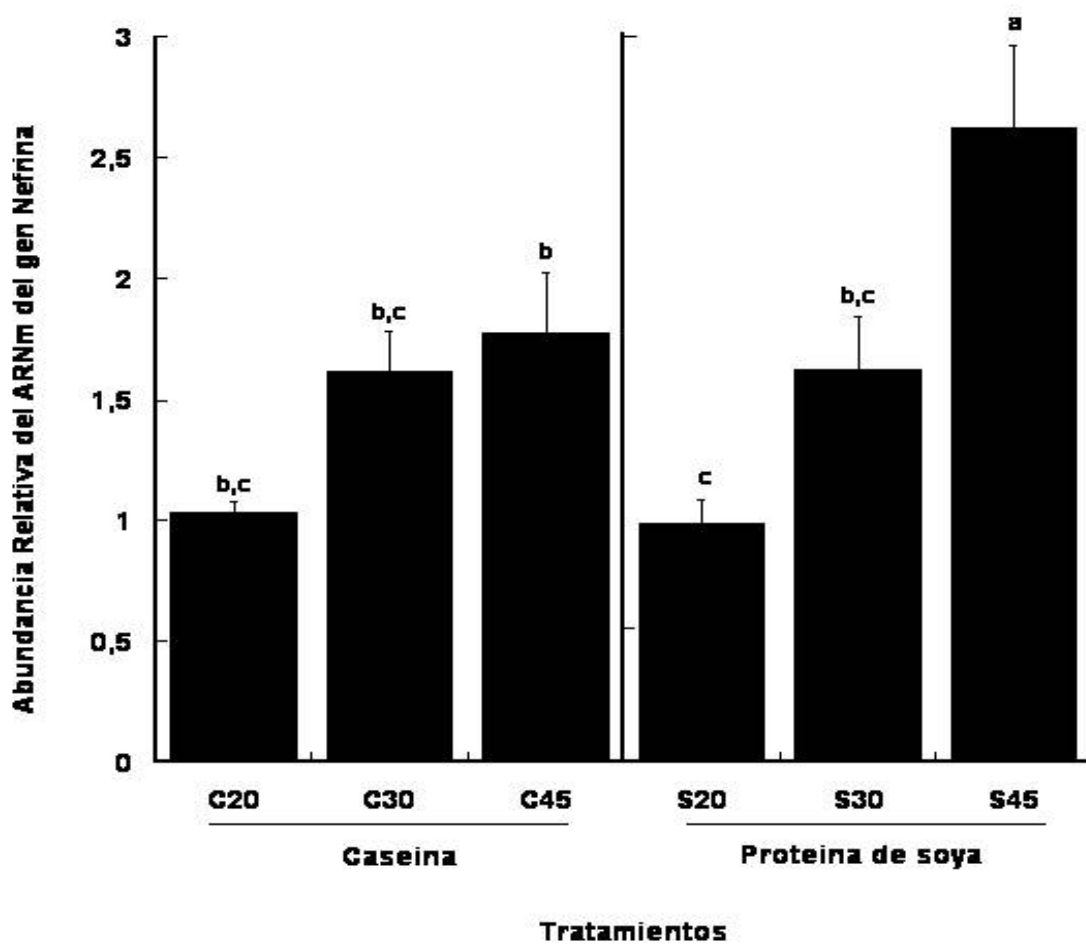
Al comparar los grupos de animales que fueron alimentados con los diferentes tipos de proteína a las mismas concentraciones (C20-S20, C30-S30 y C45-S45) no se observa diferencia estadísticamente significativa entre ellos, excepto en los grupos de animales alimentados con concentraciones de proteína al 45%.

Si comparamos los grupos de animales que fueron alimentados con el mismo tipo de proteína (C20-C30-C45 y S20-S30-S45), únicamente se observa un cambio significativo en la expresión génica de la proteína podocina en tejido renal

En base a los resultados obtenidos y que se muestran en la gráfica 6.10, se puede decir que, la expresión de la proteína podocina en tejido renal, involucrado en la filtración glomerular, se incrementa únicamente cuando se administra una dieta de proteína de soya al 45%

### 6.4.11 NEFRINA

La proteína Nefrina forma parte estructural de los podocitos que rodean el epitelio de los capilares de los glomérulos. Tiene un papel fundamental en la barrera de filtración del riñón y participa en la transducción de señales intracelulares importantes para la funcionalidad y supervivencia del podocito.



Gráfica 6.11 Expresión relativa del ARNm del gen Nefrina/Ciclofilina



Con respecto al grupo alimentado con el tratamiento dietario de caseína al 20% (C20), considerado como el grupo control, se puede observar diferencia estadísticamente significativa en el grupo de animales que fueron alimentados con proteína de soya al 45% (S45), el cual presenta una expresión génica de la proteína nefrina en tejido renal mucho más alta que la del grupo control. La expresión génica de la proteína nefrina en tejido renal aumenta más del doble.

Los grupos de animales donde no se observa diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control, es en el grupo de animales alimentados con caseína al 30 y 45% (C30 y C45) y los grupos de animales alimentados con proteína de soya al 20 y 30% (S20 y S30).

Al comparar los grupos de animales que fueron alimentados con los diferentes tipos de proteína a las mismas concentraciones (C20-S20, C30-S30 y C45-S45) no se observa diferencia estadísticamente significativa entre ellos, excepto en los grupos de animales alimentados con concentraciones de proteína del 45%. Se observa la tendencia de que la expresión génica de la proteína nefrina en tejido renal en los grupos que fueron alimentados con proteína de soya son siempre mayores que los de los grupos que fueron alimentados con caseína.

Si comparamos los grupos de animales que fueron alimentados con caseína el mismo tipo de proteína (C20-C30-C45) la expresión génica de la proteína nefrina en tejido renal incrementa al aumentar la concentración de proteína, sin alcanzar la significancia estadística. En los grupos de animales alimentados con proteína de soya (S20-S30-S45), se observa que la expresión génica de la proteína nefrina en tejido renal aumenta al incrementarse la concentración de proteína en la dieta y este aumento es estadísticamente significativo.

En base a los resultados obtenidos y que se muestran en la gráfica 6.11, se puede decir que, la expresión de la proteína nefrina en tejido renal, involucrado en la filtración glomerular, se incrementa al aumentar la concentración de proteína en la dieta, sin embargo este aumento se da en mayor proporción al tratarse de proteína de soya.

## 6.5 LÍPIDOS RENALES

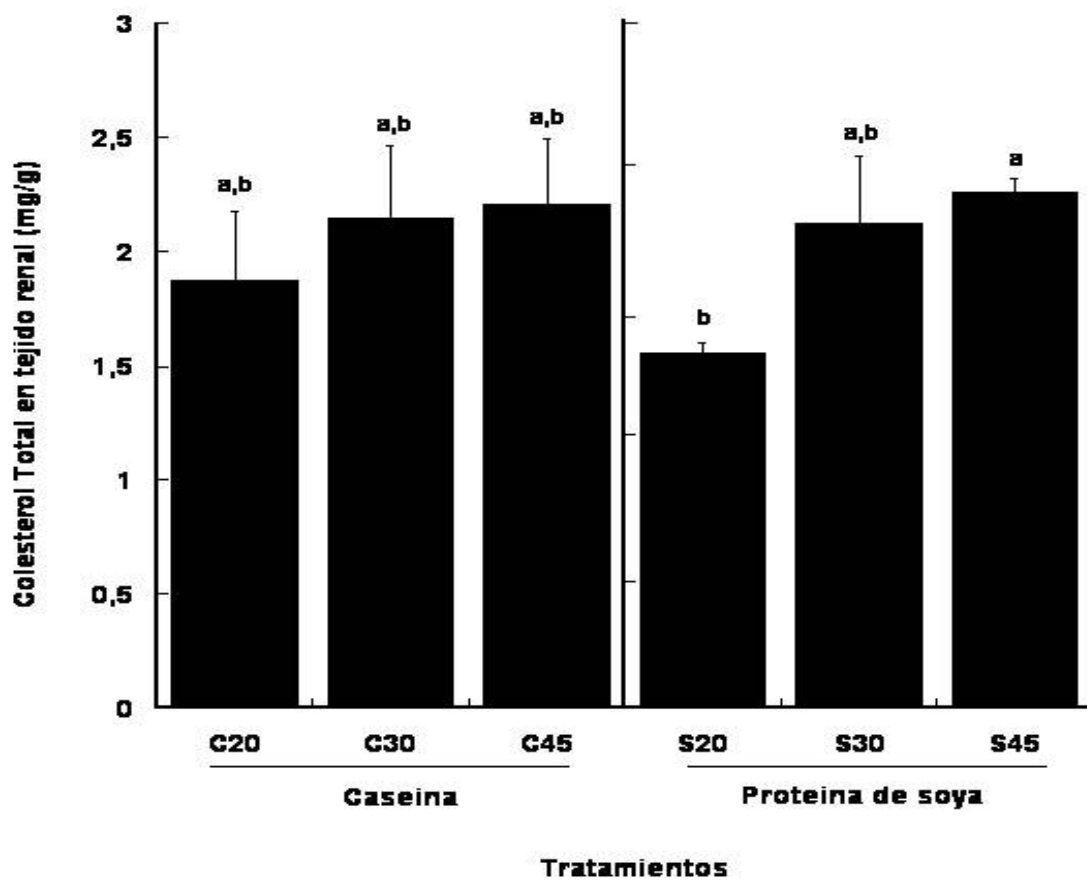
Con el objetivo de evaluar el efecto de la concentración y tipo de proteína dietaria sobre el metabolismo intrarrenal y sistémico de lípidos en un modelo de obesidad genético como es la rata Zucker <sup>fa/fa</sup>, se llevó a cabo la determinación de lípidos renales.

La extracción de lípidos renales se llevo a cabo por el método de Folch, utilizando los kit COLESTEROL FS\* (\*Fluid Stable = líquido estable) y Triglicéridos FS\* (\*Fluid Stable = líquido estable). Se calcularon los valores de colesterol y triglicéridos totales en tejido renal.

En las Tabla A.I.18 y A.I.19, se muestran los cálculos.

Los datos obtenidos fueron analizados por análisis de varianza, ANOVA, así como por la prueba de *t student*, para determinar si existe o no diferencia estadísticamente significativa entre grupos. La significancia estadística se acepta a un nivel de  $p < 0.05$ . Los resultados graficados se muestran a continuación:

### 6.5.1 COLESTEROL TOTAL EN TEJIDO RENAL



Gráfica 6.12 Colesterol total en el tejido renal

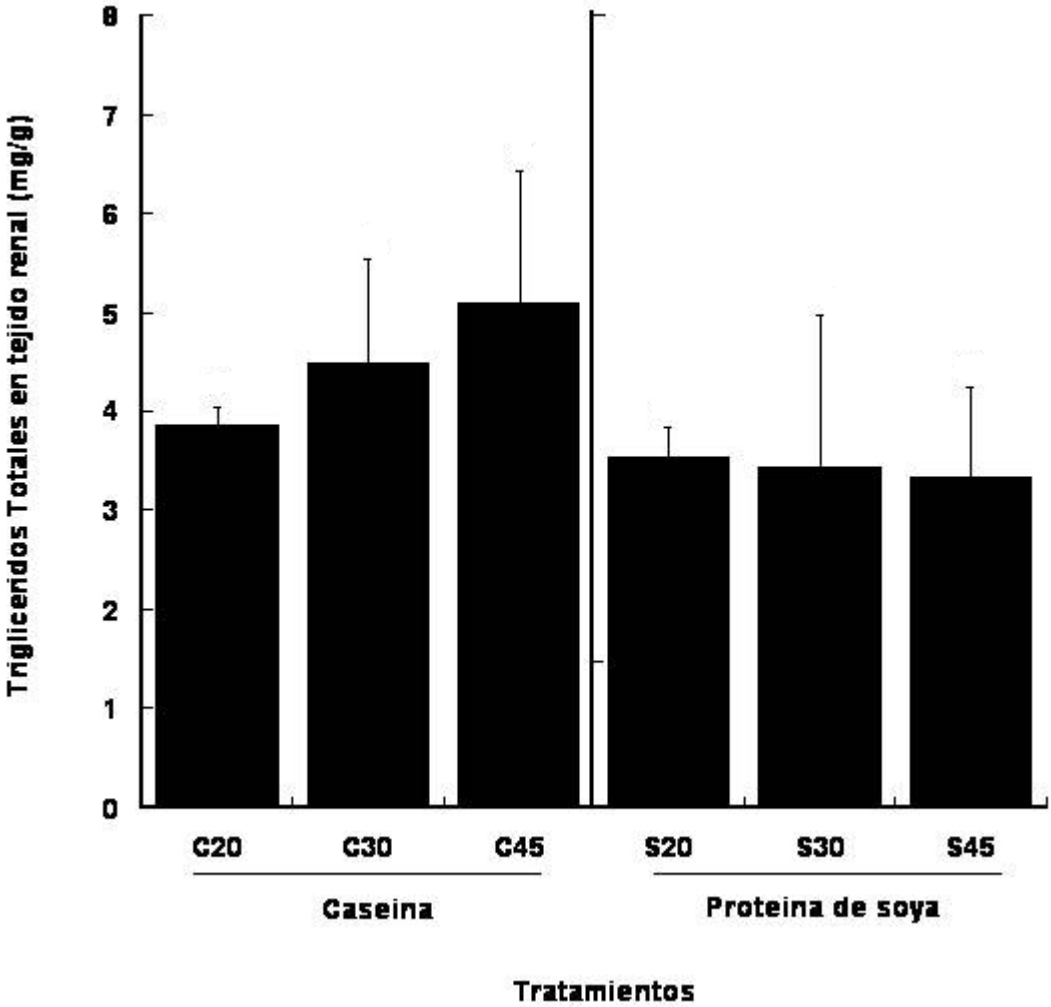
Con respecto al grupo alimentado con el tratamiento dietario de caseína al 20% (C20), considerado como el grupo control, se puede observar que no hay diferencia estadísticamente significativa en ninguno de los tratamientos dietarios.

Al comparar los grupos de animales que fueron alimentados con los diferentes tipos de proteína a las mismas concentraciones (C20-S20, C30-S30 y C45-S45) no se observa diferencia estadísticamente significativa entre ellos. Se observa la tendencia de que los valores de colesterol total en tejido renal en los grupos que fueron alimentados con proteína de soya son siempre menores que los de los grupos que fueron alimentados con caseína.

Si comparamos los grupos de animales que fueron alimentados con caseína (C20-C30-C45), se observa que los valores de colesterol total en tejido renal aumentan al incrementarse la concentración de proteína en la dieta sin alcanzar la significancia estadística. En el caso de los grupos de animales alimentados con proteína de soya (S20-S30-S45), no se observa diferencia estadísticamente significativa y los valores de colesterol total en tejido renal aumentan al incrementarse la concentración de proteína en la dieta, aunque este aumento es mayor en los grupos de animales que fueron alimentados con diferentes concentraciones de caseína en la dieta.

En base a los resultados obtenidos y que se muestran en la gráfica 6.12, se puede decir que, los valores de colesterol total en tejido renal, se incrementan al aumentar la concentración de proteína en la dieta.

6.5.2 TRIGLICÉRIDOS TOTALES EN TEJIDO RENAL



Gráfica 6.13 Triglicéridos totales en el tejido renal

Con respecto al grupo alimentado con el tratamiento dietario de caseína al 20% (C20), considerado como el grupo control, se puede observar que no hay diferencia estadísticamente significativa en ninguno de los tratamientos dietarios.

Al comparar los grupos de animales que fueron alimentados con los diferentes tipos de proteína a las mismas concentraciones (C20-S20, C30-S30 y C45-S45) no se observa diferencia estadísticamente significativa entre ellos. Se observa la tendencia de que los valores de triglicéridos totales en tejido renal en los grupos que fueron alimentados con proteína de soya son siempre menores que los de los grupos que fueron alimentados con caseína.

Si comparamos los grupos de animales que fueron alimentados con caseína (C20-C30-C45), se observa que los valores de colesterol total en tejido renal aumentan al incrementarse la concentración de proteína en la dieta sin alcanzar la significancia estadística. En el caso de los grupos de animales alimentados con proteína de soya (S20-S30-S45), no se observa diferencia estadísticamente significativa y los valores de triglicéridos totales en tejido renal disminuyen al incrementarse la concentración de proteína en la dieta, sin alcanzar la significancia estadística

En base a los resultados obtenidos y que se muestran en la gráfica 6.13, se puede decir que, los valores de triglicéridos totales en tejido renal, se incrementan al aumentar la concentración de caseína en la dieta.

## 6.6 DETERMINACIÓN CREATININA EN SUERO

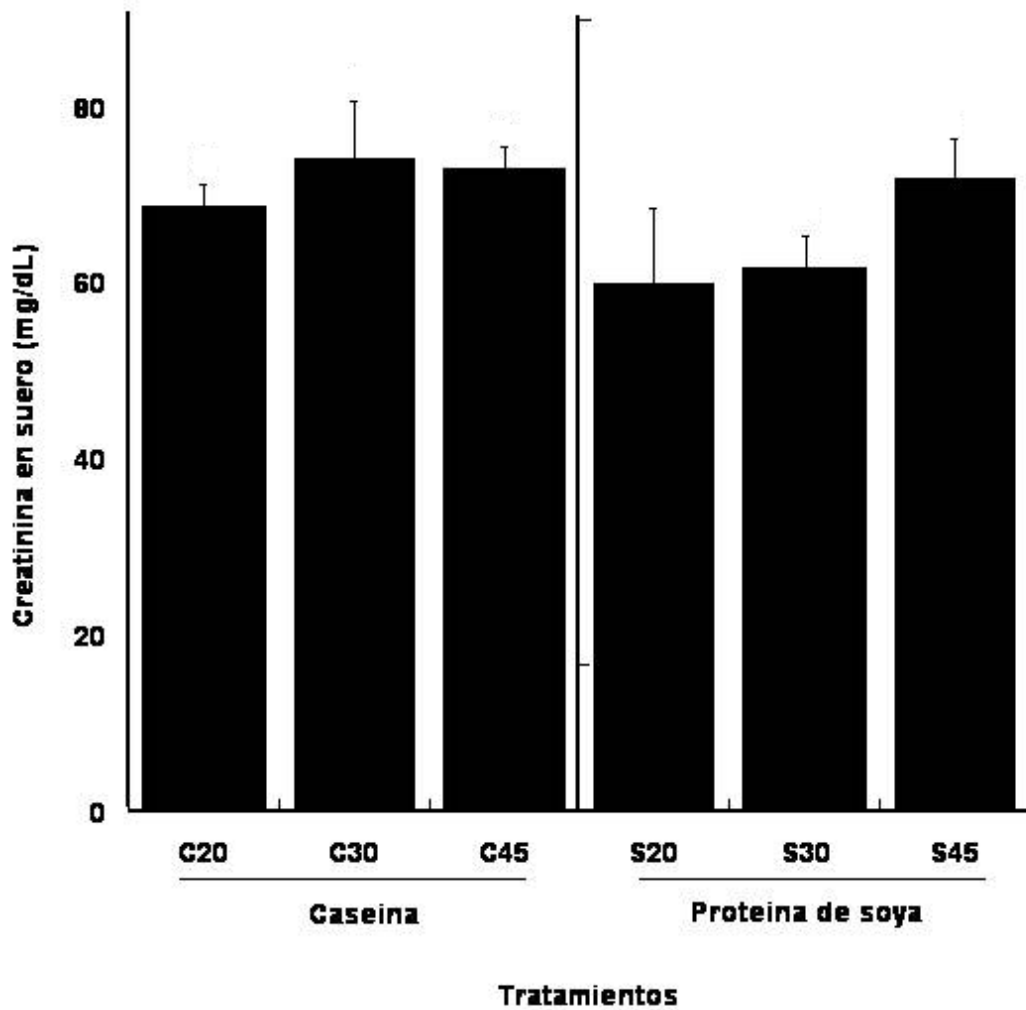
La creatinina es un compuesto orgánico que se genera a partir de la degradación de la creatina. Es un producto de desecho del metabolismo normal de los músculos, que se filtra libremente por el glomérulo, por lo que se puede utilizar como un marcador de la filtración glomerular.

Se evaluó la función renal utilizando como parámetro bioquímico el nivel de creatinina para evaluar la filtración glomerular a nivel renal. Se utilizó un kit comercial para la determinación de creatinina en las muestras de suero y orina en tejido renal de los grupos de animales alimentados con diferentes concentraciones (20,30 y 45%) de caseína y proteína de soya, el cual consiste en una reacción con ácido pícrico.

Con los datos obtenidos de los niveles creatinina en suero y orina de los grupos de animales alimentados con diferentes concentraciones de caseína y proteína de soya, se calculó el índice de depuración de creatinina; la cual compara el nivel de creatinina en la orina con su nivel en la sangre, proporcionándonos información sobre los niveles de filtración glomerular.

En las Tablas A.I.20 y A.I.21 se muestran los cálculos.

Los datos fueron analizados por análisis de varianza, ANOVA, así como por la prueba de *t student*, para determinar si existe o no diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. La significancia estadística se acepta a un nivel de  $p < 0.05$ . Los resultados graficados se muestran a continuación:



**Gráfica 6.14 Creatinina en suero**

Con respecto al grupo de animales alimentados con el tratamiento dietario de caseína al 20% (C20), considerado como el grupo control, se puede observar que no hay diferencia estadísticamente significativa en ninguno de los tratamientos dietarios.

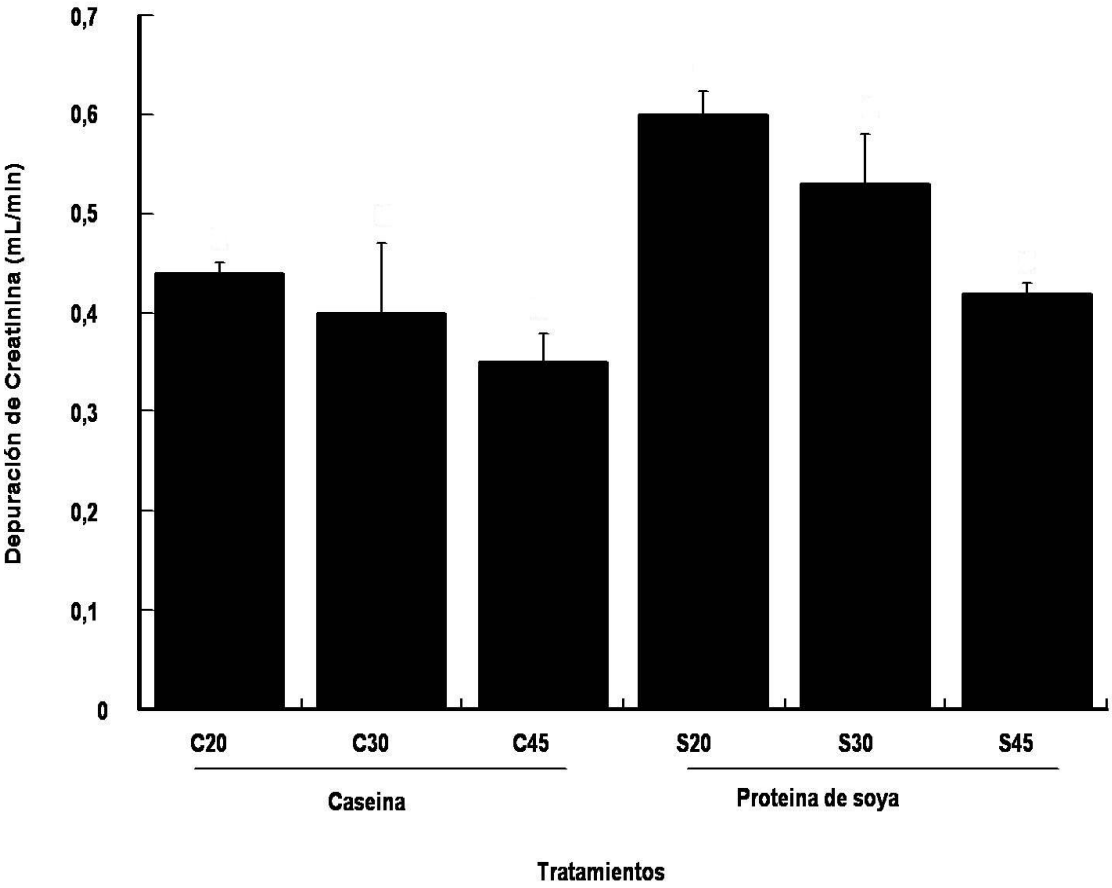


Al comparar los grupos de animales que fueron alimentados con los diferentes tipos de proteína a las mismas concentraciones (C20-S20, C30-S30 y C45-S45) no se observa diferencia estadísticamente significativa entre ellos. Se observa la tendencia de que los valores de creatinina en suero en el tejido renal en los grupos que fueron alimentados con proteína de soya son siempre menores que los de los grupos que fueron alimentados con caseína, sin alcanzar la significancia estadística

Si comparamos los grupos de animales que fueron alimentados con caseína (C20-C30-C45), se observa que los valores de creatinina en suero en el tejido renal aumentan al incrementarse la concentración de proteína en la dieta sin alcanzar la significancia estadística. En el caso de los grupos de animales alimentados con proteína de soya (S20-S30-S45), no se observa diferencia estadísticamente significativa y los valores de creatinina en suero en el tejido renal aumentan al incrementarse la concentración de proteína en la dieta, sin alcanzar la significancia estadística

En base a los resultados obtenidos y que se muestran en la gráfica 6.14, se puede decir que, los valores de creatinina en suero en tejido renal, se incrementan al aumentar la concentración de caseína en la dieta.

### 6.6.1 DEPURACIÓN DE CREATININA



Gráfica.6.15 Depuración de creatinina

Con respecto al grupo de animales alimentados con el tratamiento dietario de caseína al 20% (C20), considerado como el grupo control, se puede observar que no hay diferencia estadísticamente significativa en ninguno de los tratamientos dietarios.

Al comparar los grupos de animales que fueron alimentados con los diferentes tipos de proteína a las mismas concentraciones (C20-S20, C30-S30 y C45-S45) no se observa diferencia estadísticamente significativa entre ellos. Se observa la tendencia de que los niveles de depuración de creatinina en el tejido renal en los grupos que fueron alimentados con caseína y proteína de soya disminuyen conforme se incrementa la concentración de proteína; sin embargo los niveles de depuración de creatinina en el tejido renal en los grupos de animales alimentados con proteína de soya son mayores que los de los grupos que fueron alimentados con caseína, sin alcanzar la significancia estadística

Si comparamos los grupos de animales que fueron alimentados con caseína (C20-C30-C45), se observa que los niveles de depuración de creatinina en el tejido renal disminuyen al incrementarse la concentración de proteína en la dieta sin alcanzar la significancia estadística. En el caso de los grupos de animales alimentados con proteína de soya (S20-S30-S45), no se observa diferencia estadísticamente significativa y los niveles de creatinina en suero en el tejido renal disminuyen al incrementarse la concentración de proteína en la dieta, sin alcanzar la significancia estadística

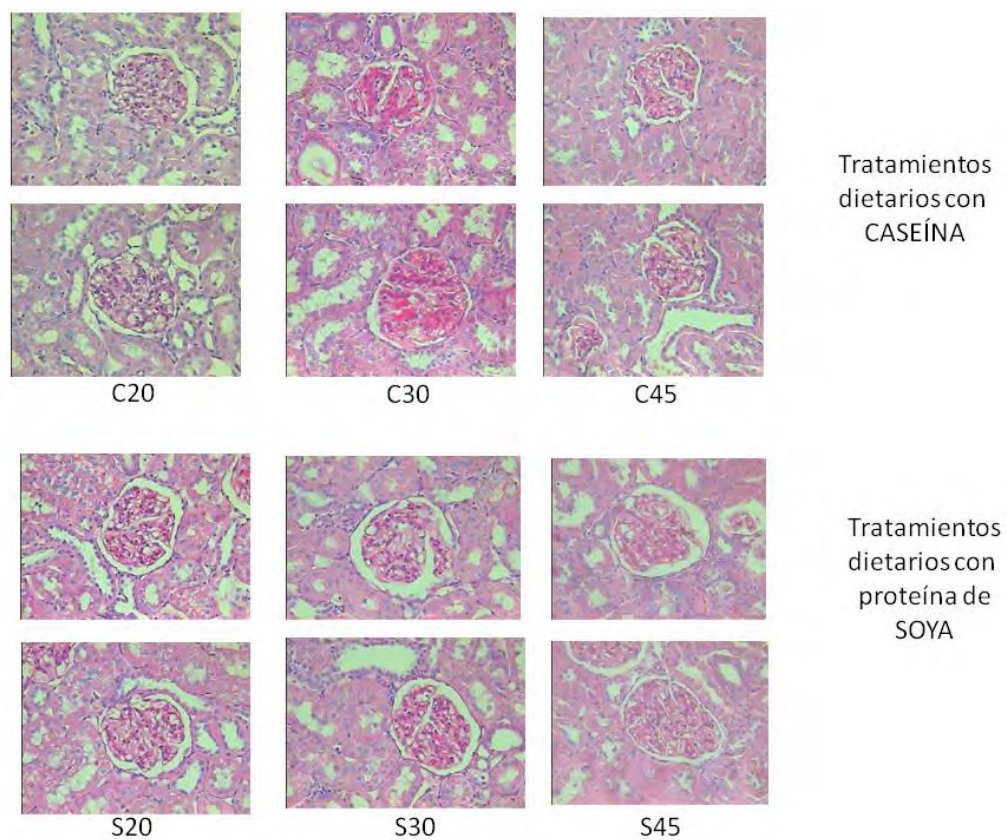
En base a los resultados obtenidos y que se muestran en la gráfica 6.15, se puede decir que, los niveles de creatinina en suero en tejido renal, disminuyen al aumentar la concentración de proteína en la dieta, siendo más bajos los niveles de depuración de creatinina en el tejido renal en el caso de los grupos de animales alimentados con caseína, sin alcanzar la significancia estadística.

## 6.7 HISTOLOGÍAS

### 6.7.1 EXPANSIÓN MESANGIAL

Mediante técnica de PAS, se pueden observar gránulos de glucógeno y fibras reticulares de tejido conjuntivo teñidas de rojo. Las siguientes imágenes fueron obtenidas de los cortes histológicos teñidos mediante la técnica de PAS, en ellas se observan dentro del glomérulo zonas de color rojo intenso, las cuales indican la formación de gránulos de glucógeno y por lo tanto, expansión mesangial.

Las áreas rojas fueron medidas para obtener el % de expansión mesangial del glomérulo y con esto evaluar el nivel de daño renal.

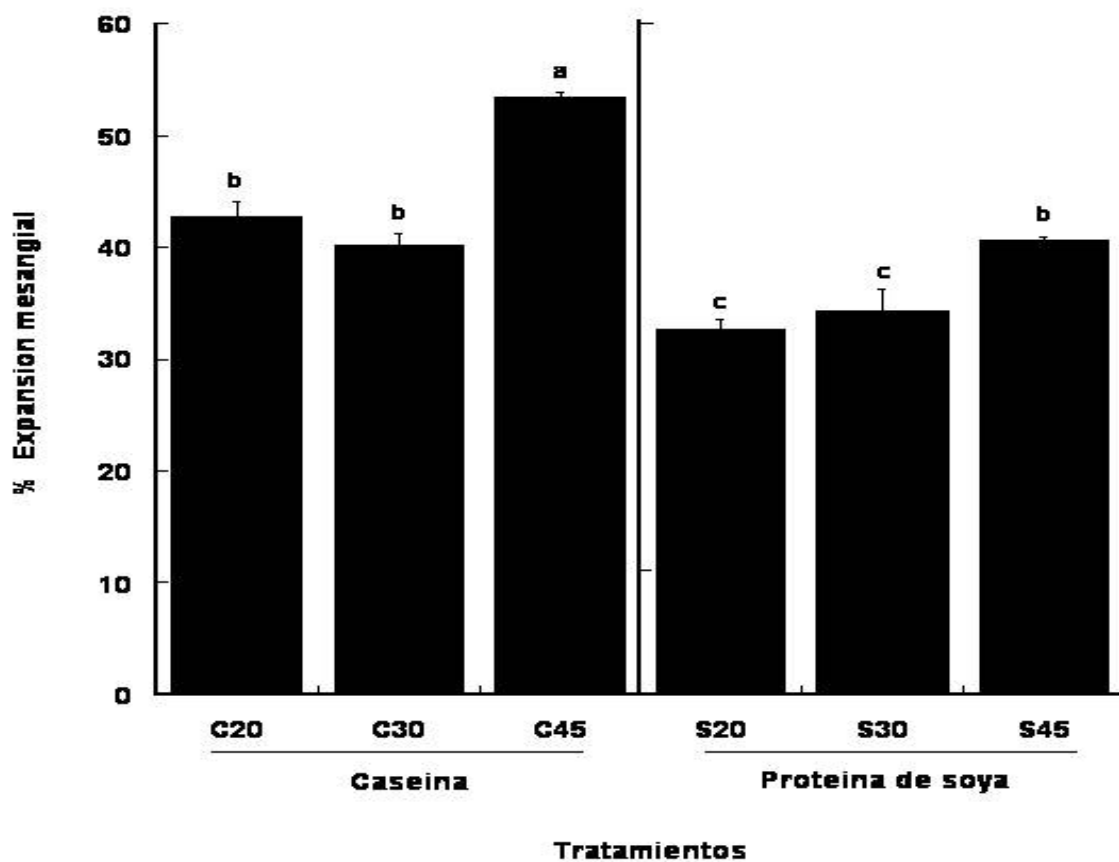


**Figura 6.6 Expansión mesangial de los tratamientos dietarios**

En la figura anterior se puede observar claramente que conforme se incrementa la concentración de proteína en la dieta aumentan las zonas dañadas del glomérulo y por lo tanto el daño renal es mayor. Aunque en las dietas formuladas con proteína de soya el daño es menor, aun así es un daño significativo e importante.

Con base en lo obtenido de los cálculos y promedios de las mediciones microscópicas se obtuvo la siguiente gráfica, la cual indica el % de expansión mesangial del glomérulo vs. el tratamiento dietario analizado.

La gráfica obtenida es la siguiente



Gráfica.6.16 Expansión Mesangial

Con respecto al grupo alimentado con el tratamiento dietario de caseína al 20% (C20), considerado como el grupo control, se puede observar que hay diferencia estadísticamente significativa en los grupos de animales alimentados con caseína al 45% (C45) y en los grupos alimentados con proteína de soya al 20 y 30% (S20 y S30) presentando un porcentaje de expansión mesangial menor al del grupo control.

Los grupos de animales donde no se observa diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control, son en el grupo de animales alimentados con caseína al 30% (C30) y el grupo de animales alimentados con proteína de soya al 45% (S45).

Al comparar los grupos de animales que fueron alimentados con los diferentes tipos de proteína a las mismas concentraciones (C20-S20, C30-S30 y C45-S45) se observa diferencia estadísticamente significativa entre ellos. Se observa la tendencia de que el porcentaje de expansión mesangial en el tejido renal en los grupos que fueron alimentados con proteína de soya son siempre menores que los de los grupos que fueron alimentados con caseína, sin alcanzar la significancia estadística.

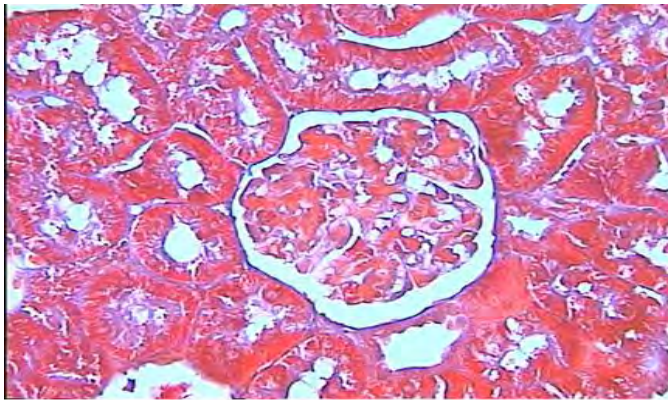
Si comparamos los grupos de animales que fueron alimentados con caseína el mismo tipo de proteína (C20-C30-C45) el porcentaje de expansión mesangial en el tejido renal incrementa al aumentar la concentración de proteína, alcanzando la significancia estadística. En los grupos de animales alimentados con proteína de soya (S20-S30-S45), se observa que el porcentaje de expansión mesangial en el tejido renal aumenta al incrementarse la concentración de proteína en la dieta y este aumento es estadísticamente significativo.

En base a los resultados obtenidos y que se muestran en la gráfica 6.16, se puede decir que, el porcentaje de expansión mesangial y por lo tanto el daño renal, se incrementa al aumentar la concentración de proteína en la dieta, sin embargo este incremento se da en mayor proporción al tratarse de proteína de origen animal, en este caso la caseína.

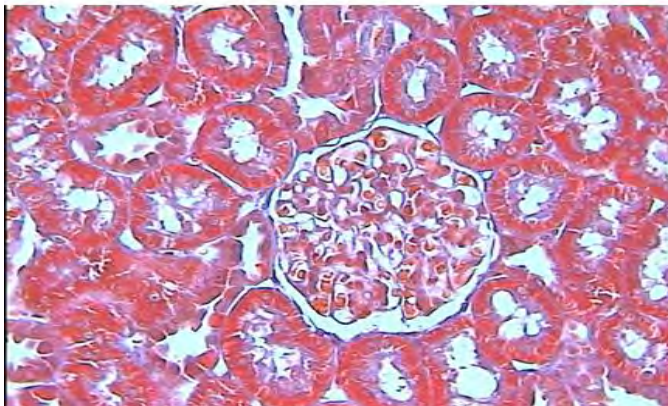
### 6.7.2 Fibrosis

Posterior a un proceso inflamatorio, el daño puede evolucionar a fibrosis. El siguiente paso en el análisis microscópico es observar las laminillas teñidas con la técnica de Masson, mediante la cual podremos observar si existen o no estructuras fibróticas en el glomérulo. Este procedimiento se realizó únicamente con los cortes histológicos de los grupos de animales alimentados con las concentraciones mas altas de proteína (C45 y S45) debido a que presentaron mayores % de expansión mesangial.

Las imágenes obtenidas de las laminillas teñidas con la técnica de Masson fueron las siguientes:



Tratamiento dietario con CASEÍNA al 45%



Tratamiento dietario con proteína de SOYA al 45%

**Figura 6.7 Fibrosis renal de los tratamientos dietarios (tinción tricrómica de Masson)**

Como se puede observar en las imágenes anteriores, no se observan zonas teñidas de azul excepto las membranas del glomérulo, por lo tanto, el daño aun no ha progresado a fibrosis, sin embargo, es bastante probable que si el tiempo de administración de la dieta se prolonga , si se podrían observar estructuras fibróticas en el glomérulo renal.



## 6.8 ANÁLISIS GENERAL

El factor de transcripción SREBP-1, está relacionado con la síntesis de ácidos grasos. A este factor se le conoce como gen maestro debido a que regula la expresión de genes involucrados en estas rutas de síntesis de ácidos grasos como el gen de la sintasa de ácidos grasos (FAS), uno de sus genes blanco. En las gráficas 6.1 y 6.2, se puede observar que la expresión génica a nivel renal de los dos genes anteriormente descritos, aumenta al incrementarse la concentración de proteína en la dieta. Sin embargo, en los grupos de animales alimentados con proteína de soya, el aumento es menor con respecto a los grupos de animales alimentados con caseína. La disminución de lípidos a nivel renal se puede asociar al consumo de proteína de soya, siendo uno de sus principales beneficios en la salud. Los resultados obtenidos van en concordancia con estudios previos que han demostrado que la proteína de soya puede ser benéfica para mantener la homeóstasis de lípidos sistémicos.<sup>63,65</sup>

En la gráfica 6.13 se muestran los niveles de triglicéridos totales en tejido renal. En esta gráfica se observa una tendencia hacia el aumento de la concentración de triglicéridos en tejido renal, al incrementarse la concentración de proteína de origen animal en la dieta. En los grupos de animales alimentados con proteína de soya, se puede observar que a pesar del incremento en la concentración de proteína, los niveles de triglicéridos totales en tejido renal se mantienen iguales entre los grupos, demostrando que la soya tiene un efecto benéfico sobre los niveles de lípidos a nivel renal.

El factor de transcripción SREBP-2 y su gen blanco HMG-CoA reductasa, el cual es el paso limitante para la síntesis de colesterol, juegan un papel muy importante en el metabolismo de este lípido. En las gráficas 6.3 y 6.4, se puede observar una tendencia de que al aumentar la concentración de proteína en la dieta, se incrementa la expresión de estos genes en el tejido renal.

En la gráfica 6.12 se muestran los niveles de colesterol total en tejido renal. Al igual que en las gráficas de los genes SREBP-2 y HMG-CoA reductasa, los

niveles de colesterol total en tejido renal, incrementan al aumentar la concentración de proteína en la dieta. Se puede observar como los niveles de colesterol en tejido renal son menores en los grupos de animales alimentados con proteína de soya, al compararse con los grupos de animales alimentados con caseína. Este hallazgo nos conduce a comprobar una vez más el efecto benéfico de la soya sobre los lípidos.

El gen CPT-1, esta involucrado en la ruta metabólica de la oxidación de ácidos grasos en la mitocondria. En la gráfica 6.5, muestra que en los grupos de animales alimentados con caseína se observa un aumento en la oxidación mitocondrial de ácidos grasos al incrementarse la concentración de proteína, a diferencia de los grupos de animales alimentados con proteína de soya, donde se mantiene constante. En la oxidación de ácidos grasos se producen radicales libres, los cuales provocan estrés oxidativo. El estrés oxidativo es uno de los principales factores que favorecen el proceso inflamatorio y el desarrollo de la fibrosis.

Un parámetro importante para evaluar el daño renal es la inflamación y el incremento en el proceso profibrótico. La obesidad y resistencia a la insulina se han relacionado con el proceso inflamatorio. Los genes relacionados con el proceso de inflamación evaluados fueron TNF- $\alpha$ , IL-6 y TGF- $\beta$ . En las gráficas 6.6, 6.7 y 6.8, se observa que la expresión de los tres genes anteriormente mencionados, aumenta al incrementarse la concentración de proteína en la dieta, sin importar su origen, sin embargo, este incremento es menor en los grupos de animales alimentados con proteína de soya.

Estos genes proinflamatorios y profibróticos, están implicados en el daño glomerular, principalmente con la expansión mesangial. Se realizaron cortes histológicos del riñón de los diferentes grupos de animales sometidos a los diferentes tratamientos dietarios. La expansión mesangial se evaluó con la tinción de PAS. En la gráfica 6.16, se observa que la expansión mesangial, aumenta al incrementarse la concentración de proteína en la dieta, sin importar su origen, sin embargo, este incremento es menor en los grupos de animales alimentados con proteína de soya. Con estos resultados se puede comprobar que los grupos de

animales alimentados con dietas con altas concentraciones de proteína provocan daño renal, sin embargo este daño, es menor en los grupos de animales alimentados con proteína de soya. Estos resultados demuestran que con el consumo de proteína de origen vegetal, el daño a nivel renal es menor.

Posterior a un proceso inflamatorio crónico se produce fibrosis. El proceso de fibrosis se puede evaluar por medio del incremento de la proteína de la colágena tipo IV (COL IV) en tejido renal. En la gráfica 6.9, se observa el incremento de la expresión de estos genes al aumentar la concentración de proteína. En el caso de la colágena tipo IV, la expresión génica disminuye en los grupos con 45% de proteína. Esta disminución pudiera estar asociada a que los animales de este grupo se encontraban en un nivel de daño renal severo.

Se realizó la tinción de Masson en los cortes histológicos de tejido renal para evaluar la fibrosis glomerular. La figura 6.7 demuestra que la formación de fibrillas es mínima y por esta razón esta medición no fue significativa, sin embargo es probable que al incrementar el tiempo de exposición a este tipo de dietas, el daño renal evolucionara a niveles de fibrosis más pronunciados.

Las proteínas Nefrina y Podocina, tienen un papel fundamental en la funcionalidad de la barrera de filtración glomerular. En las gráficas 6.10 y 6.11, se observa para ambos casos que al incrementar la concentración de proteína se aumenta la expresión génica, siendo mayor en los grupos de animales alimentados con proteína de soya.

Los niveles de creatinina en suero pueden variar de acuerdo al tipo de dieta administrada. En la gráfica 6.14, se observan los niveles de creatinina en suero, observándose niveles mayores en los grupos de animales alimentados con caseína.

La depuración de creatinina es un parámetro para determinar el daño renal y es el método más frecuente para medir la filtración glomerular. En la gráfica 6.15, se puede observar que los valores de depuración de creatinina disminuyen al

aumentar la concentración de proteína en la dieta, principalmente en los grupos con caseína.

Cuando existe daño en la filtración glomerular, la expresión génica de Podocina y Nefrina disminuye, los niveles de creatinina en suero aumentan y la depuración de creatinina disminuye.

Con esto se puede concluir que en un modelo de obesidad con presencia de hiperinsulinemia como es la rata Zucker<sup>fa/fa</sup>, la ingestión de dietas con altas concentraciones de proteína reduce la filtración glomerular, conduciendo a daño renal, especialmente cuando se trata de proteína de origen animal.

## CAPÍTULO VII

### CONCLUSIONES

- Al incrementar la concentración de proteína dietaria independientemente del origen se aumenta la expresión de los factores de transcripción SREBP-1 y SREBP-2 y de sus genes blanco FAS y HMG-CoA reductasa respectivamente, incrementándose la síntesis y acumulación de ácidos grasos, triglicéridos y colesterol en el tejido renal de ratas Zucker <sup>fa/fa</sup>.
- La acumulación de lípidos en tejido renal, activa los factores inflamatorios conduciendo a daño renal y fibrosis.
- El consumo prolongado de dietas altas en proteína, promueve el proceso inflamatorio y formación de fibrosis en el tejido renal de ratas Zucker <sup>fa/fa</sup>, independientemente si se trata de proteína de origen vegetal o animal.
- El consumo de proteína de soya retarda la reacción inflamatoria y fibrótica a nivel renal.

## GLOSARIO

**Adiposidad.** Calidad de adiposo

**Aterosclerosis.** Término general para el engrosamiento y endurecimiento de las arterias.

**Génesis.** Origen o principio de una cosa.

**GLUT2.** Transportador de glucosa, galactosa y fructosa.

**Glomeruloesclerosis.** Término usado para describir el tejido cicatrizado que se presenta dentro del riñón en los glomérulos.

***High Density Lipoprotein (HDL por sus siglas en inglés).*** Lipoproteínas de alta densidad que transportan el colesterol desde los tejidos del cuerpo hasta el hígado.

**Hidratos de Carbono.** Compuestos orgánicos caracterizados por la presencia de carbono, hidrógeno y oxígeno, conocidos coloquialmente como carbohidratos, por la palabra inglesa (*carbohydrates*).

**Hipercolesterolemia.** Aumento del colesterol plasmático por encima de un valor considerado normal.

**Hiperfagia.** Aumento excesivo de la sensación de apetito e ingestión descontroladas de alimentos, sin razón aparente.

**Hiperfiltración.** Aumento de la filtración glomerular y de la reabsorción tubular proximal de proteínas, hay mayor producción de mediadores de inflamación, acelerando el daño renal.

**Hiperglicemia.** Exceso de glucosa en sangre.

**Hiperglucemia postprandial.** Incremento excesivo de la glucosa después de las comidas.

**Hiperinsulinemia.** Exceso de insulina en sangre.

**Hiperlipemia.** Nivel anormalmente alto de lípidos en la sangre.

**Hipertensión.** Incremento de las cifras de presión arterial por encima de un valor considerado normal.

**Hipertrigliceridemia.** Aumento de los triglicéridos plasmáticos por encima de un valor considerado normal.

**Hipertrofia.** Aumento del tamaño de un órgano cuando se debe al aumento correlativo en el tamaño de las células que lo forman; de esta manera el órgano hipertrofiado tiene células mayores, y no nuevas.

**Homeóstasis.** Conjunto de fenómenos de autorregulación, conducentes al mantenimiento de una relativa constancia en las composiciones y las propiedades del medio interno de un organismo.

**Índice de masa corporal (IMC).** Medida de asociación entre el peso y la talla de un individuo ( $IMC=kg/m^2$ ), muy variable ya que depende del origen étnico, sexo, edad, musculatura, densidad ósea, etc.

**Lipogénesis.** Reacción bioquímica por la cual son sintetizados los ácidos grasos y esterificados o unidos con el glicerol para formar triglicéridos o grasas de reserva.

**Low Density Lipoprotein (*LDL por sus siglas en inglés*).** Lipoproteínas de baja densidad.

**Morbimortalidad.** Mortalidad por causa de una enfermedad.

**Nefrona.** Unidad estructural y funcional básica del riñón, responsable de la purificación de la sangre. Su función principal es filtrar la sangre para regular el agua y las sustancias solubles, reabsorbiendo lo que es necesario y excretando el resto como orina. Está situada principalmente en la corteza renal.

**Nefropatía diabética.** Daño a las nefronas causado por el exceso de glucosa en la sangre

**Pandemia.** Enfermedad epidémica que se extiende a muchos países o que ataca a casi todos los individuos de una localidad o región.

**Rata Zucker<sup>fa/fa</sup>.** Es un modelo animal de obesidad heredable y ha sido ampliamente utilizado como modelo experimental de obesidad.

**Síntesis endógena.** Proceso químico que permite obtener sustancias, que por lo general se dan también en la naturaleza, partiendo de sus componentes, que se origina en virtud de causas internas

**Uremia.** Acumulación en la sangre de los productos tóxicos que, en estado general normal, son eliminados por el riñón y que se hallan retenidos por un trastorno del funcionamiento renal.

**Very Low Density Lipoprotein (*VLDL por sus siglas en inglés*).** Lipoproteínas de muy baja densidad.



## ABREVIATURAS

°C	grado Centígrado o Celsius
µL	microlitros
Abs	absorbancia
Ac.	Ácidos
ADNc	Ácido Desoxi Ribonucléico complementario
ADP	Adenosin difosfato
AGPI	Ácidos grasos poliinsaturados
AHA	American Heart Association
AMP	Adenosin monofosfato
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
ARNm.	Ácido Ribonucléico mensajero
ARNr	Ácido Ribonucléico ribosomal
ARNt	Ácido Ribonucléico transferencia
C20	Tratamiento dietario con Caseína al 20%
C30	Tratamiento dietario con Caseína al 30%
C45	Tratamiento dietario con Caseína al 45%
CCK	Colecistocinina
Cis	Cisterna
cm	centímetros

CO <sup>2</sup>	Bióxido de Carbono
CoA.	Coenzima A
COL IV.	Colágena tipo IV
CPT-1.	Carnitina Palmitoil Transferasa I
D.O.	Densidad óptica
DEPC	pirocarbonato de dietilo
dL	decilitros
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus Tipo 1
DM2	Diabetes mellitus Tipo 2
dNTP	Sustrato abundante de iniciadores y desoxinucleótidos trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EE.UU	Estados Unidos De Norteamérica
EGIR	Grupo Europeo de Estudio de Resistencia a la Insulina
ENSANUT 2006.	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición del 2006
EPO	Eritropoyetina
FAS.	Sintasa de Ácidos grasos
FDA	Food and Drug Administration
Fen	Fenilalanina
FG	Filtrado Glomerular

g	gramos
GLUT2	Transportador de glucosa 2
H <sup>+</sup>	Hidrógeno
H <sub>2</sub> O	Agua
H <sup>2</sup> O <sup>2</sup>	Peróxido de Hidrógeno
HCl	Ácido Clorhídrico
His	Histidina
HLDL.	Lipoproteínas de alta densidad
HMG-CoA reductasa 3-hidroxi-3-metil-glutaril- CoA reductasa	
IgA	Inmunoglobulina A
IL6.	Interleucina 6
Ile	Isoleucina
IMC.	Índice de Masa Corporal
IMMS	Instituto Mexicano del Seguro Social
INN CMSZ	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán.
IR	Insuficiencia Renal
kDa	Kilo Daltons
Kg	kilogramos
L	litros
LB	Loading Buffer

LPL	Enzima lipoproteína-lipasa
M	molar
m <sup>2</sup>	metros cuadrados
Met	Metionina
mg	miligramos
min	minuto
mL	mililitros
mmol	milimol
Na <sup>+</sup>	Sodio
NADPH	Nicotinamida-Adenina Dinucleótido fosfato
ng	nanogramos
NHLBI 1998.	National Heart Lung and Blood Institute
nm	nanometros
NPHS1	Gen que codifica para la proteína Nefrina
NPHS2	Gen que codifica para la proteína Podocina
O <sup>2</sup>	Oxígeno
ObR	Receptor de leptina
OMS.	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa por sus siglas en inglés
PKD	Poliquistosis

PP	Pirofosfato
Rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcriptasa reversa por sus siglas en inglés
S20	Tratamiento dietario con Caseína al 20%
S30	Tratamiento dietario con Caseína al 30%
S45	Tratamiento dietario con Caseína al 45%
seg	segundos
SNC	Sistema Nervioso Central
SREBP-1	Proteína de unión a los elementos de respuesta de esteroides tipo 1
SREBP-2	Proteína de unión a los elementos de respuesta de esteroides tipo 2
SSA	Secretaría de Salud
TGF- $\beta$ .	Factor de transformación tumoral beta
Tir	Tirosina
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
Tre	Treonina
Trp	Triptofano
UV	Ultravioleta
V	Volts
Val	Valina
VLDL.	Lipoproteínas de muy baja densidad

## ÁPENDICE I TABLAS

Tabla A.I.1 Lectura 260 y 280 nm del ARN extraído

No.	Muestra	Abs 260 nm	Abs 280 nm	260/280
1	C20-2	0.3014	0.1393	2.1723
2	C20-3	0.3106	0.1494	2.1503
3	C20-4	0.2882	0.1344	2.1638
4	C20-5	0.3762	0.1744	2.1673
5	C20-7	0.2964	0.1384	2.1584
6	C20-8	0.2780	0.1292	2.1678
7	S20-1	0.3151	0.1453	2.1684
8	S20-2	0.2224	0.1022	2.1647
9	S20-3	0.3056	0.1405	2.1707
10	S20-4	0.3058	0.1406	2.1773
11	S20-5	0.2875	0.1323	2.1817
12	S20-6	0.3688	0.1705	2.1739
13	S20-8	0.3407	0.1570	2.1758
14	C30-1	0.4327	0.1993	2.1766
15	C30-2	0.1603	0.0696	2.1877
16	C30-3	0.1973	0.0919	2.1842
17	C30-4	0.3135	0.1472	2.1773
18	C30-5	0.3072	0.1452	2.1629
19	C30-6	0.0803	0.0396	2.1604
20	C30-7	0.3187	0.1481	2.1623
21	C30-8	0.3305	0.1528	2.1732
22	S30-1	0.3157	0.1456	2.1691
23	S30-2	0.2783	0.1307	2.1633
24	S30-3	0.3599	0.1671	2.1739
25	S30-4	0.2288	0.1147	2.1221
26	S30-5	0.2203	0.1047	2.1359
27	S30-6	0.2743	0.1409	2.1544
28	S30-7	0.1880	0.0888	2.1394
29	S30-8	0.2163	0.1198	2.1053

Tabla A.I.1 Lectura 260 y 280 nm del ARN extraído

<b>No.</b>	<b>Muestra</b>	<b>Abs 260 nm</b>	<b>Abs 280 nm</b>	<b>260/280</b>
30	C45-1	0.5081	0.3022	2.0686
31	C45-2	0.2969	0.1391	2.1785
32	C45-3	0.2764	0.1286	2.1752
33	C45-4	0.4881	0.2310	2.1636
34	C45-5	0.3079	0.1427	2.1787
35	C45-6	0.3285	0.1540	2.1650
36	C45-7	0.0687	0.0353	2.1353
37	C45-8	0.5228	0.2454	2.1460
38	S45-1	0.2123	0.0997	2.1610
39	S45-2	0.2174	0.0983	2.1745
40	S45-3	0.3051	0.1399	2.1715
41	S45-4	0.2719	0.1257	2.1660
42	S45-5	0.2893	0.1334	2.1680
43	S45-6	0.3125	0.1518	2.1643
44	S45-7	0.3160	0.1471	2.1649
45	S45-8	0.1857	0.0865	2.1711

**Tabla A.I.2 Cálculos de g ARN /  $\mu$ L**

<b>No.</b>	<b>Muestra</b>	<b>Abs 260 nm</b>	<b>X' <math>\mu</math>g ARN / <math>\mu</math>L</b>
1	C20-2	0.3014	3.014
2	C20-3	0.316	3.106
3	C20-4	0.2884	2.882
4	C20-5	0.3762	3.762
5	C20-7	0.2964	2.964
6	C20-8	0.2780	2.780
7	S20-1	0.30151	3.151
8	S20-2	0.2224	2.224
9	S20-3	0.3056	3.056
10	S20-4	0.3058	3.058
11	S20-5	0.2875	2.875
12	S20-6	0.3688	3.688
13	S20-8	0.3407	3.407
14	C30-1	0.4327	4.327
15	C30-2	0.1603	1.603
16	C30-3	0.1973	1.973
17	C30-4	0.3135	3.135
18	C30-5	0.3072	3.072
19	C30-6	0.0803	0.803
20	C30-7	0.3187	3.187
21	C30-8	0.3305	3.305
22	S30-1	0.3157	3.157
23	S30-2	0.2783	2.783
24	S30-3	0.3599	3.599
25	S30-4	0.2288	2.288
26	S30-5	0.2203	2.203
27	S30-6	0.2743	2.743
28	S30-7	0.1880	1.880
29	S30-8	0.2163	2.163
30	C45-1	0.5081	5.081
31	C45-2	0.2969	2.969



Tabla A.I.2 Cálculos de g ARN /  $\mu$ L

<b>No.</b>	<b>Muestra</b>	<b>Abs 260 nm</b>	<b>X' <math>\mu</math>g ARN / <math>\mu</math>L</b>
32	C45-3	0.2764	2.764
33	C45-4	0.4881	4.881
34	C45-5	0.3079	3.079
35	C45-6	0.3285	3.285
36	C45-7	0.0687	0.687
37	C45-8	0.5228	5.228
38	S45-1	0.2123	2.123
39	S45-2	0.2174	2.174
40	S45-3	0.3051	3.051
41	S45-4	0.2719	2.719
42	S45-5	0.2893	2.893
43	S45-6	0.3125	3.125
44	S45-7	0.3160	3.160
45	S45-8	0.1857	1.857

**Tabla A.I.3 Cálculos para la preparación de muestras de electroforesis de ARN**

No.	Muestra	X' mg ARN / μL	X μL ARN/ para 5μg ARN	mL de formamida
1	C20-2	3.014	1.65	9.35
2	C20-3	3.106	1.61	9.39
3	C20-4	2.882	1.73	9.27
4	C20-5	3.762	1.33	9.67
5	C20-7	2.964	1.69	9.31
6	C20-8	2.78	1.80	9.20
7	S20-1	3.151	1.59	9.41
8	S20-2	2.224	2.25	8.75
9	S20-3	3.056	1.64	9.36
10	S20-4	3.058	1.64	9.36
11	S20-5	2.875	1.74	9.26
12	S20-6	3.688	1.36	9.64
13	S20-8	3.407	1.47	9.53
14	C30-1	4.327	1.16	9.84
15	C30-2	1.603	3.12	7.88
16	C30-3	1.973	2.53	8.47
17	C30-4	3.135	1.59	9.41
18	C30-5	3.072	1.63	9.37
19	C30-6	0.803	6.23	4.77
20	C30-7	3.187	1.57	9.43
21	C30-8	3.305	1.51	9.49
22	S30-1	3.157	1.58	9.42
23	S30-2	2.783	1.80	9.20
24	S30-3	3.599	1.39	9.61
25	S30-4	2.288	2.19	8.81
26	S30-5	2.203	2.27	8.73
27	S30-6	2.743	1.82	9.18
28	S30-7	1.88	2.66	8.34
29	S30-8	2.163	2.31	8.69

Tabla A.I.3 Cálculos para la preparación de muestras de electroforesis de ARN

<b>No.</b>	<b>Muestra</b>	<b>X' mg ARN / μL</b>	<b>X μL ARN/ para 5μg ARN</b>	<b>mL de formamida</b>
30	C45-1	5.081	0.98	10.02
31	C45-2	2.969	1.68	9.32
32	C45-3	2.764	1.81	9.19
33	C45-4	4.881	1.02	9.98
34	C45-5	3.079	1.62	9.38
35	C45-6	3.285	1.52	9.48
36	C45-7	0.687	7.28	3.72
37	C45-8	5.228	0.96	10.04
38	S45-1	2.123	2.36	8.64
39	S45-2	2.174	2.30	8.70
40	S45-3	3.051	1.64	9.36
41	S45-4	2.719	1.84	9.16
42	S45-5	2.893	1.73	9.27
43	S45-6	3.125	1.60	9.40
44	S45-7	3.16	1.58	9.42
45	S45-8	1.857	2.69	8.31

**Tabla A.I.4 Cálculos para las diluciones de 500  $\mu\text{L}$  a una concentración de 150  $\text{ng}/\mu\text{L}$  de ARN**

No.	Muestra	X mg ARN/ mL	X ng ARN / $\mu\text{L}$	$\mu\text{L}$ ARN	$\mu\text{L}$ H <sub>2</sub> O
1	C20-2	3.014	3014	24.9	475.1
2	C20-3	3.106	3106	24.1	475.9
3	C20-4	2.882	2882	26.0	474.0
4	C20-5	3.762	3762	19.9	480.1
5	C20-7	2.964	2964	25.3	474.7
6	C20-8	2.78	2780	27.0	473.0
7	S20-1	3.151	3151	23.8	476.2
8	S20-2	2.224	2224	33.7	466.3
9	S20-3	3.056	3056	24.5	475.5
10	S20-4	3.058	3058	24.5	475.5
11	S20-5	2.875	2875	26.1	473.9
12	S20-6	3.688	3688	20.3	479.7
13	S20-8	3.407	3407	22.0	478.0
14	C30-1	4.327	4327	17.3	482.7
15	C30-2	1.603	1603	46.8	453.2
16	C30-3	1.973	1973	38.0	462.0
17	C30-4	3.135	3135	23.9	476.1
18	C30-5	2.796	2796	26.8	473.2
19	C30-6	-----	-----		
20	C30-7	3.187	3187	23.5	476.5
21	C30-8	3.305	3305	22.7	477.3
22	S30-1	3.157	3157	23.8	476.2
23	S30-2	2.783	2783	26.9	473.1
24	S30-3	3.599	3599	20.8	479.2
25	S30-4	2.288	2288	32.8	467.2
26	S30-5	2.203	2203	34.0	466.0
27	S30-6	2.274	2274	33.0	467.0
28	S30-7	1.88	1880	39.9	460.1
29	S30-8	2.163	2163	34.7	465.3

Tabla A.I.4 Cálculos para las diluciones de 500  $\mu\text{L}$  a una concentración de 150 ng / $\mu\text{L}$  de ARN

No.	Muestra	X mg ARN/ mL	X ng ARN / $\mu\text{L}$	$\mu\text{L}$ ARN	$\mu\text{L}$ H <sub>2</sub> O
30	C45-1	5.081	5081	14.8	485.2
31	C45-2	2.969	2969	25.3	474.7
32	C45-3	2.764	2764	27.1	472.9
33	C45-4	4.881	4881	15.4	484.6
34	C45-5	3.079	3079	24.4	475.6
35	C45-6	3.285	3285	22.8	477.2
36	C45-7	-----	-----		
37	C45-8	5.228	5228	14.3	485.7
38	S45-1	2.123	2123	35.3	464.7
39	S45-2	2.174	2174	34.5	465.5
40	S45-3	3.051	3051	24.6	475.4
41	S45-4	2.719	2719	27.6	472.4
42	S45-5	2.893	2893	25.9	474.1
43	S45-6	3.251	3251	23.1	476.9
44	S45-7	3.16	3160	23.7	476.3
45	S45-8	1.857	1857	40.4	459.6

**Tabla A.I.5 Cuantificación de las diluciones de 150 ng / $\mu$ L de ARN**

<b>No.</b>	<b>Muestra</b>	<b>Abs 260 nm</b>	<b>X' mg ARN / <math>\mu</math>L</b>
1	C20-2	0.0178	178
2	C20-3	0.0145	145
3	C20-4	0.0149	149
4	C20-5	0.0146	146
5	C20-7	0.0150	150
6	C20-8	0.0136	136
7	S20-1	0.0136	136
8	S20-2	0.0159	159
9	S20-3	0.0167	167
10	S20-4	0.0149	149
11	S20-5	0.0161	161
12	S20-6	0.0161	161
13	S20-8	0.0153	153
14	C30-1	0.0168	168
15	C30-2	0.0176	176
16	C30-3	0.0170	170
17	C30-4	0.0145	145
18	C30-5	0.0160	160
19	C30-6	-----	----
20	C30-7	0.0160	160
21	C30-8	0.0160	160
22	S30-1	0.0131	131
23	S30-2	0.0160	160
24	S30-3	0.0164	164
25	S30-4	0.0138	138
26	S30-5	0.0130	130
27	S30-6	0.0167	167
28	S30-7	0.0175	175
29	S30-8	0.0152	152
30	C45-1	0.0129	129
31	C45-2	0.0150	150
32	C45-3	0.0140	140

Tabla A.I.5 Cuantificación de las diluciones de 150 ng / $\mu$ L de ARN

<b>No.</b>	<b>Muestra</b>	<b>Abs 260 nm</b>	<b>X' mg ARN / <math>\mu</math>L</b>
33	C45-4	0.0127	127
34	C45-5	0.0131	131
35	C45-6	0.0142	142
36	C45-7	-----	-----
37	C45-8	0.0152	152
38	S45-1	0.0138	138
39	S45-2	0.0167	167
40	S45-3	0.0174	174
41	S45-4	0.0125	125
42	S45-5	0.0145	145
43	S45-6	0.0177	177
44	S45-7	0.0166	166
45	S45-8	0.0172	172

\*Se eliminaron las muestras C30-6 y C45 -7 ya que al cuantificar se obtenían valores muy altos

**Tabla A.I.6 Cálculo de *agua sigma* y ARN para 300 ng**

No.	Muestra	X ng ARN / $\mu$ L	$\mu$ L ARN	$\mu$ L H <sub>2</sub> O
1	C20-2	178	1.69	4.81
2	C20-3	145	2.07	4.43
3	C20-4	149	2.01	4.49
4	C20-5	146	2.05	4.45
5	C20-7	150	2.00	4.50
6	C20-8	136	2.21	4.29
7	S20-1	136	2.21	4.29
8	S20-2	159	1.89	4.61
9	S20-3	167	1.80	4.70
10	S20-4	149	2.01	4.49
11	S20-5	161	1.86	4.64
12	S20-6	161	1.86	4.64
13	S20-8	153	1.96	4.54
14	C30-1	168	1.79	4.71
15	C30-2	176	1.70	4.80
16	C30-3	170	1.76	4.74
17	C30-4	145	2.07	4.43
18	C30-5	160	1.88	4.63
19	C30-6			
20	C30-7	160	1.88	4.63
21	C30-8	160	1.88	4.63
22	S30-1	131	2.29	4.21
23	S30-2	160	1.88	4.63
24	S30-3	164	1.83	4.67
25	S30-4	138	2.17	4.33
26	S30-5	130	2.31	4.19
27	S30-6	167	1.80	4.70
28	S30-7	175	1.71	4.79
29	S30-8	152	1.97	4.53
30	C45-1	129	2.33	4.17
31	C45-2	150	2.00	4.50



Tabla A.I.6 Cálculo de *agua sigma* y ARN para 300 ng

No.	Muestra	X ng ARN / $\mu$ L	$\mu$ L ARN	$\mu$ L H <sub>2</sub> O
32	C45-3	140	2.14	4.36
33	C45-4	127	2.36	4.14
34	C45-5	131	2.29	4.21
35	C45-6	142	2.11	4.39
36	C45-7	-----	-----	-----
37	C45-8	152	1.97	4.53
38	S45-1	138	2.17	4.33
39	S45-2	167	1.80	4.70
40	S45-3	174	1.72	4.78
41	S45-4	125	2.40	4.10
42	S45-5	145	2.07	4.43
43	S45-6	177	1.69	4.81
44	S45-7	166	1.81	4.69
45	S45-8	172	1.74	4.76

**Tabla A.I.7 Resultados expresión génica por medio de la técnica comparativa del “ct” para SREBP-1**

<b>No.</b>	<b>Muestra</b>	<b>Ct ciclofilina</b>	<b>Ct SREBP-1</b>	<b>Expresión Génica</b>	<b>Promedio Expresión Génica</b>
1	C20-2	20.21	27.05	0.7	
2	C20-3	19.83	25.32	1.8	
3	C20-4	19.7	26.18	0.9	
4	C20-7	19.85	26.48	0.8	
5	C20-8	20.03	26.46	1.0	
					1.1
6	S20-1	19.52	25.84	1.0	
7	S20-2	19.73	26.04	1.0	
8	S20-3	20.31	27.21	0.7	
9	S20-4	20.13	26.93	0.7	
10	S20-5	19.73	25.96	1.1	
11	S20-6	19.62	26.22	0.9	
12	S20-8	19.58	26.04	0.9	
					0.9
13	C30-2	20.68	25.4	3.1	
14	C30-3	21.16	26.3	2.4	
15	C30-4	20.66	25.81	2.3	
16	C30-5	20.34	26.47	1.2	
17	C30-7	21.04	25.98	2.7	
18	C30-8	20.86	26.52	1.6	
					2.2
19	S30-1	20.69	25.94	2.2	
20	S30-2	20.7	25.65	2.7	
21	S30-3	20.6	25.78	2.3	
22	S30-4	20.44	25.88	1.9	
23	S30-5	20.34	26.06	1.6	
24	S30-6	20.78	26.04	2.2	
25	S30-7	20.63	27.09	0.9	
26	S30-8	19.47	25.13	1.6	
					1.9
27	C45-1	20.68	25.78	2.4	
28	C45-2	20.66	26.26	1.7	
29	C45-3	21.09	26.31	2.2	
30	C45-4	20.6	25.65	2.5	

Tabla A.I.7 Resultados expresión génica por medio de la técnica comparativa del “ct” para SREBP-1

<b>No.</b>	<b>Muestra</b>	<b>Ct ciclofilina</b>	<b>Ct SREBP-1</b>	<b>Expresión Génica</b>	<b>Promedio Expresión Génica</b>
31	C45-5	20.08	25.06	2.6	
32	C45-6	20.62	25.93	2.1	
33	C45-8	20.7	26.01	2.1	
					2.2
34	S45-1	20.15	26.11	1.3	
35	S45-2	20.14	25.83	1.6	
36	S45-3	20.25	25.43	2.3	
37	S45-4	20.28	25.5	2.2	
38	S45-5	20.21	25.45	2.2	
39	S45-6	20.32	25.86	1.8	
40	S45-7	20.32	25.92	1.7	
41	S45-8	20.77	26.24	1.9	
					1.9

**Tabla A.I.8 Resultados expresión génica por medio de la técnica comparativa del “ct” para FAS**

	<b>Muestra</b>	<b>Ct ciclofilina</b>	<b>Ct FAS</b>	<b>Expresión Génica</b>	<b>Promedio Expresión Génica</b>
1	C20-2	20.09	28.24	0.6	
2	C20-3	19.1	27.58	0.5	
3	C20-4	21.31	28.77	0.9	
4	C20-5	21.48	28.97	0.9	
5	C20-7	21.82	28.18	2.0	
6	C20-8	21.93	28.03	2.4	
					1.0
7	S20-1	21.1	30.63	1.3	
8	S20-2	20.54	31.29	0.5	
9	S20-3	22.42	31.95	1.3	
10	S20-4	21.39	29.28	4.0	
11	S20-5	21.25	31.96	0.1	
12	S20-6	21.7	31.09	1.4	
13	S20-8	21.24	30.02	2.1	
					0.92
14	C30-1	21.43	28.67	1.1	
15	C30-2	22.14	28.08	2.6	
16	C30-3	22.25	28.75	1.8	
17	C30-4	21.22	28.82	0.8	
18	C30-5	21.52	28.4	1.4	
19	C30-7	21.84	28.53	1.6	
20	C30-8	22.23	29.09	1.4	
					1.3
21	S30-1	21.38	31.14	1.1	
22	S30-2	21.76	31.62	1.0	
23	S30-3	21.26	31.98	0.6	
24	S30-4	20.45	29.7	1.5	
25	S30-5	21.05	29.02	3.8	
26	S30-6	21.38	31.01	1.2	
27	S30-7	21.86	32.36	0.6	
28	S30-8	21.17	31.74	0.6	
					1.3
29	C45-1	22.21	28.6	1.9	
30	C45-2	22.05	29.18	1.2	
31	C45-3	19.97	27.41	0.9	
32	C45-4	20.34	27.51	1.1	
33	C45-5	21.29	27.89	1.7	
34	C45-6	21.5	28.5	1.3	

Tabla A.I.8 Resultados expresión génica por medio de la técnica comparativa del “ct” para FAS

	<b>Muestra</b>	<b>Ct ciclofilina</b>	<b>Ct FAS</b>	<b>Expresión Génica</b>	<b>Promedio Expresión Génica</b>
35	C45-8	21.92	28.33	1.9	
					1.4
36	S45-1	21.31	28.75	1.4	
37	S45-2	21.35	28.56	1.6	
38	S45-3	21.57	28.73	1.7	
39	S45-4	21.23	28.59	1.5	
40	S45-5	21.13	28.84	1.1	
41	S45-6	21.34	29.31	1.0	
42	S45-7	21.71	29	1.5	
43	S45-8	21.31	28.75	1.4	
					1.4

**Tabla A.I.9 Resultados expresión génica por medio de la técnica comparativa del “ct” para SREBP-2**

<b>No.</b>	<b>Muestra</b>	<b>Ct ciclofilina</b>	<b>Ct SREBP-2</b>	<b>Expresión Génica</b>	<b>Promedio Expresión Génica</b>
1	C20-2	20.21	27.43	0.9	
2	C20-3	19.83	26.47	1.3	
3	C20-4	19.7	26.9	0.9	
4	C20-7	19.85	27.32	0.7	
5	C20-8	20.03	26.67	1.3	
					1.0
6	S20-1	19.52	26.42	1.1	
7	S20-2	19.73	26.77	1.0	
8	S20-3	20.31	27.92	0.7	
9	S20-4	20.13	27.21	1.0	
10	S20-5	19.73	26.53	1.2	
11	S20-6	19.62	26.79	0.9	
12	S20-8	19.58	27.03	0.7	
					0.9
13	C30-1	21.19	27.13	2.1	
14	C30-2	20.68	26.65	2.1	
15	C30-3	21.16	27.7	1.4	
16	C30-4	20.66	27.13	1.5	
17	C30-5	20.34	27.04	1.3	
18	C30-7	21.04	27.54	1.4	
19	C30-8	20.86	27.71	1.1	
					1.6
20	S30-1	20.69	26.28	2.7	
21	S30-2	20.7	26.48	2.4	
22	S30-3	20.6	26.51	2.2	
23	S30-4	20.44	26.89	1.5	
24	S30-5	20.34	27.29	1.1	
25	S30-6	20.78	27.09	1.7	
26	S30-7	20.63	27.49	1.1	
27	S30-8	19.47	26.29	1.2	
					1.7
28	C45-1	20.68	27.16	1.5	
29	C45-2	20.66	27.45	1.2	

Tabla A.I.9 Resultados expresión génica por medio de la técnica comparativa del “ct” para SREBP-2

<b>No.</b>	<b>Muestra</b>	<b>Ct ciclofilina</b>	<b>Ct SREBP-2</b>	<b>Expresión Génica</b>	<b>Promedio Expresión Génica</b>
30	C45-3	21.09	26.65	2.8	
31	C45-4	20.6	26.5	2.2	
32	C45-5	20.08	26.52	1.5	
33	C45-6	20.62	27.45	1.2	
34	C45-8	20.7	28.12	0.8	
					1.6
35	S45-1	20.15	27.09	1.1	
36	S45-2	20.14	26.84	1.3	
37	S45-3	20.25	27.1	1.1	
38	S45-4	20.28	26.64	1.6	
39	S45-5	20.21	27.09	1.1	
40	S45-6	20.32	26.89	1.4	
41	S45-7	20.32	26.48	1.8	
42	S45-8	20.77	26.64	2.2	
					1.5

**Tabla A.I.10 Resultados expresión génica por medio de la técnica comparativa del “ct” para HMG-CoA reductasa**

<b>No.</b>	<b>Muestra</b>	<b>Ct ciclofilina</b>	<b>Ct HMGR</b>	<b>Expresión Génica</b>	<b>Promedio Expresión Génica</b>
1	C20-2	20.21	27.43	0.9	
2	C20-3	19.83	26.47	1.3	
3	C20-4	19.7	26.9	0.9	
4	C20-7	19.85	27.32	0.7	
5	C20-8	20.03	26.67	1.3	
					1.0
6	S20-1	19.52	26.42	1.1	
7	S20-2	19.73	26.77	1.0	
8	S20-3	20.31	27.92	0.7	
9	S20-4	20.13	27.21	1.0	
10	S20-5	19.73	26.53	1.2	
11	S20-6	19.62	26.79	0.9	
12	S20-8	19.58	27.03	0.7	
					0.9
13	C30-1	21.19	27.13	2.1	
14	C30-2	20.68	26.65	2.1	
15	C30-3	21.16	27.7	1.4	
16	C30-4	20.66	27.13	1.5	
17	C30-5	20.34	27.04	1.3	
18	C30-7	21.04	27.54	1.4	
19	C30-8	20.86	27.71	1.1	
					1.6
20	S30-1	20.69	26.28	2.7	
21	S30-2	20.7	26.48	2.4	
22	S30-3	20.6	26.51	2.2	
23	S30-4	20.44	26.89	1.5	
24	S30-5	20.34	27.29	1.1	
25	S30-6	20.78	27.09	1.7	
26	S30-7	20.63	27.49	1.1	
27	S30-8	19.47	26.29	1.2	
					1.7
28	C45-1	20.68	27.16	1.5	
29	C45-2	20.66	27.45	1.2	



Tabla A.I.10 Resultados expresión génica por medio de la técnica comparativa del “ct” para HMG-CoA reductasa

<b>No.</b>	<b>Muestra</b>	<b>Ct ciclofilina</b>	<b>Ct HMGR</b>	<b>Expresión Génica</b>	<b>Promedio Expresión Génica</b>
30	C45-3	21.09	26.65	2.8	
31	C45-4	20.6	26.5	2.2	
32	C45-5	20.08	26.52	1.5	
33	C45-6	20.62	27.45	1.2	
34	C45-8	20.7	28.12	0.8	
					1.6
35	S45-1	20.15	27.09	1.1	
36	S45-2	20.14	26.84	1.3	
37	S45-3	20.25	27.1	1.1	
38	S45-4	20.28	26.64	1.6	
39	S45-5	20.21	27.09	1.1	
40	S45-6	20.32	26.89	1.4	
41	S45-7	20.32	26.48	1.8	
42	S45-8	20.77	26.64	2.2	
					1.5

**Tabla A.I.11 Resultados expresión génica por medio de la técnica comparativa del “ct” para CPT-1**

	<b>Muestra</b>	<b>Ct ciclofilina</b>	<b>Ct CPT-1</b>	<b>Expresión génica</b>	<b>Promedio Expresión Génica</b>
1	C20-2	21.22	24.72	0.9	
2	C20-4	21.66	24.37	1.5	
3	C20-5	20.99	24.87	0.7	
4	C20-8	20.94	24.2	1.1	
					1.0
5	S20-1	21.1	24.07	1.3	
6	S20-2	20.54	24.69	0.6	
7	S20-4	21.39	24.22	1.4	
8	S20-5	21.25	23.8	1.7	
9	S20-6	21.7	24.34	1.6	
					1.3
10	C30-1	22.41	25.01	1.7	
11	C30-2	20.38	24.38	0.6	
12	C30-3	22.27	24.83	1.7	
13	C30-4	21.08	24.78	0.8	
14	C30-5	23.21	24.51	4.1	
15	C30-7	22.53	24.67	2.3	
					1.9
16	S30-1	21.38	24.06	1.6	
17	S30-4	20.45	23.97	0.9	
18	S30-5	21.05	24.42	1.0	
19	S30-6	21.38	23.45	2.4	
20	S30-7	21.86	24.19	2.0	
21	S30-8	21.17	23.7	1.8	
					1.6
22	C45-1	21.7	24.35	1.6	
23	C45-2	21.9	24.4	1.8	
24	C45-3	21.54	24.26	1.5	
25	C45-4	22.28	24.17	2.7	
26	C45-6	21.62	24.42	1.5	
27	C45-8	22.19	24.2	2.5	
					1.9
28	S45-1	21.17	24.35	1.1	
29	S45-2	21.26	23.59	2.0	
30	S45-3	20.58	24.13	0.9	
31	S45-4	20.96	23.54	1.7	
32	S45-5	21.23	24.73	0.9	

Tabla A.I.11 Resultados expresión génica por medio de la técnica comparativa del “ct” para CPT-1

	<b>Muestra</b>	<b>Ct ciclofilina</b>	<b>Ct CPT-1</b>	<b>Expresión génica</b>	<b>Promedio Expresión Génica</b>
33	S45-6	20.87	24.07	1.1	
34	S45-7	20.7	24.44	0.8	
35	S45-8	21.07	23.7	1.6	
					1.3

**Tabla A.I.12 Resultados expresión génica por medio de la técnica comparativa del “ct” para TNF- $\alpha$**

No.	Muestra	Ct ciclofilina	Ct TNF-alfa	Expresión Génica	Promedio Expresión Génica
1	C20-2	20.21	31.61	1.0	
2	C20-4	19.7	31.65	0.7	
3	C20-7	19.85	30.35	1.9	
4	C20-8	20.03	32.02	0.7	
					1.1
5	S20-1	19.52	30.61	1.3	
6	S20-3	20.31	32.25	0.7	
7	S20-4	20.13	31.79	0.9	
8	S20-5	19.73	31.36	0.9	
9	S20-6	19.62	31.11	1.0	
10	S20-8	19.58	31.14	0.9	
					0.9
11	C30-1	21.19	30.82	3.6	
12	C30-3	21.16	31.39	2.3	
13	C30-4	20.66	30.62	2.8	
14	C30-5	20.34	31.31	1.4	
15	C30-7	21.04	31.22	2.4	
16	C30-8	20.86	30.35	3.9	
					2.7
17	S30-1	20.69	30.66	2.8	
18	S30-2	20.7	30.24	3.8	
19	S30-3	20.6	30.22	3.6	
20	S30-4	20.44	29.89	4.0	
21	S30-5	20.34	30.47	2.5	
22	S30-6	21.76	31.36	3.6	
23	S30-7	20.63	30.75	2.5	
24	S30-8	19.47	29.42	2.8	
					3.2
25	C45-1	20.68	31.05	2.1	
26	C45-2	20.66	30.24	3.7	
27	C45-3	21.09	30.1	5.5	
28	C45-4	20.6	30.59	2.8	
29	C45-5	20.08	30.11	2.7	
30	C45-6	20.62	29.56	5.7	

Tabla A.I.12 Resultados expresión génica por medio de la técnica comparativa del “ct” para TNF- $\alpha$

<b>No.</b>	<b>Muestra</b>	<b>Ct ciclofilina</b>	<b>Ct TNF-alfa</b>	<b>Expresión Génica</b>	<b>Promedio Expresión Génica</b>
31	C45-8	20.7	30.97	2.3	
					3.5
32	S45-1	20.15	31.08	1.4	
33	S45-2	20.14	29.84	3.4	
34	S45-3	20.25	30.9	1.8	
35	S45-4	20.28	30.24	2.8	
36	S45-5	20.21	31.08	1.5	
37	S45-6	20.32	30.12	3.2	
38	S45-7	20.32	29.96	3.5	
39	S45-8	20.77	31.19	2.1	
					2.5

**Tabla A.I.13 Resultados expresión génica por medio de la técnica comparativa del “ct” para IL 6**

<b>No.</b>	<b>Muestra</b>	<b>Ct Ciclofilina</b>	<b>Ct IL 6</b>	<b>Expresión Génica</b>	<b>Promedio Expresión Génica</b>
1	C20-2	17.49	31.89	0.9	
2	C20-3	18.38	30.42	4.5	
3	C20-4	18.25	32.83	0.8	
4	C20-5	18.41	33.21	0.7	
5	C20-7	17.48	32.25	0.7	
6	C20-8	17.48	32.13	0.7	
					1.4
7	S20-1	18.52	33.35	0.6	
8	S20-2	18.15	33.5	0.5	
9	S20-3	17.52	32.83	0.5	
10	S20-4	17.13	33.14	0.3	
11	S20-5	18.22	33.79	0.4	
12	S20-6	18.75	33.21	0.8	
13	S20-8	18.53	33.11	0.8	
					0.6
14	C30-1	17.45	30.84	1.8	
15	C30-2	17.82	30.98	2.1	
16	C30-3	18.13	31.97	1.3	
17	C30-4	18.36	31.94	1.5	
18	C30-5	18.53	32.43	1.2	
19	C30-7	18.09	32.23	1.0	
20	C30-8	18.08	31.56	1.7	
					1.5
21	S30-1	18.27	32.77	0.8	
22	S30-2	17.61	32.03	0.9	
23	S30-3	17.59	31.1	1.6	
24	S30-4	19.12	33.29	1.0	
25	S30-5	18.74	33.52	0.7	
26	S30-6	18.93	32.45	1.6	
27	S30-7	17.67	31.71	1.1	
28	S30-8	17.33	30.88	1.6	
					1.2
29	C45-1	18.6	32.1	1.6	
30	C45-2	17.97	32.67	0.7	

Tabla A.I.13 Resultados expresión génica por medio de la técnica comparativa del “ct” para IL 6

<b>No.</b>	<b>Muestra</b>	<b>Ct Ciclofilina</b>	<b>Ct IL 6</b>	<b>Expresión Génica</b>	<b>Promedio Expresión Génica</b>
31	C45-3	17.69	32.09	0.9	
32	C45-4	17.31	30.3	2.3	
33	C45-6	18.66	31.82	2.1	
34	C45-8	17.94	31.54	1.5	
					1.5
35	S45-1	17.83	31.11	1.9	
36	S45-2	18.92	33.08	1.0	
37	S45-3	18.36	31.74	1.8	
38	S45-4	18.08	32.06	1.2	
39	S45-5	17.14	31.62	0.8	
40	S45-6	18.65	33	0.9	
41	S45-7	17.75	31.3	1.6	
42	S45-8	19.1	32.5	1.7	
					1.4

**Tabla A.I.14 Resultados expresión génica por medio de la técnica comparativa del “ct” para TGF- $\beta$**

No.	Muestra	Ct Ciclofilina	Ct TGF- $\beta$	Expresión Génica	Promedio Expresión Génica
1	C20-2	22.06	25.22	0.8	
2	C20-3	21.58	23.52	1.9	
3	C20-4	21.31	24.55	0.8	
4	C20-5	21.48	24.3	1.0	
5	C20-7	21.82	25.12	0.7	
6	C20-8	21.93	24.54	1.2	
					1.1
7	S20-1	21.61	24.08	1.3	
8	S20-2	21.54	24.44	1.0	
9	S20-3	21.5	25.08	0.6	
10	S20-4	22.25	24.8	1.2	
11	S20-5	21.69	25.06	0.7	
12	S20-6	22.24	24.46	1.5	
13	S20-8	21.72	24.72	0.9	
					1.0
14	C30-1	21.43	24.5	0.9	
15	C30-2	22.14	23.92	2.1	
16	C30-3	22.25	24.62	1.4	
17	C30-4	21.22	24.28	0.9	
18	C30-5	21.52	24.94	0.7	
19	C30-7	21.84	24.69	1.0	
20	C30-8	22.23	24.58	1.4	
					1.2
21	S30-1	21.46	24.86	0.7	
22	S30-2	21.45	24.14	1.1	
23	S30-3	22.2	24.72	1.3	
24	S30-4	21.26	24.57	0.7	
25	S30-5	21.35	24.15	1.0	
26	S30-6	21.76	24.71	0.9	
27	S30-7	22.09	24.58	1.3	
28	S30-8	20.98	23.57	1.2	
					1.0
29	C45-1	22.21	24.83	1.2	
30	C45-2	22.05	24.41	1.4	



Tabla A.I.14 Resultados expresión génica por medio de la técnica comparativa del “ct” para TGF- $\beta$

<b>No.</b>	<b>Muestra</b>	<b>Ct Ciclofilina</b>	<b>Ct TGF-<math>\beta</math></b>	<b>Expresión Génica</b>	<b>Promedio Expresión Génica</b>
31	C45-3	21.7	24.29	1.2	
32	C45-4	21.43	23.98	1.2	
33	C45-5	21.29	23.6	1.4	
34	C45-6	21.5	23.72	1.5	
35	C45-8	21.92	24.08	1.6	
					1.4
36	S45-1	21.31	24.77	0.7	
37	S45-2	21.35	23.91	1.2	
38	S45-3	21.57	24.12	1.2	
39	S45-4	21.23	24.13	1.0	
40	S45-5	21.85	25.05	0.8	
41	S45-6	21.13	24.11	0.9	
42	S45-7	21.34	24.08	1.1	
43	S45-8	21.71	24.42	1.1	
					1.0

**Tabla A.I.15 Resultados expresión génica por medio de la técnica comparativa del “ct” para Colágena Tipo IV**

<b>No.</b>	<b>Muestra</b>	<b>Ct ciclofilina</b>	<b>Ct COL IV</b>	<b>Expresión Génica</b>	<b>Promedio Expresión Génica</b>
1	C20-2	20.21	24.78	1.0	
2	C20-3	19.83	26.04	0.3	
3	C20-4	19.7	23.66	1.6	
4	C20-7	19.85	24.05	1.3	
5	C20-8	20.03	24.17	1.4	
6					1.1
	S20-1	19.52	23.97	1.1	
7	S20-2	19.73	24.35	1.0	
8	S20-3	20.31	26.14	0.4	
9	S20-4	20.13	24.8	1.0	
10	S20-5	19.73	24.09	1.2	
11	S20-6	19.62	23.95	1.2	
12	S20-8	19.58	24.36	0.9	
13					1.0
	C30-1	21.19	24.58	2.3	
14	C30-2	20.68	23.89	2.7	
15	C30-3	21.16	25.11	1.6	
16	C30-4	20.66	25.02	1.2	
17	C30-5	20.34	25.77	0.6	
18	C30-7	21.04	24	3.2	
19	C30-8	20.86	24.35	2.2	
20					2.0
	S30-1	20.69	23.99	2.5	
21	S30-2	20.7	24.99	1.3	
22	S30-3	20.6	23.7	2.9	
23	S30-4	20.44	24.31	1.7	
24	S30-5	20.34	24.34	1.5	
25	S30-6	20.78	24.21	2.3	
26	S30-7	20.63	25.05	1.1	
27	S30-8	19.47	24.38	0.8	
28					1.8
	C45-1	20.68	25.15	1.1	
29	C45-2	20.66	24.4	1.8	

Tabla A.I.15 Resultados expresión génica por medio de la técnica comparativa del “ct” para Colágena Tipo IV

<b>No.</b>	<b>Muestra</b>	<b>Ct ciclofilina</b>	<b>Ct COL IV</b>	<b>Expresión Génica</b>	<b>Promedio Expresión Génica</b>
30	C45-3	21.09	24.27	2.7	
31	C45-4	20.6	24.14	2.1	
33	C45-5	20.08	24.5	1.1	
34	C45-6	20.62	24.72	1.4	
35	C45-8	20.7	24.81	1.4	
					1.7
36	S45-1	20.15	25.04	0.8	
37	S45-2	20.14	24.19	1.5	
38	S45-3	20.25	24.09	1.7	
39	S45-4	20.28	24.14	1.7	
40	S45-5	20.21	24.19	1.6	
41	S45-6	20.32	24.67	1.2	
42	S45-7	20.32	25.19	0.8	
43	S45-8	20.77	24.14	2.4	
					1.5

**Tabla A.I.16 Resultados expresión génica por medio de la técnica comparativa del “ct” para Podocina**

<b>No.</b>	<b>Muestra</b>	<b>Ct Ciclofilina</b>	<b>Ct Podocina</b>	<b>Expresión Génica</b>	<b>Promedio Expresión Génica</b>
1	C20-2	20.09	24.63	1.1	
2	C20-3	19.1	24.9	0.5	
3	C20-4	19.66	24.34	1.0	
4	C20-5	19.8	24.25	1.2	
5	C20-7	20.14	24.32	1.5	
6	C20-8	18.58	23.37	1.0	
					1.1
7	S20-1	18.63	23.8	0.7	
8	S20-2	20.06	24.17	1.5	
9	S20-3	19.84	24.57	1.0	
10	S20-4	19.45	23.91	1.2	
11	S20-5	19.4	23.6	1.5	
12	S20-6	20.32	24.33	1.7	
13	S20-8	20.01	24.04	1.6	
					1.3
14	C30-1	20.17	23.96	1.9	
15	C30-2	19.88	23.88	1.7	
16	C30-3	20.62	25.67	0.8	
17	C30-4	19.58	24.41	0.9	
18	C30-5	20.25	23.45	2.9	
19	C30-7	20.22	23.95	2.0	
20	C30-8	20.41	24.55	1.5	
					1.7
21	S30-1	19.5	23.61	1.5	
22	S30-2	19.88	25.07	0.7	
23	S30-3	19.97	24.54	1.1	
24	S30-4	19.76	23.6	1.9	
25	S30-5	20.03	23.78	2.0	
26	S30-6	18.79	22.95	1.5	
27	S30-7	19.63	24.34	1.0	
28	S30-8	19.04	23.16	1.5	
					1.4
29	C45-1	20.28	24.39	1.5	
30	C45-2	20.4	24.84	1.2	

Tabla A.I.16 Resultados expresión génica por medio de la técnica comparativa del “ct” para Podocina

<b>No.</b>	<b>Muestra</b>	<b>Ct Ciclofilina</b>	<b>Ct Podocina</b>	<b>Expresión Génica</b>	<b>Promedio Expresión Génica</b>
31	C45-3	19.97	24.06	1.6	
32	C45-4	20.34	24.74	1.3	
33	C45-6	20.33	24.58	1.4	
34	C45-8	19.66	23.88	1.4	
					1.4
35	S45-1	20.17	23.85	2.1	
36	S45-2	20.18	23.35	3.0	
37	S45-3	19.49	23.33	1.9	
38	S45-4	20	23.77	2.0	
39	S45-5	19.16	23.2	1.6	
40	S45-6	20.21	24.17	1.7	
41	S45-7	19.89	24.03	1.5	
42	S45-8	19.84	23.15	2.7	
					2.1

**Tabla A.I.17 Resultados expresión génica por medio de la técnica comparativa del “ct” para Nefrina**

<b>No.</b>	<b>Muestra</b>	<b>Ct Ciclofilina</b>	<b>Ct Nefrina</b>	<b>Expresión Génica</b>	<b>Promedio Expresión Génica</b>
1	C20-2	20.09	27.81	2.2	
2	C20-3	19.1	29.27	0.4	
3	C20-4	19.66	28.25	1.2	
4	C20-5	19.8	28.76	0.9	
5	C20-7	20.14	28.83	1.1	
6	C20-8	18.58	27.42	1.0	
					1.1
7	S20-1	18.63	27.99	0.7	
8	S20-2	20.06	28.61	1.2	
9	S20-3	19.84	29.22	0.7	
10	S20-4	19.45	28.2	1.1	
11	S20-5	19.4	27.79	1.4	
12	S20-6	20.32	28.11	2.1	
13	S20-8	20.01	28.82	1.0	
					1.2
14	C30-1	20.17	28.31	1.6	
15	C30-2	19.88	27.59	2.2	
16	C30-3	20.62	29.19	1.2	
17	C30-4	19.58	29.08	0.6	
18	C30-5	20.25	28.38	1.6	
19	C30-7	20.22	27.94	2.2	
20	C30-8	20.41	28.82	1.3	
					1.5
21	S30-1	19.5	27.34	2.0	
22	S30-2	19.88	28.74	1.0	
23	S30-3	19.97	28.41	1.3	
24	S30-4	19.76	27.69	1.9	
25	S30-5	20.03	27.61	2.4	
26	S30-6	18.79	26.29	2.5	
27	S30-7	19.63	27.65	1.8	
28	S30-8	19.04	28.35	0.7	
					1.7
29	C45-1	20.28	28.43	1.6	
30	C45-2	20.4	28.21	2.0	

Tabla A.I.17 Resultados expresión génica por medio de la técnica comparativa del “ct” para Nefrina

<b>No.</b>	<b>Muestra</b>	<b>Ct Ciclofilina</b>	<b>Ct Nefrina</b>	<b>Expresión Génica</b>	<b>Promedio Expresión Génica</b>
31	C45-3	19.97	27.64	2.2	
32	C45-4	20.34	27.37	3.5	
33	C45-6	20.33	27.81	2.5	
34	C45-8	19.66	28.37	1.1	
					2.2
35	S45-1	20.17	27.57	2.7	
36	S45-2	20.18	27.16	3.6	
37	S45-3	19.49	27.76	1.5	
38	S45-4	20	27.29	2.9	
39	S45-5	19.16	26.53	2.7	
40	S45-6	20.21	27.76	2.4	
41	S45-7	19.89	28.11	1.5	
42	S45-8	19.84	26.52	4.4	
					2.7

**Tabla A.I.18 Resultados colesterol total en tejido renal**

	<b>Abs prom. (nm)</b>	<b>Colesterol (mg/dL)</b>	<b>Peso riñón</b>	<b>colesterol/ g riñón</b>	<b>colesterol mg/riñón</b>
C20-2	0.4449	259.1	0.133	1.95	2.53
C20-3	0.5477	319.0	0.118	2.70	4.00
C20-4	0.0124	7.2	0.1	*0.07	0.10
C20-5	0.7107	413.9	0.135	*3.07	
C20-7	0.37495	218.4	0.154	1.42	2.03
C20-8	0.38535	224.4	0.158	1.42	1.97
TOTAL				1.87	
S20-2	0.16715	97.4	0.07	1.39	1.77
S20-3	0.46435	270.4	0.167	1.62	2.43
S20-4	0.46525	271.0	0.167	1.62	2.32
S20-5	0.38225	222.6	0.136	1.64	
S20-6	0.1303	75.9	0.05	1.52	
S20-8	0.3584	208.7	0.097	*2.15	2.69
TOTAL				1.56	
C30-1	0.2081	121.2	0.144	*0.84	1.47
C30-2	0.1823	106.2	0.04	2.65	
C30-3	0.43755	254.8	0.1928	1.32	2.01
C30-4	0.7023	409.0	0.1343	3.05	4.72
C30-5	0.1946	113.3	0.1363	*0.83	1.22
C30-7	0.7747	451.2	0.218	2.07	3.29
C30-8	0.3772	219.7	0.1348	1.63	3.21
TOTAL				2.14	
S30-2	-0.0154	-9.0	0.1065	*-0.08	-0.13
S30-4	0.1731	100.8	0.1248	*0.81	1.45
S30-5	0.3925	228.6	0.1424	1.61	2.25
S30-6	0.4645	270.5	0.1476	1.83	2.13
S30-7	0.7085	412.6	0.147	2.81	3.34
S30-8	0.83565	486.7	0.187	2.60	3.10
TOTAL				2.21	
C45-1	0.5946	346.3	0.193	1.79	
C45-2	0.52385	305.1	0.153	1.99	0.76



Tabla A.I.18 Resultados colesterol total en tejido renal

	<b>Abs prom. (nm)</b>	<b>Colesterol (mg/dL)</b>	<b>Peso riñón</b>	<b>colesterol/ g riñón</b>	<b>colesterol mg/riñón</b>
C45-3	0.4775	278.1	0.165	1.69	2.12
C45-4	0.3728	217.1	0.153	*1.42	2.34
C45-5	0.594	346.0	0.153	2.26	4.09
C45-6	0.31915	185.9	0.154	*1.21	2.96
C45-7	0.4603	268.1	0.174	*1.54	2.68
C45-8	0.74265	432.5	0.131	3.30	5.08
TOTAL				2.31	
S45-1	0.5422	315.8	0.146	2.16	2.86
S45-2	0.55105	320.9	0.144	2.23	3.08
S45-3	0.58595	341.3	0.16	2.13	3.20
S45-4	0.7156	416.8	0.173	2.41	3.40
S45-5	0.53095	309.2	0.156	*1.98	3.01
S45-6	0.38575	224.7	0.122	*1.84	3.20
S45-7	0.5213	303.6	0.159	*1.91	
S45-8	0.74415	433.4	0.182	2.38	3.26
TOTAL				2.26	

**Tabla A.I.19 Resultados triglicéridos totales en tejido renal**

	<b>Lectura PROMEDIO</b>	<b>Triglicéridos (mg/dL)</b>	<b>Peso del riñón</b>	<b>Triglicéridos (mg/dL / g riñón)</b>	<b>Triglicéridos (mg/riñón)</b>
C20-2	0.82355	510.1	0.133	3.84	4.99
C20-3	0.8469	524.6	0.118	4.45	6.58
C20-4	0.1648	102.1	0.1	1.02	1.38
C20-5	0.79135	490.2	0.135	3.63	
C20-7	0.8233	509.9	0.154	3.31	4.74
C20-8	1.01875	631.0	0.158	3.99	5.55
TOTAL	0	543.9		3.84	
S20-2	0.4195	259.8	0.07	3.71	4.71
S20-3	0.71875	445.2	0.167	2.67	4.00
S20-4	2.672	1655.0	0.167	9.91	14.17
S20-5	0.9042	560.0	0.136	4.12	
S20-6	0.39785	246.4	0.05	4.93	
S20-8	0.56645	350.9	0.097	3.62	4.52
TOTAL		372.5		3.53	
C30-1	0.98975	662.0	0.144	4.60	8.05
C30-2	1.33595	893.6	0.04	22.34	
C30-3	1.6074	1075.2	0.1928	5.58	8.48
C30-4	1.7412	1164.7	0.1343	8.67	13.44
C30-5	0.9033	604.2	0.1363	4.43	6.52
C30-7	0.44935	300.6	0.218	1.38	2.19
C30-8	0.465	311.0	0.1348	2.31	4.55
TOTAL		686.3		4.49	
S30-2	0.01305	44.6	0.1065	0.42	0.65
S30-4	0.03735	127.6	0.1248	1.02	1.83
S30-5	0.11365	388.1	0.1424	2.73	3.82
S30-6	0.08675	296.3	0.1476	2.01	2.33
S30-7	0.7907	2700.5	0.147	18.37	21.86
S30-8	0.43655	1490.9	0.187	7.97	9.49
TOTAL				3.43	

Tabla A.I.19 Resultados triglicéridos totales en tejido renal

	<b>Lectura PROMEDIO</b>	<b>Triglicéridos (mg/dL)</b>	<b>Peso del riñón</b>	<b>Triglicéridos (mg/dL / g riñón)</b>	<b>Triglicéridos (mg/riñón)</b>
C45-1	0.09305	317.8	0.193	1.65	
C45-2	0.0851	290.6	0.153	1.90	0.76
C45-3	0.1502	513.0	0.165	3.11	3.92
C45-4	0.15075	514.9	0.153	3.37	5.55
C45-5					
C45-6	0.34585	1181.2	0.154	7.67	18.79
C45-7	0.3662	1250.7	0.174	7.19	12.51
C45-8	0.41525	1418.2	0.131	10.83	16.67
TOTAL				5.10	
S45-1	0.47565	1624.5	0.146	11.13	14.69
S45-2	0.6958	2376.4	0.144	16.50	22.77
S45-3	0.0542	185.1	0.16	1.16	1.74
S45-4	0.33465	1142.9	0.173	6.61	9.32
S45-5	0.16065	548.7	0.156	3.52	5.35
S45-6	0.1212	413.9	0.122	3.39	5.90
S45-7					
S45-8	0.10175	347.5	0.182	1.91	2.62
TOTAL				3.32	

**Tabla A.I.20 Resultados mg/dL de creatinina en suero**

<b>RATA</b>	<b>Creatinina en suero (mg/dL)</b>	<b>Creatinina en suero (mmol/L)</b>
C20-4	0.82	72.5
C20-5	0.71	62.8
C20-7	0.76	67.2
C20-8	0.82	72.5
PROMEDIO	0.78	68.7
S20-1	0.94	83.1
S20-2	0.61	53.9
S20-4	0.47	41.5
S20-6	0.69	61.0
PROMEDIO	0.68	59.9
C30-1	0.88	77.8
C30-2	0.95	84.0
C30-3	1.04	91.9
C30-5	0.64	56.6
C30-6	1.08	95.5
C30-7	0.69	61.0
C30-8	0.60	53.0
PROMEDIO	0.84	74.3
S30-1	0.55	48.6
S30-2	0.78	69.0
S30-3	0.45	39.8
S30-4	0.47	41.5
S30-5	0.59	52.2
S30-6	0.73	64.5
S30-7	0.69	61.0
S30-8	0.42	37.1
PROMEDIO	0.70	61.7
C45-1	0.89	78.7
C45-2	0.75	66.3
C45-3	0.89	78.7
C45-4	0.72	63.6
C45-5	0.83	73.4
C45-6	0.87	76.9
C45-7	0.69	61.0
C45-8		
PROMEDIO	0.83	72.9

Tabla A.I.20 Resultados mg/dL de creatinina en suero

<b>RATA</b>	<b>Creatinina en suero (mg/dL)</b>	<b>Creatinina en suero (mmol/L)</b>
S45-1	0.49	43.3
S45-2	0.78	69.0
S45-3	0.75	66.3
S45-4	0.78	69.0
S45-5	1.02	90.2
S45-6	0.73	64.5
S45-7	0.60	53.0
<b>PROMEDIO</b>	<b>0.81</b>	<b>71.8</b>

**Tabla A.I.21 Resultados mg/dL de depuración de creatinina**

RATA	Vol. Orina 12 h	Vol. Orina 24 h	Flujo urinario (mL/min)	Creat. orina	Creat. suero	Depuración (mg/dL)		Prom.
C20-2	6.70	13.40	0.01	27.10				
C20-3	2.70	5.40	0.00	32.60				
C20-4	5.40	10.80	0.01	53.10				
C20-5	3.40	6.80	0.00	52.80	0.82	0.30		
C20-7	2.70	5.40	0.00	75.30	0.71	0.40	0.43	
C20-8	3.70	7.40	0.01	56.70	0.76	0.38	0.45	
PROMEDIO	4.10	8.20	0.01	49.60	0.76	0.36	0.44	0.44
S20-1	10.40	20.80	0.01	10.60				
S20-2	10.60	21.20	0.01	11.40	0.94	0.18	0.36	
S20-4	4.00	8.00	0.01		0.61			
S20-5	3.20	6.40	0.00	48.10	0.47	1.09	0.84	
S20-6	7.70	15.40	0.01	34.80				
S20-8	3.80	7.60	0.01	68.00	0.69			
PROMEDIO	6.62	13.23	0.01	34.58	0.68	0.48	0.57	0.60
C30-1	11.60	23.20	0.02	22.90	0.88	0.42	0.58	
C30-2	7.70	15.40	0.01	36.30	0.95	0.41		
C30-3	5.40	10.80	0.01	32.60	1.04	0.24	0.38	
C30-5	7.90	15.80	0.01	32.90	0.64	0.56	0.62	
C30-6	4.80	9.60	0.01	39.20	1.08	0.24	0.29	
C30-7	9.40	18.80	0.01	35.20	0.69	0.67	0.61	
C30-8	8.60	17.20	0.01	28.90	0.60	0.58		
PROMEDIO	7.91	15.83	0.01	32.57	0.84	0.43	0.49	0.49
S30-1	6.90	13.80	0.01	33.40	0.55	0.58	0.69	
S30-2	13.00	26.00	0.02	25.08	0.78	0.58	0.70	
S30-3	13.00	26.00	0.02	16.84	0.45	0.68	0.85	
S30-4	10.00	20.00	0.01	24.40	0.47	0.72		
S30-5	3.70	7.40	0.01		0.59			
S30-6	7.60	15.20	0.01	29.20	0.73	0.42		
S30-7	7.00	14.00	0.01	19.10	0.69	0.27	0.35	
S30-8	6.40	12.80	0.01	24.40	0.42	0.52		
PROMEDIO	8.45	16.90	0.01		0.59	0.54	0.61	0.65

Tabla A.I.21 Resultados mg/dL de depuración de creatinina

RATA	Vol. Orina 12 h	Vol. Orina 24 h	Flujo urinario (mL/min)	Creat. orina	Creat. suero	Depuración (mg/dL)		Prom.
C45-1	19.00	38.00	0.03	25.00	0.60	1.10		
C45-1	19.00	38.00	0.03	25.00	0.60	1.10		
C45-2	16.00	32.00	0.02	26.50	0.75	0.79		
C45-3	9.40	18.80	0.01	20.35	0.89	0.30		
C45-4	25.00	50.00	0.03	9.38	0.72	0.45		
C45-5	7.60	15.20	0.01	22.16	0.63	0.37		
C45-6	13.00	26.00	0.02	13.40	0.87	0.28		
C45-7	9.30	18.60	0.01	20.90	0.69	0.39		
C45-8	21.00	42.00	0.03	12.20				
PROMEDIO	15.04	30.08	0.02	18.74	0.76	0.42	0.45	0.45
S45-1	15.00	30.00	0.02	10.60	0.49	0.45		
S45-2	14.20	28.40	0.02	16.00	0.78	0.40		
S45-3	10.50	21.00	0.01	20.16	0.75	1.51		
S45-4	17.00	34.00	0.02	14.80	0.78	0.45		
S45-5	10.70	21.40	0.01	26.12	1.02	0.38		
S45-6	14.20	28.40	0.02	16.10	0.73	0.43		
S45-7	12.30	24.60	0.02	23.10	0.60			
S45-8	18.00	36.00	0.03					
PROMEDIO	13.99	27.98	0.02	18.13	0.74	0.42	0.43	0.43

**Tabla A.I.22 Resultados porcentaje expansión mesangial**

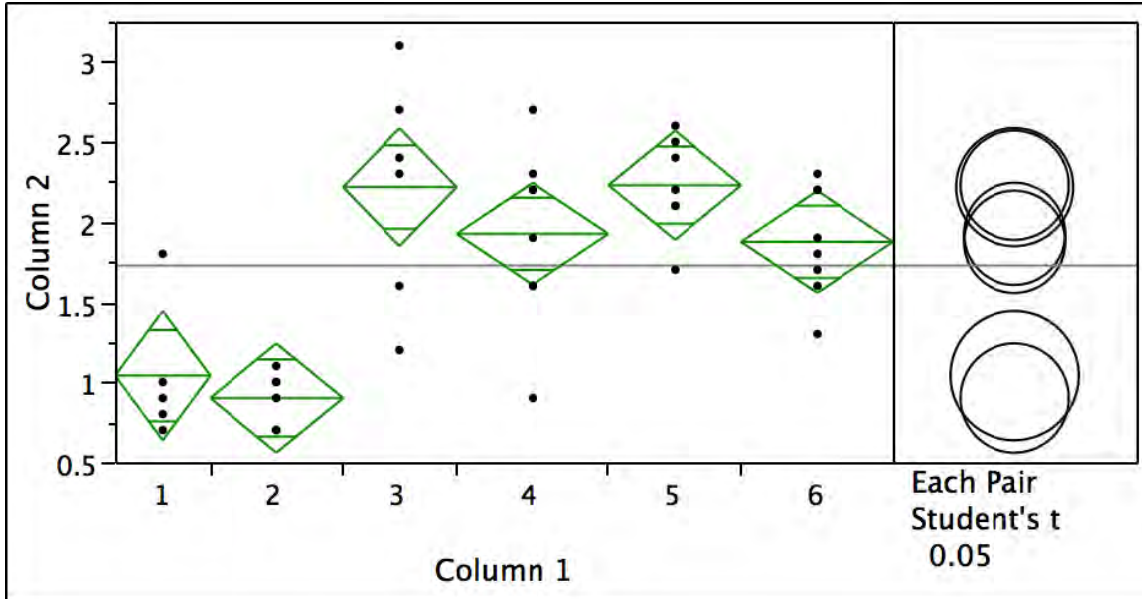
<b>Número</b>	<b>Rata</b>	<b>% Expansión Mesangial</b>	<b>Promedio</b>
1	C20-2	45.45	
2	C20-4	41.63	
3	C20-5	46.16	
4	C20-7	41.27	
5	C20-8	39.56	
			42.82
6	S20-1	30.77	
7	S20-2	32.14	
8	S20-4	32.72	
9	S20-6	35.11	
10	S20-8	32.28	
			32.61
11	C30-1	42.15	
12	C30-3	42.30	
13	C30-4	38.31	
14	C30-5	41.32	
15	C30-7	39.90	
			40.80
16	S30-2	38.89	
17	S30-3	36.25	
18	S30-5	37.22	
19	S30-6	30.37	
20	S30-7	28.92	
			34.33
21	C45-1	53.46	
22	C45-2	55.01	
23	C45-3	53.39	
24	C45-5	53.18	
25	C45-6	52.66	
			53.54
26	C45-1	41.5	
27	C45-2	40.8	
28	C45-4	41.0	
29	C45-6	40.3	
30	C45-8	40.2	
			40.7



## ÁPENDICE II ESTADÍSTICAS

### Estadística A.II.1 Expresión génica por medio de la técnica comparativa del “ct” para SREBP-1

#### Oneway Analysis of Column 2 By Column 1



#### Oneway Anova Summary of Fit

Rsquare	0.610111
Adj Rsquare	0.554413
Root Mean Square Error	0.444799
Mean of Response	1.726829
Observations (or Sum Wgts)	41

#### Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Column 1	5	10.835869	2.16717	10.9538	<.0001
Error	35	6.924619	0.19785		
C. Total	40	17.760488			

Estadística A.II.1 Expresión génica por medio de la técnica comparativa del “ct” para SREBP-1

**Means for Oneway Anova**

Level	Number	Mean	Std Error	Lower 95%	Upper 95%
1	5	1.04000	0.19892	0.6362	1.4438
2	7	0.90000	0.16812	0.5587	1.2413
3	6	2.21667	0.18159	1.8480	2.5853
4	8	1.92500	0.15726	1.6057	2.2443
5	7	2.22857	0.16812	1.8873	2.5699
6	8	1.87500	0.15726	1.5557	2.1943

Std Error uses a pooled estimate of error variance

**Means Comparisons**

Comparisons for each pair using Student's t

t	Alpha
2.03011	0.05

Abs(Dif)-LSD	5	3	4	6	1	2
5	-0.48267	-0.49047	-0.16377	-0.11377	0.65983	0.84590
3	-0.49047	-0.52134	-0.19600	-0.14600	0.62988	0.81429
4	-0.16377	-0.19600	-0.45150	-0.40150	0.37022	0.55766
6	-0.11377	-0.14600	-0.40150	-0.45150	0.32022	0.50766
1	0.65983	0.62988	0.37022	0.32022	-0.57110	-0.38874
2	0.84590	0.81429	0.55766	0.50766	-0.38874	-0.48267

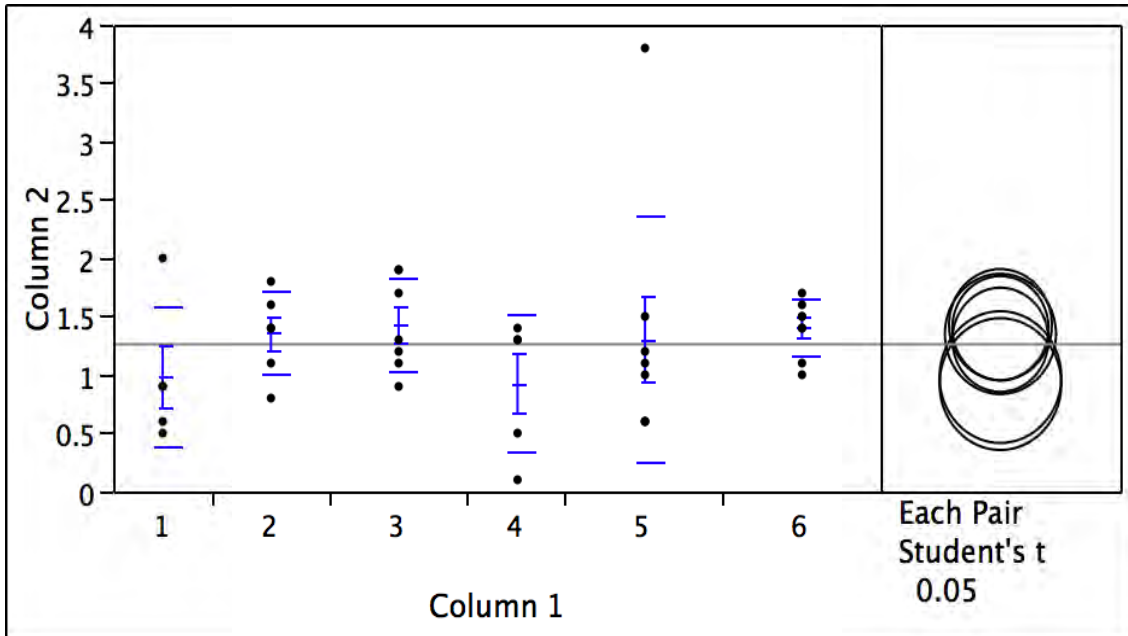
Positive values show pairs of means that are significantly different.

Level		Mean
5	A	2.2285714
3	A	2.2166667
4	A	1.9250000
6	A	1.8750000
1	B	1.0400000
2	B	0.9000000

Levels not connected by same letter are significantly different.

**Estadística A.II.2 Expresión génica por medio de la técnica comparativa del “ct” para FAS**

**Oneway Analysis of Column 2 By Column 1**



**Means and Std Deviations**

Level	Number	Mean	Std Dev	Std Err Mean	Lower 95%	Upper 95%
1	5	0.98000	0.59749	0.26721	0.2381	1.7219
2	6	1.35000	0.35637	0.14549	0.9760	1.7240
3	7	1.42857	0.40297	0.15231	1.0559	1.8013
4	5	0.92000	0.58481	0.26153	0.1939	1.6461
5	8	1.30000	1.06234	0.37559	0.4119	2.1881
6	8	1.40000	0.23905	0.08452	1.2002	1.5998

Estadística A.II.2 Expresión génica por medio de la técnica comparativa del “ct” para FAS

**Means Comparisons**

**Comparisons for each pair using Student's t**

**t**                      **Alpha**  
 2.03452              0.05

Abs(Dif)-LSD	3	6	2	5	1	4
3	-0.67478	-0.62478	-0.62376	-0.52478	-0.29061	-0.23061
6	-0.62478	-0.63120	-0.63177	-0.53120	-0.29968	-0.23968
2	-0.62376	-0.63177	-0.72885	-0.63177	-0.39442	-0.33442
5	-0.52478	-0.53120	-0.63177	-0.63120	-0.39968	-0.33968
1	-0.29061	-0.29968	-0.39442	-0.39968	-0.79841	-0.73841
4	-0.23061	-0.23968	-0.33442	-0.33968	-0.73841	-0.79841

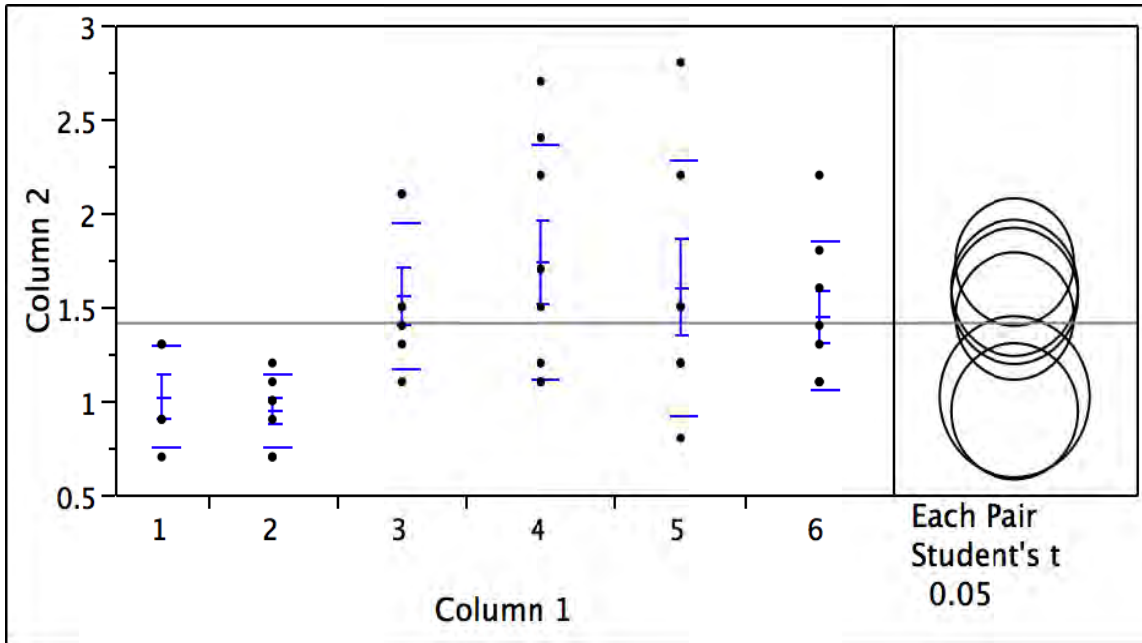
Positive values show pairs of means that are significantly different.

Level		Mean
3	A	1.4285714
6	A	1.4000000
2	A	1.3500000
5	A	1.3000000
1	A	0.9800000
4	A	0.9200000

Levels not connected by same letter are significantly different.

**Estadística A.II.3 Expresión génica por medio de la técnica comparativa del “ct” para SREBP-2**

**Oneway Analysis of Column 2 By Column 1**



**Means and Std Deviations**

Level	Number	Mean	Std Dev	Std Err Mean	Lower 95%	Upper 95%
1	5	1.02000	0.268328	0.12000	0.6868	1.3532
2	7	0.94286	0.190238	0.07190	0.7669	1.1188
3	7	1.55714	0.390969	0.14777	1.1956	1.9187
4	8	1.73750	0.625500	0.22115	1.2146	2.2604
5	7	1.60000	0.680686	0.25728	0.9705	2.2295
6	8	1.45000	0.396412	0.14015	1.1186	1.7814

Estadística A.II.3 Expresión génica por medio de la técnica comparativa del “ct” para SREBP-2

**Means Comparisons**

**Comparisons for each pair using Student's t**

<b>t</b>	<b>Alpha</b>
2.02809	0.05

Abs(Dif)-LSD	4	5	3	6	1	2
4	-0.47925	-0.35857	-0.31571	-0.19175	0.17107	0.29857
5	-0.35857	-0.51234	-0.46948	-0.34607	0.01876	0.14480
3	-0.31571	-0.46948	-0.51234	-0.38893	-0.02410	0.10195
6	-0.19175	-0.34607	-0.38893	-0.47925	-0.11643	0.01107
1	0.17107	0.01876	-0.02410	-0.11643	-0.60621	-0.48410
2	0.29857	0.14480	0.10195	0.01107	-0.48410	-0.51234

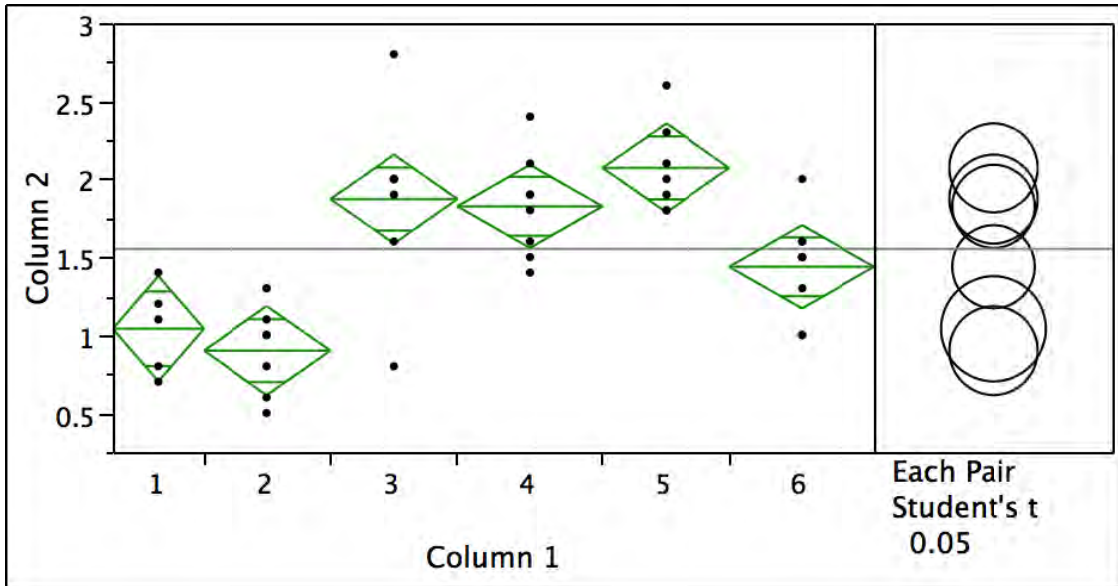
Positive values show pairs of means that are significantly different.

Level			Mean
4	A		1.7375000
5	A		1.6000000
3	A	B	1.5571429
6	A	B	1.4500000
1		B	1.0200000
2		C	0.9428571

Levels not connected by same letter are significantly different.

**Estadística A.II.4 Expresión génica por medio de la técnica comparativa del “ct” para HMG-CoA reductasa**

**Oneway Analysis of Column 2 By Column 1**



**Oneway Anova  
Summary of Fit**

Rsquare	0.603145
Adj Rsquare	0.548027
Root Mean Square Error	0.372466
Mean of Response	1.552381
Observations (or Sum Wgts)	42

**Analysis of Variance**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Column 1	5	7.590440	1.51809	10.9427	<.0001
Error	36	4.994321	0.13873		
C. Total	41	12.584762			

Estadística A.II.4 Expresión génica por medio de la técnica comparativa del “ct” para HMG-CoA reductasa

### Means for Oneway Anova

Level	Number	Mean	Std Error	Lower 95%	Upper 95%
1	5	1.04000	0.16657	0.7022	1.3778
2	7	0.90000	0.14078	0.6145	1.1855
3	7	1.87143	0.14078	1.5859	2.1569
4	8	1.82500	0.13169	1.5579	2.0921
5	7	2.07143	0.14078	1.7859	2.3569
6	8	1.43750	0.13169	1.1704	1.7046

Std Error uses a pooled estimate of error variance

### Means Comparisons

Comparisons for each pair using Student's t

t	Alpha
2.02809	0.05

Abs(Dif)-LSD	5	3	4	6	1	2
5	-0.40378	-0.20378	-0.14453	0.24297	0.58911	0.76765
3	-0.20378	-0.40378	-0.34453	0.04297	0.38911	0.56765
4	-0.14453	-0.34453	-0.37770	0.00980	0.35436	0.53405
6	0.24297	0.04297	0.00980	-0.37770	-0.03314	0.14655
1	0.58911	0.38911	0.35436	-0.03314	-0.47775	-0.30232
2	0.76765	0.56765	0.53405	0.14655	-0.30232	-0.40378

Positive values show pairs of means that are significantly different.

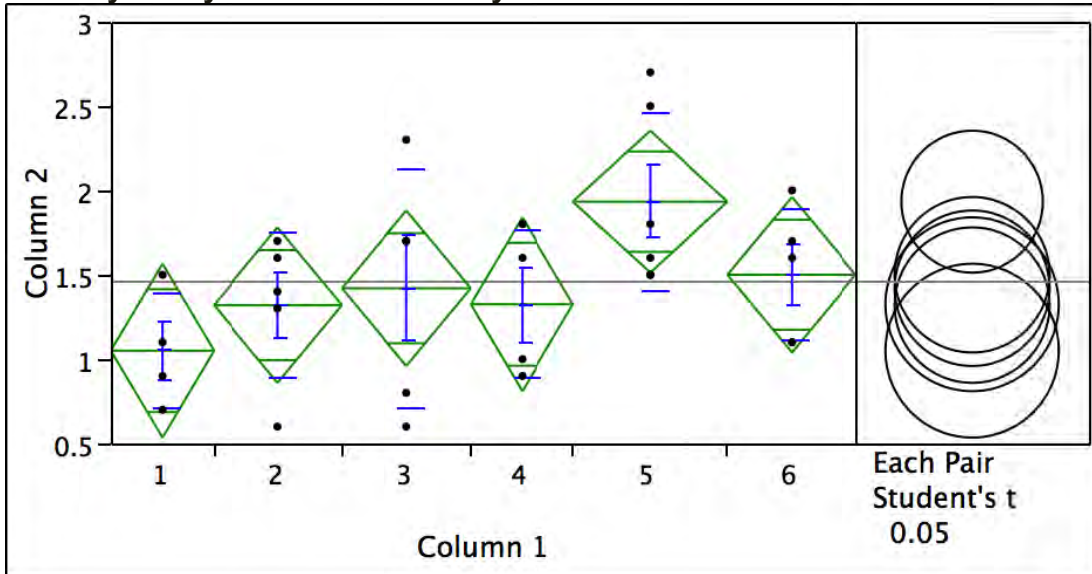
Level			Mean
5	A		2.0714286
3	A		1.8714286
4	A		1.8250000
6		B	1.4375000
1		B C	1.0400000
2		C	0.9000000

Levels not connected by same letter are significantly different.



**Estadística A.II.5 Expresión génica por medio de la técnica comparativa del “ct” para CPT-1**

**Oneway Analysis of Column 2 By Column 1**



**Oneway Anova  
Summary of Fit**

Rsquare	0.278561
Adj Rsquare	0.121726
Root Mean Square Error	0.49812
Mean of Response	1.458621
Observations (or Sum Wgts)	29

**Analysis of Variance**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Column 1	5	2.2035115	0.440702	1.7761	0.1576
Error	23	5.7068333	0.248123		
C. Total	28	7.9103448			

**Means for Oneway Anova**

Level	Number	Mean	Std Error	Lower 95%	Upper 95%
1	4	1.05000	0.24906	0.5348	1.5652
2	5	1.32000	0.22277	0.8592	1.7808
3	5	1.42000	0.22277	0.9592	1.8808
4	4	1.32500	0.24906	0.8098	1.8402
5	6	1.93333	0.20336	1.5127	2.3540
6	5	1.50000	0.22277	1.0392	1.9608

Std Error uses a pooled estimate of error variance

Estadística A.II.5 Expresión génica por medio de la técnica comparativa del “ct” para CPT-1

### Means and Std Deviations

Level	Number	Mean	Std Dev	Std Err Mean	Lower 95%	Upper 95%
1	4	1.05000	0.341565	0.17078	0.5065	1.5935
2	5	1.32000	0.432435	0.19339	0.7831	1.8569
3	5	1.42000	0.704982	0.31528	0.5446	2.2954
4	4	1.32500	0.442531	0.22127	0.6208	2.0292
5	6	1.93333	0.531664	0.21705	1.3754	2.4913
6	5	1.50000	0.393700	0.17607	1.0112	1.9888

### Means Comparisons

Comparisons for each pair using Student's t

t	Alpha
2.06866	0.05

Abs(Dif)-LSD	5	6	3	4	2	1
5	-0.59492	-0.19063	-0.11063	-0.05681	-0.01063	0.21819
6	-0.19063	-0.65171	-0.57171	-0.51624	-0.47171	-0.24124
3	-0.11063	-0.57171	-0.65171	-0.59624	-0.55171	-0.32124
4	-0.05681	-0.51624	-0.59624	-0.72863	-0.68624	-0.45363
2	-0.01063	-0.47171	-0.55171	-0.68624	-0.65171	-0.42124
1	0.21819	-0.24124	-0.32124	-0.45363	-0.42124	-0.72863

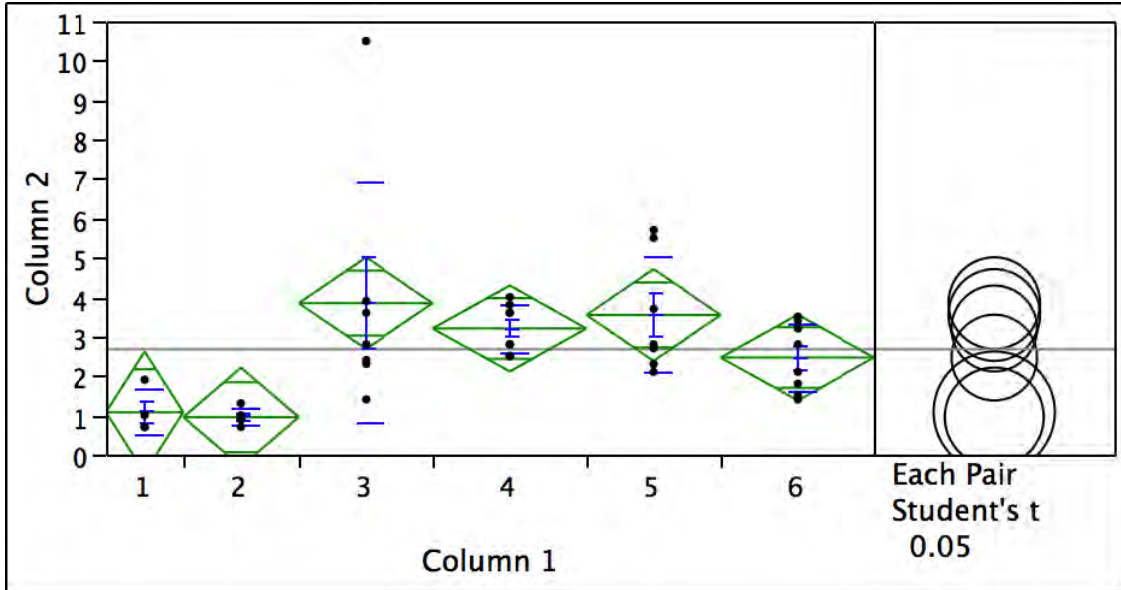
Positive values show pairs of means that are significantly different.

Level		Mean
5	A	1.9333333
6	A B	1.5000000
3	A B	1.4200000
4	A B	1.3250000
2	A B	1.3200000
1	B	1.0500000

Levels not connected by same letter are significantly different.

**Estadística A.II.6 Expresión génica por medio de la técnica comparativa del “ct” para TNF- $\alpha$**

**Oneway Analysis of Column 2 By Column 1**



**Oneway Anova  
Summary of Fit**

Rsquare	0.367377
Adj Rsquare	0.274344
Root Mean Square Error	1.517695
Mean of Response	2.675
Observations (or Sum Wgts)	40

**Analysis of Variance**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Column 1	5	45.47946	9.09589	3.9489	0.0063
Error	34	78.31554	2.30340		
C. Total	39	123.79500			

**Means for Oneway Anova**

Level	Number	Mean	Std Error	Lower 95%	Upper 95%
1	4	1.07500	0.75885	-0.467	2.6172
2	6	0.95000	0.61960	-0.309	2.2092
3	7	3.84286	0.57363	2.677	5.0086
4	8	3.20000	0.53659	2.110	4.2905
5	7	3.54286	0.57363	2.377	4.7086
6	8	2.46250	0.53659	1.372	3.5530

Std Error uses a pooled estimate of error variance

Estadística A.II.6 Expresión génica por medio de la técnica comparativa del “ct” para TNF- $\alpha$

### Means and Std Deviations

Level	Number	Mean	Std Dev	Std Err	Lower 95%	Upper 95%
1	4	1.07500	0.56789	0.2839	0.1714	1.9786
2	6	0.95000	0.19748	0.0806	0.7428	1.1572
3	7	3.84286	3.05224	1.1536	1.0200	6.6657
4	8	3.20000	0.61179	0.2163	2.6885	3.7115
5	7	3.54286	1.49427	0.5648	2.1609	4.9248
6	8	2.46250	0.86510	0.3059	1.7393	3.1857

### Means Comparisons

Comparisons for each pair using Student's t

t	Alpha
2.03224	0.05

Abs(Dif)-LSD	3	5	4	6	1	2
3	-1.6486	-1.3486	-0.9534	-0.2159	0.8347	1.1769
5	-1.3486	-1.6486	-1.2534	-0.5159	0.5347	0.8769
4	-0.9534	-1.2534	-1.5422	-0.8047	0.2362	0.5843
6	-0.2159	-0.5159	-0.8047	-1.5422	-0.5013	-0.1532
1	0.8347	0.5347	0.2362	-0.5013	-2.1809	-1.8659
2	1.1769	0.8769	0.5843	-0.1532	-1.8659	-1.7807

Positive values show pairs of means that are significantly different.

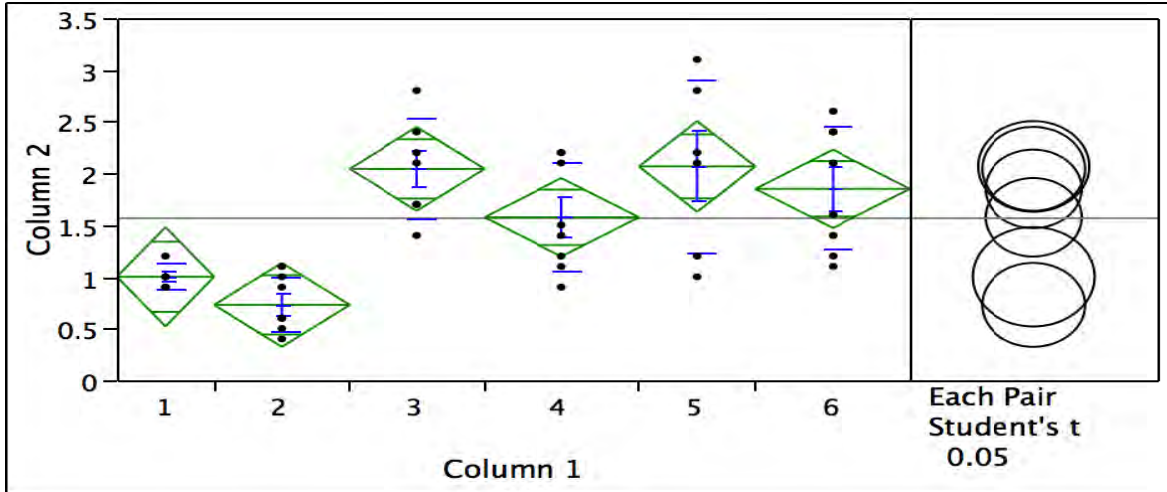
Level		Mean
3	A	3.8428571
5	A	3.5428571
4	A	3.2000000
6	A B	2.4625000
1	B	1.0750000
2	B	0.9500000

Levels not connected by same letter are significantly different.



**Estadística A.II.7 Expresión génica por medio de la técnica comparativa del “ct” para IL6**

**Oneway Analysis of Column 2 By Column 1**



**Oneway Anova  
Summary of Fit**

Rsquare	0.511798
Adj Rsquare	0.442055
Root Mean Square Error	0.528604
Mean of Response	1.565854
Observations (or Sum Wgts)	41

**Analysis of Variance**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Column 1	5	10.252433	2.05049	7.3383	<.0001
Error	35	9.779762	0.27942		
C. Total	40	20.032195			

**Means for Oneway Anova**

Level	Number	Mean	Std Error	Lower 95%	Upper 95%
1	5	1.00000	0.23640	0.5201	1.4799
2	7	0.72857	0.19979	0.3230	1.1342
3	7	2.04286	0.19979	1.6373	2.4485
4	8	1.57500	0.18689	1.1956	1.9544
5	6	2.06667	0.21580	1.6286	2.5048
6	8	1.85000	0.18689	1.4706	2.2294

Estadística A.II.7 Expresión génica por medio de la técnica comparativa del “ct”

para IL6

Std Error uses a pooled estimate of error variance

### Means and Std Deviations

Level	Number	Mean	Std Dev	Std Err Mean	Lower 95%	Upper 95%
1	5	1.00000	0.122474	0.05477	0.8479	1.1521
2	7	0.72857	0.269037	0.10169	0.4798	0.9774
3	7	2.04286	0.479086	0.18108	1.5998	2.4859
4	8	1.57500	0.523041	0.18492	1.1377	2.0123
5	6	2.06667	0.838252	0.34222	1.1870	2.9464
6	8	1.85000	0.595219	0.21044	1.3524	2.3476

### Means Comparisons

Comparisons for each pair using Student's t

t	Alpha
2.03011	0.05

Abs(Dif)-LSD	5	3	6	4	1	2
5	-0.61957	-0.57322	-0.36289	-0.08789	0.41686	0.74107
3	-0.57322	-0.57361	-0.36254	-0.08754	0.41450	0.74068
6	-0.36289	-0.36254	-0.53656	-0.26156	0.23823	0.56603
4	-0.08789	-0.08754	-0.26156	-0.53656	-0.03677	0.29103
1	0.41686	0.41450	0.23823	-0.03677	-0.67870	-0.35693
2	0.74107	0.74068	0.56603	0.29103	-0.35693	-0.57361

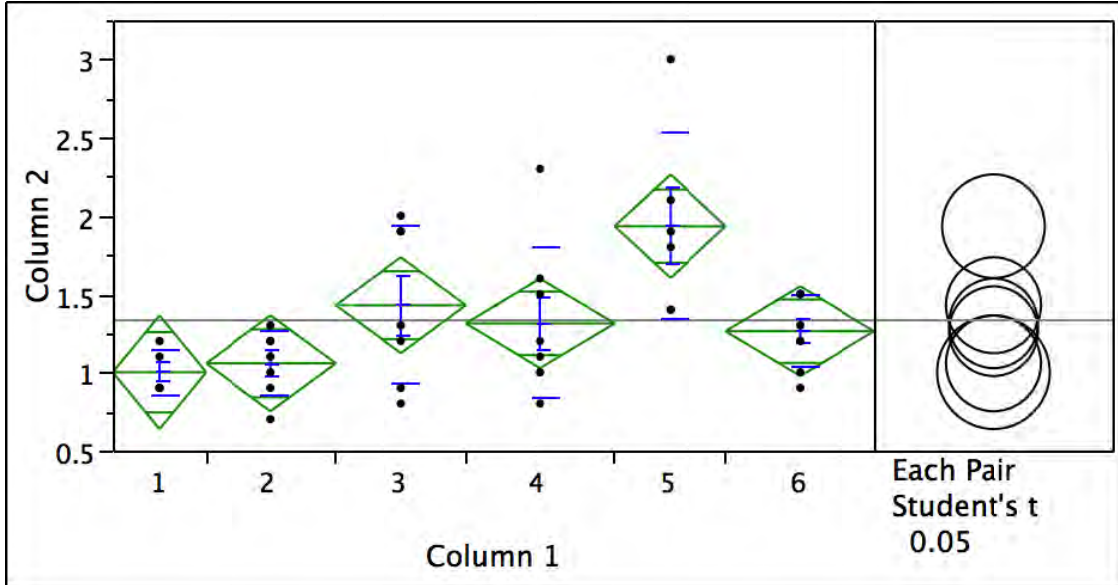
Positive values show pairs of means that are significantly different.

Level			Mean
5	A		2.0666667
3	A		2.0428571
6	A		1.8500000
4	A	B	1.5750000
1		B C	1.0000000
2		C	0.7285714

Levels not connected by same letter are significantly different.

Estadística A.II.8 Expresión génica por medio de la técnica comparativa del “ct” para TGF-β

Oneway Analysis of Column 2 By Column 1



Oneway Anova  
Summary of Fit

Rsquare	0.375081
Adj Rsquare	0.285807
Root Mean Square Error	0.399724
Mean of Response	1.331707
Observations (or Sum Wgts)	41

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Column 1	5	3.3565186	0.671304	4.2015	0.0043
Error	35	5.5922619	0.159779		
C. Total	40	8.9487805			

Means for Oneway Anova

Level	Number	Mean	Std Error	Lower 95%	Upper 95%
1	5	1.00000	0.17876	0.6371	1.3629
2	7	1.05714	0.15108	0.7504	1.3639
3	7	1.42857	0.15108	1.1219	1.7353
4	8	1.31250	0.14132	1.0256	1.5994
5	6	1.93333	0.16319	1.6020	2.2646
6	8	1.26250	0.14132	0.9756	1.5494



Estadística A.II.8 Expresión génica por medio de la técnica comparativa del “ct” para TGF-β

Std Error uses a pooled estimate of error variance

### Means and Std Deviations

Level	Number	Mean	Std Dev	Std Err Mean	Lower 95%	Upper 95%
1	5	1.00000	0.141421	0.06325	0.8244	1.1756
2	7	1.05714	0.207020	0.07825	0.8657	1.2486
3	7	1.42857	0.502375	0.18988	0.9640	1.8932
4	8	1.31250	0.479397	0.16949	0.9117	1.7133
5	6	1.93333	0.592171	0.24175	1.3119	2.5548
6	8	1.26250	0.232609	0.08224	1.0680	1.4570

### Means Comparisons

Comparisons for each pair using Student's t

t	Alpha
2.03011	0.05

Abs(Dif)-LSD	5	3	4	6	2	1
5	-0.46851	0.05330	0.18258	0.23258	0.42472	0.44196
3	0.05330	-0.43376	-0.30391	-0.25391	-0.06233	-0.04658
4	0.18258	-0.30391	-0.40574	-0.35574	-0.16462	-0.15012
6	0.23258	-0.25391	-0.35574	-0.40574	-0.21462	-0.20012
2	0.42472	-0.06233	-0.16462	-0.21462	-0.43376	-0.41801
1	0.44196	-0.04658	-0.15012	-0.20012	-0.41801	-0.51323

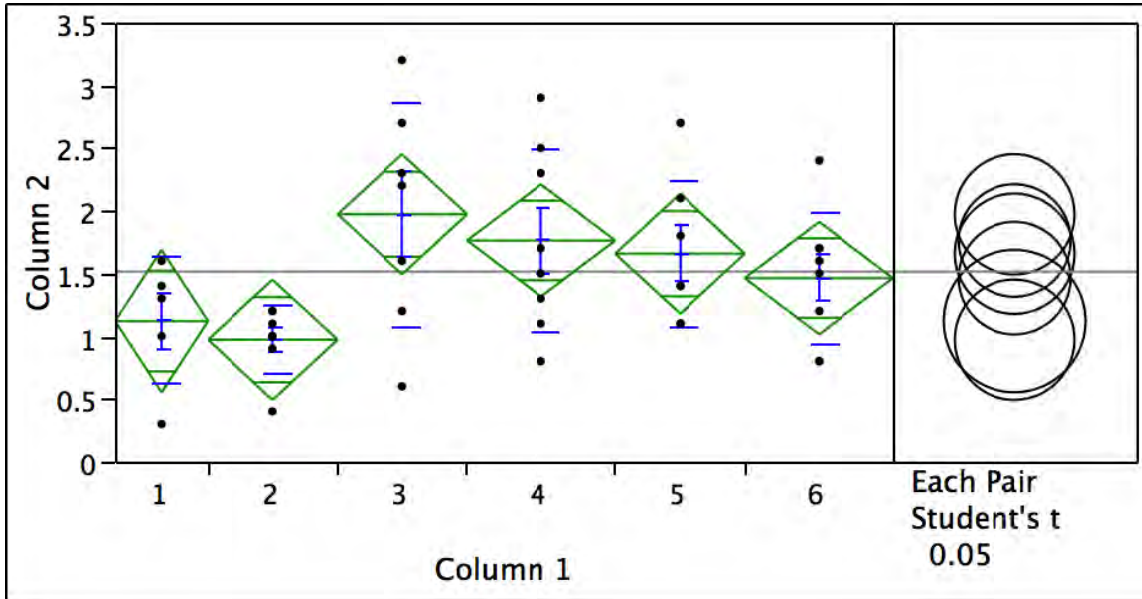
Positive values show pairs of means that are significantly different.

Level		Mean
5	A	1.9333333
3	B	1.4285714
4	B	1.3125000
6	B	1.2625000
2	B	1.0571429
1	B	1.0000000

Levels not connected by same letter are significantly different.

**Estadística A.II.9 Expresión génica por medio de la técnica comparativa del “ct” para Colágena Tipo IV**

**Oneway Analysis of Column 2 By Column 1**



**Oneway Anova  
Summary of Fit**

Rsquare	0.260359
Adj Rsquare	0.157631
Root Mean Square Error	0.625638
Mean of Response	1.514286
Observations (or Sum Wgts)	42

**Analysis of Variance**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Column 1	5	4.960214	0.992043	2.5345	0.0459
Error	36	14.091214	0.391423		
C. Total	41	19.051429			

**Means for Oneway Anova**

Level	Number	Mean	Std Error	Lower 95%	Upper 95%
1	5	1.12000	0.27979	0.5526	1.6874
2	7	0.97143	0.23647	0.4918	1.4510
3	7	1.97143	0.23647	1.4918	2.4510
4	8	1.76250	0.22120	1.3139	2.2111
5	7	1.65714	0.23647	1.1776	2.1367
6	8	1.46250	0.22120	1.0139	1.9111

Estadística A.II.9 Expresión génica por medio de la técnica comparativa del “ct” para Colágena Tipo IV

Std Error uses a pooled estimate of error variance

### Means and Std Deviations

Level	Number	Mean	Std Dev	Std Err Mean	Lower 95%	Upper 95%
1	5	1.12000	0.506952	0.22672	0.4905	1.7495
2	7	0.97143	0.275162	0.10400	0.7169	1.2259
3	7	1.97143	0.895757	0.33856	1.1430	2.7999
4	8	1.76250	0.734725	0.25976	1.1483	2.3767
5	7	1.65714	0.585540	0.22131	1.1156	2.1987
6	8	1.46250	0.528982	0.18702	1.0203	1.9047

### Means Comparisons

Comparisons for each pair using Student's t

t	Alpha
2.02809	0.05

Abs(Dif)-LSD	3	4	5	6	1	2
3	-0.67823	-0.44776	-0.36394	-0.14776	0.10846	0.32177
4	-0.44776	-0.63443	-0.55134	-0.33443	-0.08086	0.13438
5	-0.36394	-0.55134	-0.67823	-0.46205	-0.20582	0.00748
6	-0.14776	-0.33443	-0.46205	-0.63443	-0.38086	-0.16562
1	0.10846	-0.08086	-0.20582	-0.38086	-0.80249	-0.59439
2	0.32177	0.13438	0.00748	-0.16562	-0.59439	-0.67823

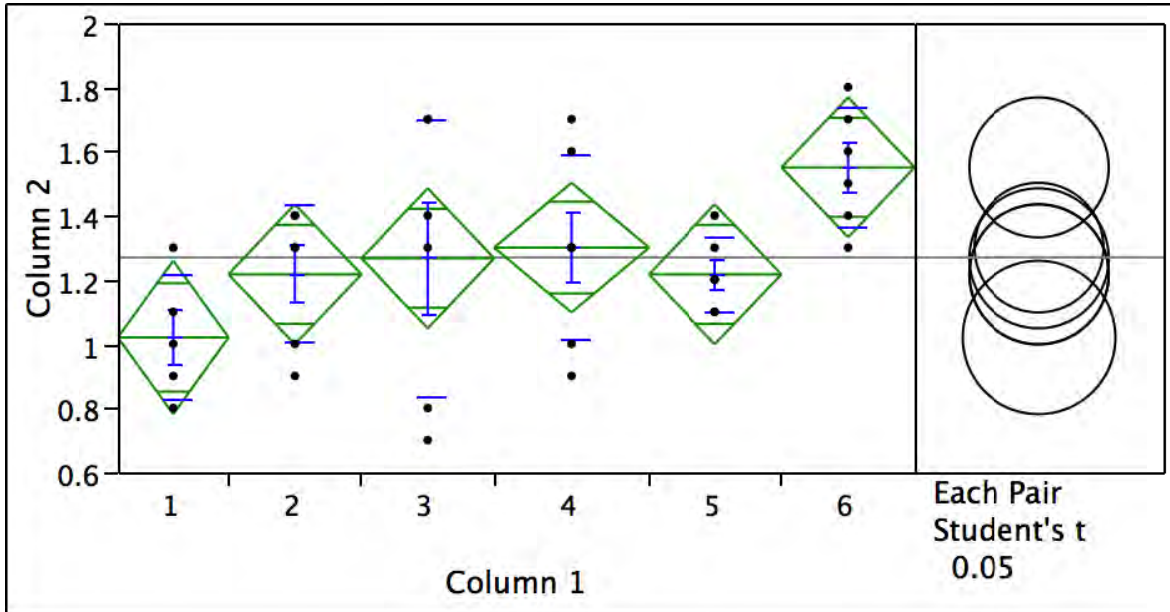
Positive values show pairs of means that are significantly different.

Level			Mean
3	A		1.9714286
4	A	B	1.7625000
5	A	B	1.6571429
6	A	B C	1.4625000
1		B C	1.1200000
2		C	0.9714286

Levels not connected by same letter are significantly different.

**Estadística A.II.10 Expresión génica por medio de la técnica comparativa del “ct” para Podocina**

**Oneway Analysis of Column 2 By Column 1**



**Oneway Anova  
Summary of Fit**

Rsquare	0.286258
Adj Rsquare	0.167301
Root Mean Square Error	0.261598
Mean of Response	1.269444
Observations (or Sum Wgts)	36

**Analysis of Variance**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Column 1	5	0.8233889	0.164678	2.4064	0.0599
Error	30	2.0530000	0.068433		
C. Total	35	2.8763889			

**Means for Oneway Anova**

Level	Number	Mean	Std Error	Lower 95%	Upper 95%
1	5	1.02000	0.11699	0.7811	1.2589
2	6	1.21667	0.10680	0.9986	1.4348
3	6	1.26667	0.10680	1.0486	1.4848
4	7	1.30000	0.09887	1.0981	1.5019
5	6	1.21667	0.10680	0.9986	1.4348
6	6	1.55000	0.10680	1.3319	1.7681

Std Error uses a pooled estimate of error variance

Estadística A.II.10 Expresión génica por medio de la técnica comparativa del “ct” para Podocina

### Means and Std Deviations

Level	Number	Mean	Std Dev	Std Err Mean	Lower 95%	Upper 95%
1	5	1.02000	0.192354	0.08602	0.7812	1.2588
2	6	1.21667	0.213698	0.08724	0.9924	1.4409
3	6	1.26667	0.432049	0.17638	0.8133	1.7201
4	7	1.30000	0.288675	0.10911	1.0330	1.5670
5	6	1.21667	0.116905	0.04773	1.0940	1.3394
6	6	1.55000	0.187083	0.07638	1.3537	1.7463

### Means Comparisons

Comparisons for each pair using Student's t

t	Alpha
2.04227	0.05

Abs(Dif)-LSD	6	4	3	2	5	1
6	-0.30845	-0.04723	-0.02512	0.02488	0.02488	0.20649
4	-0.04723	-0.28557	-0.26390	-0.21390	-0.21390	-0.03283
3	-0.02512	-0.26390	-0.30845	-0.25845	-0.25845	-0.07684
2	0.02488	-0.21390	-0.25845	-0.30845	-0.30845	-0.12684
5	0.02488	-0.21390	-0.25845	-0.30845	-0.30845	-0.12684
1	0.20649	-0.03283	-0.07684	-0.12684	-0.12684	-0.33789

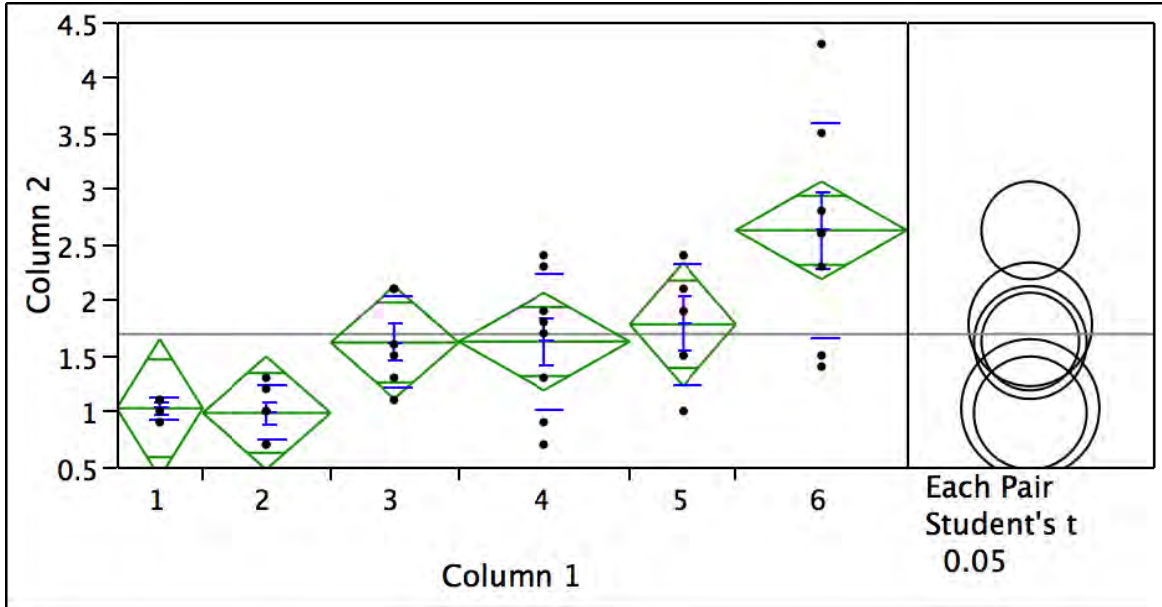
Positive values show pairs of means that are significantly different.

Level		Mean
6	A	1.5500000
4	A B	1.3000000
3	A B	1.2666667
2	B	1.2166667
5	B	1.2166667
1	B	1.0200000

Levels not connected by same letter are significantly different.

Estadística A.II.11 Expresión génica por medio de la técnica comparativa del “ct” para Nefrina

Oneway Analysis of Column 2 By Column 1



Oneway Anova  
Summary of Fit

Rsquare	0.507772
Adj Rsquare	0.428381
Root Mean Square Error	0.609129
Mean of Response	1.691892
Observations (or Sum Wgts)	37

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Column 1	5	11.865401	2.37308	6.3958	0.0003
Error	31	11.502167	0.37104		
C. Total	36	23.367568			

Means for Oneway Anova

Level	Number	Mean	Std Error	Lower 95%	Upper 95%
1	4	1.02500	0.30456	0.4038	1.6462
2	6	0.98333	0.24868	0.4762	1.4905
3	6	1.61667	0.24868	1.1095	2.1238
4	8	1.62500	0.21536	1.1858	2.0642
5	5	1.78000	0.27241	1.2244	2.3356
6	8	2.62500	0.21536	2.1858	3.0642

Estadística A.II.11 Expresión génica por medio de la técnica comparativa del “ct” para Nefrina

Std Error uses a pooled estimate of error variance

**Means and Std Deviations**

Level	Number	Mean	Std Dev	Std Err Mean	Lower 95%	Upper 95%
1	4	1.02500	0.095743	0.04787	0.8727	1.1773
2	6	0.98333	0.248328	0.10138	0.7227	1.2439
3	6	1.61667	0.411906	0.16816	1.1844	2.0489
4	8	1.62500	0.615862	0.21774	1.1101	2.1399
5	5	1.78000	0.544977	0.24372	1.1033	2.4567
6	8	2.62500	0.961769	0.34004	1.8209	3.4291

**Means Comparisons**

Comparisons for each pair using Student's t

t	Alpha
2.03951	0.05

Abs(Dif)-LSD	6	5	4	3	1	2
6	-0.62116	0.13677	0.37884	0.33740	0.83923	0.97073
5	0.13677	-0.78572	-0.55323	-0.58893	-0.07838	0.04440
4	0.37884	-0.55323	-0.62116	-0.66260	-0.16077	-0.02927
3	0.33740	-0.58893	-0.66260	-0.71726	-0.21025	-0.08392
1	0.83923	-0.07838	-0.16077	-0.21025	-0.87846	-0.76025
2	0.97073	0.04440	-0.02927	-0.08392	-0.76025	-0.71726

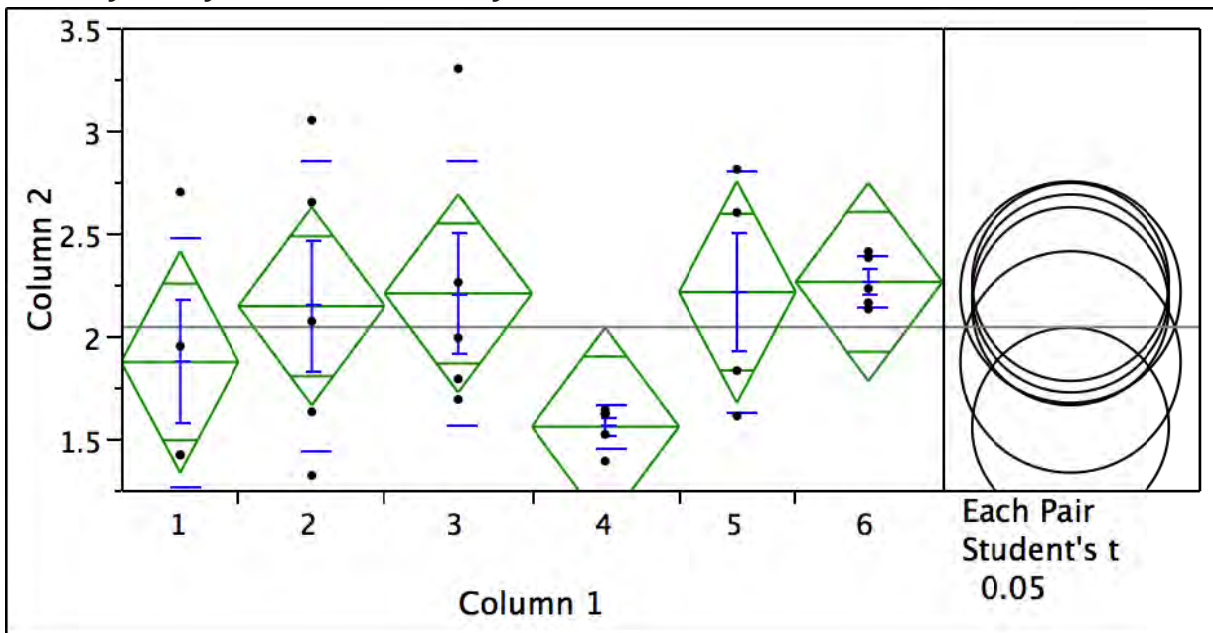
Positive values show pairs of means that are significantly different.

Level			Mean
6	A		2.6250000
5		B	1.7800000
4		B C	1.6250000
3		B C	1.6166667
1		B C	1.0250000
2		C	0.9833333

Levels not connected by same letter are significantly different.

Estadística A.II.12 Colesterol total en tejido renal

Oneway Analysis of Column 2 By Column 1



Oneway Anova  
Summary of Fit

Rsquare	0.235716
Adj Rsquare	0.062015
Root Mean Square Error	0.519473
Mean of Response	2.0425
Observations (or Sum Wgts)	28

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Column 1	5	1.8309750	0.366195	1.3570	0.2783
Error	22	5.9367500	0.269852		
C. Total	27	7.7677250			

Means for Oneway Anova

Level	Number	Mean	Std Error	Lower 95%	Upper 95%
1	4	1.87250	0.25974	1.3338	2.4112
2	5	2.14400	0.23232	1.6622	2.6258
3	5	2.20600	0.23232	1.7242	2.6878
4	5	1.55800	0.23232	1.0762	2.0398
5	4	2.21250	0.25974	1.6738	2.7512
6	5	2.26200	0.23232	1.7802	2.7438



Estadística A.II.12 Colesterol total en tejido renal

Std Error uses a pooled estimate of error variance

**Means and Std Deviations**

Level	Number	Mean	Std Dev	Std Err Mean	Lower 95%	Upper 95%
1	4	1.87250	0.605606	0.30280	0.9088	2.8362
2	5	2.14400	0.711604	0.31824	1.2604	3.0276
3	5	2.20600	0.649176	0.29032	1.3999	3.0121
4	5	1.55800	0.104976	0.04695	1.4277	1.6883
5	4	2.21250	0.582087	0.29104	1.2863	3.1387
6	5	2.26200	0.127161	0.05687	2.1041	2.4199

**Means Comparisons**

Comparisons for each pair using Student's t

t	Alpha
2.07387	0.05

Abs(Dif)-LSD	6	5	3	2	1	4
6	-0.68136	-0.67319	-0.62536	-0.56336	-0.33319	0.02264
5	-0.67319	-0.76178	-0.71619	-0.65419	-0.42178	-0.06819
3	-0.62536	-0.71619	-0.68136	-0.61936	-0.38919	-0.03336
2	-0.56336	-0.65419	-0.61936	-0.68136	-0.45119	-0.09536
1	-0.33319	-0.42178	-0.38919	-0.45119	-0.76178	-0.40819
4	0.02264	-0.06819	-0.03336	-0.09536	-0.40819	-0.68136

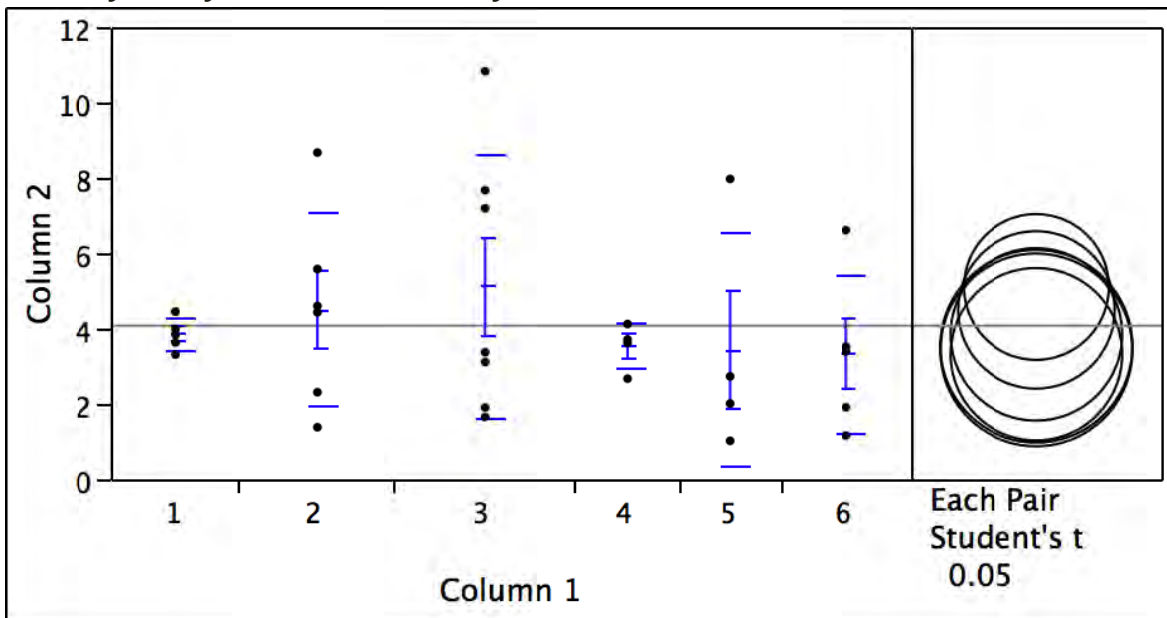
Positive values show pairs of means that are significantly different.

Level		Mean
6	A	2.2620000
5	A B	2.2125000
3	A B	2.2060000
2	A B	2.1440000
1	A B	1.8725000
4	B	1.5580000

Levels not connected by same letter are significantly different.

## Estadística A.II.13 Triglicéridos totales en tejido renal

### Oneway Analysis of Column 2 By Column 1



### Means and Std Deviations

Level	Number	Mean	Std Dev	Std Err Mean	Lower 95%	Upper 95%
1	5	3.84400	0.42412	0.1897	3.317	4.3706
2	6	4.49500	2.57296	1.0504	1.795	7.1952
3	7	5.10286	3.48572	1.3175	1.879	8.3266
4	4	3.53000	0.61324	0.3066	2.554	4.5058
5	4	3.43250	3.10516	1.5526	-1.509	8.3735
6	5	3.31800	2.09301	0.9360	0.719	5.9168

### Means Comparisons

#### Comparisons for each pair using Student's t

t	Alpha
2.05954	0.05

Abs(Dif)-LSD	3	2	1	4	5	6
3	-2.7349	-2.2388	-1.7371	-1.6341	-1.5366	-1.2111
2	-2.2388	-2.9541	-2.4472	-2.3377	-2.2402	-1.9212
1	-1.7371	-2.4472	-3.2360	-3.1183	-3.0208	-2.7100
4	-1.6341	-2.3377	-3.1183	-3.6180	-3.5205	-3.2203
5	-1.5366	-2.2402	-3.0208	-3.5205	-3.6180	-3.3178
6	-1.2111	-1.9212	-2.7100	-3.2203	-3.3178	-3.2360

Estadística A.II.13 Triglicéridos totales en tejido renal

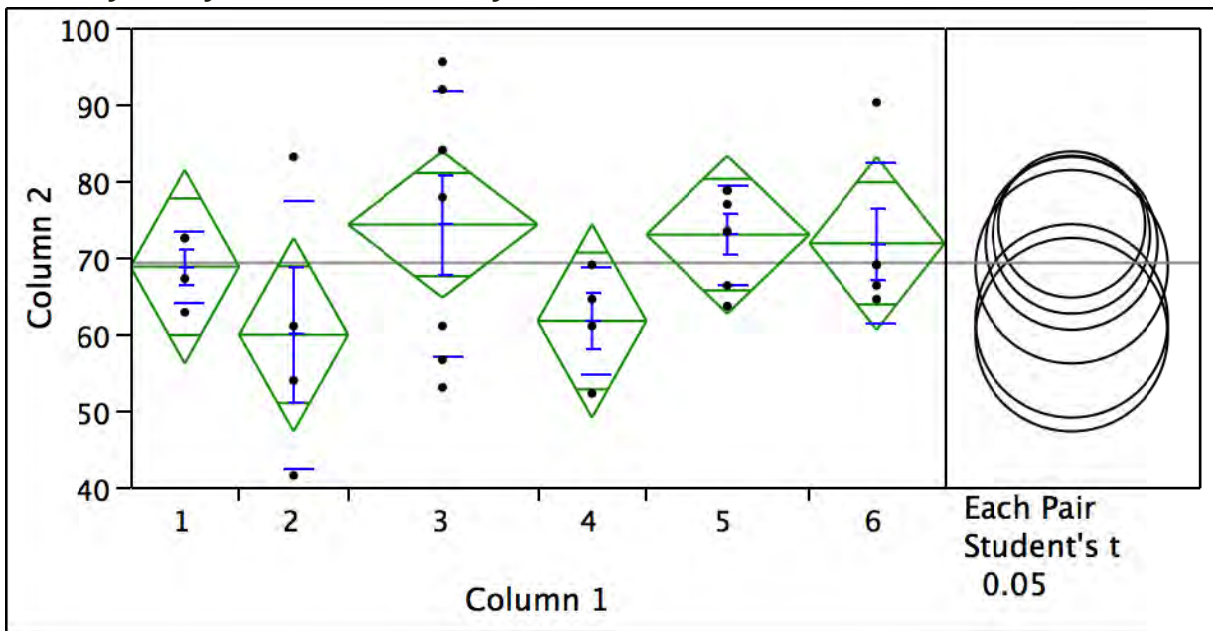
Positive values show pairs of means that are significantly different.

Level		Mean
3	A	5.1028571
2	A	4.4950000
1	A	3.8440000
4	A	3.5300000
5	A	3.4325000
6	A	3.3180000

Levels not connected by same letter are significantly different.

Estadística A.II.14 mg/dL de creatinina en suero

Oneway Analysis of Column 2 By Column 1



Oneway Anova  
Summary of Fit

Rsquare	0.195226
Adj Rsquare	0.027565
Root Mean Square Error	12.23478
Mean of Response	69.25333
Observations (or Sum Wgts)	30

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Column 1	5	871.4992	174.300	1.1644	0.3552
Error	24	3592.5555	149.690		
C. Total	29	4464.0547			

Means for Oneway Anova

Level	Number	Mean	Std Error	Lower 95%	Upper 95%
1	4	68.7500	6.1174	56.124	81.376
2	4	59.8750	6.1174	47.249	72.501
3	7	74.2571	4.6243	64.713	83.801
4	4	61.6750	6.1174	49.049	74.301
5	6	72.9333	4.9948	62.625	83.242
6	5	71.8000	5.4716	60.507	83.093

Estadística A.II.14 mg/dL de creatinina en suero

Std Error uses a pooled estimate of error variance

### Means and Std Deviations

Level	Number	Mean	Std Dev	Std Err Mean	Lower 95%	Upper 95%
1	4	68.7500	4.6879	2.3440	61.290	76.210
2	4	59.8750	17.4548	8.7274	32.101	87.649
3	7	74.2571	17.3657	6.5636	58.197	90.318
4	4	61.6750	7.1149	3.5575	50.354	72.996
5	6	72.9333	6.5356	2.6682	66.075	79.792
6	5	71.8000	10.4616	4.6786	58.810	84.790

### Means Comparisons

Comparisons for each pair using Student's t

t	Alpha
2.06390	0.05

Abs(Dif)-LSD	3	5	6	1	4	2
3	-13.497	-12.725	-12.329	-10.320	-3.245	-1.445
5	-12.725	-14.579	-14.157	-12.116	-5.041	-3.241
6	-12.329	-14.157	-15.970	-13.889	-6.814	-5.014
1	-10.320	-12.116	-13.889	-17.855	-10.780	-8.980
4	-3.245	-5.041	-6.814	-10.780	-17.855	-16.055
2	-1.445	-3.241	-5.014	-8.980	-16.055	-17.855

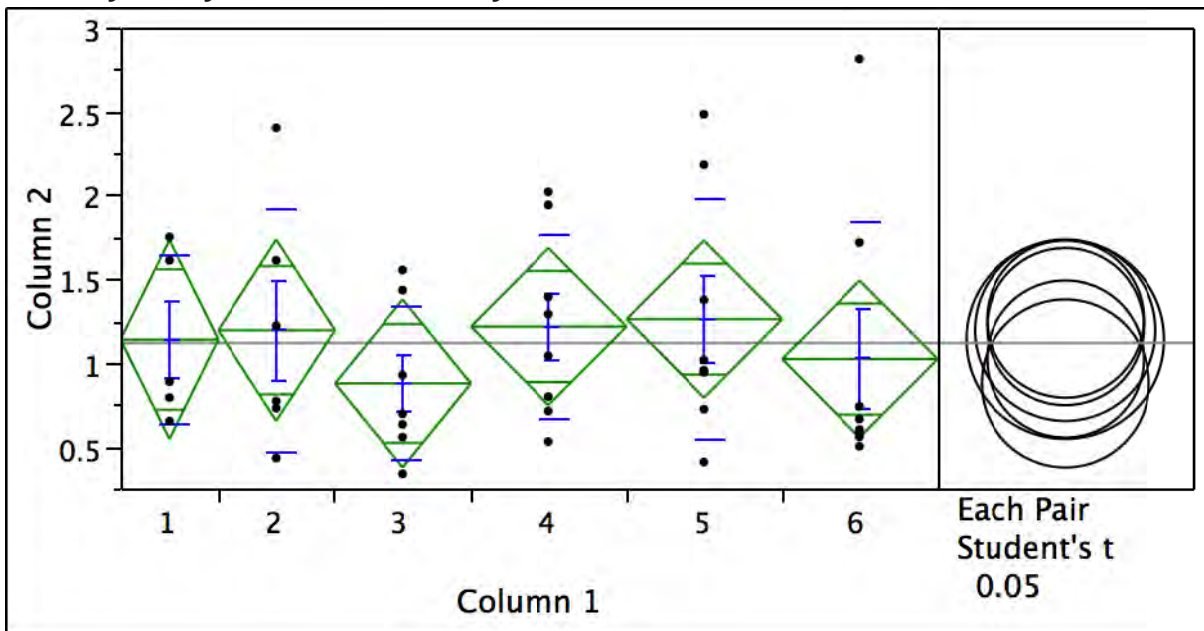
Positive values show pairs of means that are significantly different.

Level		Mean
3	A	74.257143
5	A	72.933333
6	A	71.800000
1	A	68.750000
4	A	61.675000
2	A	59.875000

Levels not connected by same letter are significantly different.

Estadística A.II.15 mg/dL de depuración de creatinina

Oneway Analysis of Column 2 By Column 1



Oneway Anova  
Summary of Fit

Rsquare	0.046908
Adj Rsquare	-0.08547
Root Mean Square Error	0.654157
Mean of Response	1.118077
Observations (or Sum Wgts)	42

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Column 1	5	0.758191	0.151638	0.3544	0.8760
Error	36	15.405149	0.427921		
C. Total	41	16.163339			

Means for Oneway Anova

Level	Number	Mean	Std Error	Lower 95%	Upper 95%
1	5	1.13812	0.29255	0.54480	1.7314
2	6	1.19359	0.26706	0.65197	1.7352
3	7	0.87582	0.24725	0.37438	1.3773
4	8	1.21539	0.23128	0.74634	1.6845
5	8	1.25997	0.23128	0.79091	1.7290
6	8	1.02169	0.23128	0.55263	1.4907

Estadística A.II.15 mg/dL de depuración de creatinina

Std Error uses a pooled estimate of error variance

### Means and Std Deviations

Level	Number	Mean	Std Dev	Std Err Mean	Lower 95%	Upper 95%
1	5	1.13812	0.504551	0.22564	0.51163	1.7646
2	6	1.19359	0.722468	0.29495	0.43541	1.9518
3	7	0.87582	0.457741	0.17301	0.45248	1.2992
4	8	1.21539	0.553014	0.19552	0.75306	1.6777
5	8	1.25997	0.719649	0.25443	0.65832	1.8616
6	8	1.02169	0.824090	0.29136	0.33273	1.7106

### Means Comparisons

Comparisons for each pair using Student's t

t	Alpha
2.02809	0.05

Abs(Dif)-LSD	5	4	2	1	6	3
5	-0.66335	-0.61877	-0.65012	-0.63448	-0.42507	-0.30248
4	-0.61877	-0.66335	-0.69469	-0.67905	-0.46964	-0.34705
2	-0.65012	-0.69469	-0.76597	-0.74788	-0.54459	-0.42033
1	-0.63448	-0.67905	-0.74788	-0.83907	-0.63990	-0.51453
6	-0.42507	-0.46964	-0.54459	-0.63990	-0.66335	-0.54076
3	-0.30248	-0.34705	-0.42033	-0.51453	-0.54076	-0.70915

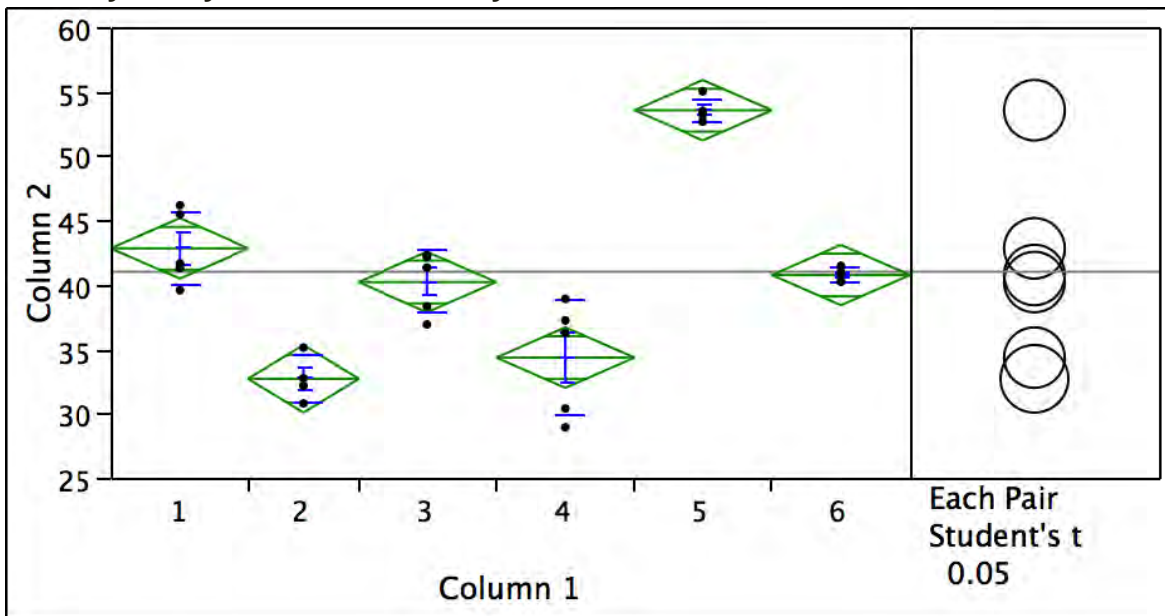
Positive values show pairs of means that are significantly different.

Level		Mean
5	A	1.2599652
4	A	1.2153945
2	A	1.1935912
1	A	1.1381163
6	A	1.0216879
3	A	0.8758204

Levels not connected by same letter are significantly different.

## Estadística A.II.16 Expansión mesangial

### Oneway Analysis of Column 2 By Column 1



### Oneway Anova Summary of Fit

Rsquare	0.897988
Adj Rsquare	0.875811
Root Mean Square Error	2.539083
Mean of Response	40.99517
Observations (or Sum Wgts)	29

### Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Column 1	5	1305.2715	261.054	40.4927	<.0001
Error	23	148.2797	6.447		
C. Total	28	1453.5511			

### Means for Oneway Anova

Level	Number	Mean	Std Error	Lower 95%	Upper 95%
1	5	42.8140	1.1355	40.465	45.163
2	4	32.6850	1.2695	30.059	35.311
3	5	40.1960	1.1355	37.847	42.545
4	5	34.3300	1.1355	31.981	36.679
5	5	53.5400	1.1355	51.191	55.889
6	5	40.7440	1.1355	38.395	43.093



Estadística A.II.16 Expansión mesangial

Std Error uses a pooled estimate of error variance

**Means and Std Deviations**

Level	Number	Mean	Std Dev	Std Err Mean	Lower 95%	Upper 95%
1	5	42.8140	2.85125	1.2751	39.274	46.354
2	4	32.6850	1.81164	0.9058	29.802	35.568
3	5	40.1960	2.44586	1.0938	37.159	43.233
4	5	34.3300	4.40970	1.9721	28.855	39.805
5	5	53.5400	0.87946	0.3933	52.448	54.632
6	5	40.7440	0.52691	0.2356	40.090	41.398

**Means Comparisons**

Comparisons for each pair using Student's t

t	Alpha
2.06866	0.05

Abs(Dif)-LSD	5	1	6	3	4	2
5	-3.322	7.404	9.474	10.022	15.888	17.332
1	7.404	-3.322	-1.252	-0.704	5.162	6.606
6	9.474	-1.252	-3.322	-2.774	3.092	4.536
3	10.022	-0.704	-2.774	-3.322	2.544	3.988
4	15.888	5.162	3.092	2.544	-3.322	-1.878
2	17.332	6.606	4.536	3.988	-1.878	-3.714

Positive values show pairs of means that are significantly different.

Level		Mean
5	A	53.540000
1	B	42.814000
6	B	40.744000
3	B	40.196000
4	C	34.330000
2	C	32.685000

Levels not connected by same letter are significantly different.

## APENDICE III

### Formulación de dietas

Ingredientes	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3	Dieta 4	Dieta 5	Dieta 6
	20% Caseína	20% Soya	30% Caseína	30% Soya	45% Caseína	45% Soya
	<b>g / kg dieta</b>					
Proteína	220.7	232.5	331	348.8	496.6	523.2
Maltodextrina	132	132	132	132	132	132
Sacarosa	100	100	100	100	100	100
Celulosa	50	50	50	50	50	50
Almidón	385.6	373.8	275.3	257.5	109.7	83.1
Aceite de soya	50	50	50	50	50	50
Minerales	50	50	50	50	50	50
Vitaminas	10	10	10	10	10	10
Citrato de colina	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7
Total	1000	1000	1000	1000	1000	1000

**Tabla A.III.1 Formulación de las dietas administradas**

Las dietas administradas fueron isocalóricas. Las calorías proporcionadas por cada uno de los tratamientos dietarios fué de 3.8 kcal/g de dieta.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar. BE; Pinilla. L; (2006); La rata Zucker como modelo para el estudio de la función reproductora; *Endocrinol. Nutr.* 53; 592-598.
2. Alberts. AW; Strauss. AW; Hennesy. S; Vagelos. PR;(2000); Regulation of synthesis or hepatic fatty acid synthetase; *Proc. Natl. Acad. Sci*; 72; 3956-3960.
3. Anderson. PJ; Critchley. JA; Chan. JCN; Crokram. CS; Lee. ZSK. Thomas. GN; Tomilson. B;(2001). Factor analysis of the metabolic syndrome: obesity vs insulin resistance as the central abnormality. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25 (12): 1782-1788
4. Aschner. CM; Izquierdo. J; Sole. J; Tarazona. A; Pinzon. JB; et al; (2002) Prevalence of the metabolic syndrome in a rural and urban population in Colombia. *Diab Res Clin Pract.* (57. 1:532
5. Avendaño. LH; *Nefrología clínica.* 3ª. Edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid. España. 2009. pags. 21. 26. 138. 139. 301. 310-311.
6. Baudi. S; *Química de los Alimento;* 4ª edición; editorial Pearson; México; 2006; 609-613
7. Blázquez. FE; (2006); Glucolipototoxicidad. Resistencia a la acción de la insulina y diabetes mellitus tipo 2; *Diabetes*; 51(3); 165-179
8. Bourges. H; (1974); El papel de la soya en la alimentación humana; *Cuad. Nutr.*; 3; 365-371.
9. Brenner R; *El riñón. Tratado de Nefrología.* 7a. edición. Editorial Elsevier. España. 2005. pp. 1089. 1110-1111.
10. Brown. M.S.; Goldstein. J.L. 1997. The SREBP pathway: Regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell.* 89(3):331-340.

11. Burrows. A; et al; (2007); Síndrome metabólico en niños y adolescentes: asociación con sensibilidad insulínica y con magnitud y distribución de la obesidad; Rev. Med. Chile; 135 (2); 174-181
12. Campbell. IK; Roberts. LJ Wicks. IP; (2003); Molecular targets in immune-mediated diseases: the case of tumour necrosis factor; Immunology Cell and Biology; 81; 354-366.
13. Castillo R; Huerta P; Carrasco R; Rodrigo R; (1992); Estrés oxidativo y daño renal; CIMEL, 8(1); 44-53.
14. Correa-Rotter. R.; González-Michaca. L. 2005. Early detection and prevention of diabetic nephropathy: A challenger calling for mandatory action for Mexico and the developing world. Kidney International. 68(98):S69-S75.
15. De la Riestra. MA; Monografía sobre el Síndrome Metabólico. Universidad Nacional del Rosario. (2007) 1-13.
16. Della. P; Bozzini. N; Cabrera. H; (2004); Síndromes asociados a alteración del colágeno tipo IV: síndrome de Alport y liquen escleroso atrófico; Dermatol. Pediatr. Lat.; 2(2); 139-143
17. Djuric. Z.; Chen. G.; Doerge. D.R.; Heilbrun. L.K.; Kucuk. O. 2001. Effect of soy isoflavone supplementation on markers of oxidative stress in men and women. Cancer Lett. 172(1):1-6.
18. Durruty. AP; García de los Ríos. AM; (2001); Glucotoxicidad y lipotoxicidad: Factores en la patogénesis y evolución de la diabetes tipo II; Diabetologia 35(2); 892-904
19. Eleftheriou. F; Karsenty. G; (2004); Bone mass regulation by leptin: a hypothalamic control of bone formation; Pathol. Biol.; 52(3); 148-53
20. Elwood. PC; Pickering. JE; Fehily. AM; (2007); Diabetes and the metabolic syndrome; Epidemiol Community Health; 61(8); 695-698.

21. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT). 2006
22. Falfan. VR; (2002); Factor de necrosis tumoral: Actividad biológica en neuropatías intersticiales; Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex; 15(1); 48-53.
23. Feldeisen. SE; Tucker. KL; (2007); Nutritional Strategies in the prevention and treatment of the metabolic syndrome; Applied physiology. nutrition and metabolism; 32(1) 46-60
24. Finn. G; Histología. 3a. edición. Editorial Panamericana. 1998. 387-392
25. Frühbeck. G; Sopena. M; Martinez. JA; Salvador. J; (1997); Nutrición. Balance energético y obesidad; Rev Med Navarra; 41; 47-54.
26. García. RM; Durruty. P; Diabetes mellitus. Fundación de Investigación y Perfeccionamiento Médico. (2002)
27. González. CA; et al; (1999); Consenso mexicano de Resistencia a la insulina y síndrome metabólico; Rev. Mex. De Cardiología; 10 (1); 3-19
28. González. MR; Tesis Licenciatura; Análisis de polimorfismos genéticos del gen de nefrona en diabéticos chilenos tipo 1 y 2. y su asociación con la nefropatía diabética; Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Santiago de Chile; 2006; 5-10.
29. Guerra. SP; Aliga. SC; Rivas. PO; Aguilera. MW; (2009); Síndrome Metabólico y Factores de riesgo asociados al consume de alimentos en adolescentes; Rev. Soc. Med. Quir Hosp Emerg Perez de León; 40 (1); 37-46
30. Guyton. A.. Tratado de Fisiología Médica. 10ª ed. Ed. McGraw-Hill. España. 2001. pp. 339-380.
31. Hannah. V.C.; Ou. J.; Luang. A.; Goldstein. J.L.; Brown. M.S. 2001. Unsaturated fatty acids down-regulate SREBP isoforms 1a and 1c by two mechanisms in HEK-293 cells. Biol. Chem. 276:4365-4372.

32. Hardie. DG; Scott. JW; Pan. DA; Hudson. ER; (2003); Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system; 546(1); 113-120.
33. Hernández. PR; (2003); Participación del factor de transformación tumoral- $\beta$  en la regulación de la inflamación y la respuesta inmunológica; Gac. Med. Mex; 139(2); 135-138.
34. Hernández. UM; Alvarado. NA;(2001); Interleucinas e inmunidad innata; Rev. Biomed; 12; 272-280.
35. Istvan. ES; Palnitkar. M; Buchanan. SK; Deisenhofer. J; (2000); Crystal structure of catalytic portion of human HMGR: regulation of activity and catalysis.; 19 (5); 819-830.
36. Kim. J.B.; Sarraf. P.; Wright. M.; Yao. K.M.; Mueller. E.; Solanes. G.; Lowell. B.; Spiegelman. B.M. 1998. Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. J. Clin. Invest. 101:1-9.
37. King. AJ; Levey. AS; (1993); Dietary protein and renal function; J. Am. Soc. Nephrol.; 3; 1723-1737.
38. Klein. CL; Hoke. TS; Fang. WF; Altmann. CJ; Douglas. IS; Faubel. S; (2008); Interleukin-6 mediates lung injury following ischemic acute kidney injury or bilateral nephrectomy; Kidney International; 74; 901-909
39. Lakka. TA; Laaksonen. DE; (2007); Physical activity in prevention and treatment of the metabolic syndrome; Applied physiology. nutrition and metabolism; 32(1); 76-88
40. Lee Y; Wang MY; Kakuma T; Wang ZW; Babcock E; Mc Corckle K; Higa M; Zhou YT; Unger RH; (2001); Liporegulation in diet induced obesity. The antisteatotic role of hyperleptinemia; J. Biol Chem, 278 (8); 5629-5635.

41. Lehninger. A.: Principios de bioquímica. 3ª ed.. Editorial Omega. España. 2000. pp. 642.646-648.652.669-674.
42. Listenberger. L.L; Han. X; Lewis. S.E; Cases. S; Fareses. R.V. Jr; Ory. D.S.. Schaffer. J.E. (2003) Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. PNAS. 100 (6):3077-3082.
43. López-Casillas. F; Massague. J; (2003); TGF- $\beta$ : receptors. Señales y acciones; Gac. Med. Mex; 139(2); 139-138
44. Manzano N; Torres N; Tovar A; (2002); Mecanismos de las proteínas que se unen a los elementos reguladores de los esteroides (SREBP's) en la biosíntesis de colesterol y ácidos grasos; Rev Invest Clin; 52(2); 145-153.
45. Martínez. MP; De Pablos. VP;(1997); Nuevas perspectivas de la obesidad; Rev Clin Esp; 197; 303-305.
46. Marulanda. S; (2000); La inflamación y el cirujano; Rev. Colomb. Cir; 15 (4); 274-282.
47. Meigs. TE. Roseman. DS; Simoni. RD; (1996); Regulation of HMGCR degradation by the nonsterol mevalonate metabolite; J. Biol. Chem.; 271 (4); 7916-7922.
48. Meigs. TE; Simmoni. RE; (1997); Farnesol as a regulator of HMGCR degradation; Arch. Biochem. Biophys.; 345 (1); 1-9
49. Navarro. J; (2003); Nefropatía diabética: ¿Una cuestión de inflamación? Hipótesis del daño renal inflamatorio en la diabetes mellitus tipo II; Nefrología; 23 (5); 381-389.
50. Plotkin BJ; Paulson. D; (1996); Zucker rat (fa/fa). a model for the study of immune function in diabetes mellitus; Lab. Anim. Sci.; 46; 682-884.
51. Reaven. GM; (2001); Insulin resistance: why is important to treat?; Diabetes Metab; 27(2); 247-253.

52. Riikola. A; Sipila. K; Kähönen. M; Jula. A; Nieminem. M; Moilanen. L; Kesäniemi. Y; Lehtimäki. T; Hulkkonen. J; (2008). Interleukin-6 promoter polymorphism and cardiovascular risk factors; *Atherosclerosis*; 32; 1-19.
53. Rivera. F; Campos. A; Parera. M; Rodrigo. C; Egido. J; Olivares. J; (1996); Síntesis de interleucina-6 por células mononucleares de sangre periférica en la nefropatía IgA idiopática; *Nefrología*; 16(6); 513-518
54. Rooitelman. J; Olender. EH; Bar-Nun. S; Dunn. WA; Simonni. RD; (1992). Immunological evidence for 8 spans in the membrane domain of HMGCR: implications of the enzyme degradation in the endoplasmic reticulum; *J. Cell Biol*; 117; 959-973.
55. Sachiki. T; et al; (2001); Dietary protein and weight reduction; *Circulation*; 104; 1869-1874.
56. Sánchez. JC; (2005); Papel fisiológico de la leptina; *Colombia Medica*; 36(1); 50-59
57. Sánchez-Pobre. BP; Tesis Doctoral; Mecanismos de citotoxicidad del factor de necrosis tumoral- $\alpha$  en las líneas celulares I929 y HEPG2; Universidad Complutense de Madrid; Facultad de Medicina; 1997; 4-51.
58. Serra A; Romero R; (2009); La obesidad como causa de la enfermedad renal; *Revista Española de la Obesidad*; 7 (4); 128-135.
59. Smith. S; (1994); The animal fatty acid synthase: one gene. one polypeptide. seven enzymes; *FASEB J*; 8; 21248-1259.
60. Soriano S; (2004); Definición y clasificación de los estadios de la enfermedad renal crónica; *Rev . Nefrología*; 24; 27-34.
61. Torra. R; Tazon. B; Ars. E; Ballarin. J; (2005); La nefropatía del Colágeno IV; *Nefrología*; 25 (2); 29-32
62. Torrades. S; (2005); Diabetes tipo II: como frenar la lipotoxicidad; *OFFARM*; 25(4); 118-122.



63. Torres N; Torre-Villalvazo I; Tovar A; (2006); Regulation of lipid metabolism by soy protein and its implication in diseases mediated by lipids disorders; *Fisiología de la Nutrición*, INNSZ-.
64. Torres. TN; Tovar. PA; (2008); La historia del uso de la soya en México. Su valor nutricional y su efecto en la salud; *Salud Publica Mex.*; 51; 246-254.
65. Tovar A, Manzano N; Torres N; (2005); Regulación del metabolismo del colesterol y ácidos grasos en el síndrome nefrótico experimental por las proteínas que se unen a los elementos regulatorios de los esteroides (SREBP's): efecto de la soya; *Gac Med Mex*; 141(5); 407-415.
66. Tresguerees. JAF; *Fisiología Humana*. 1a. edición. Editorial Interamericana Mc. Graw Hill. 1992. 435-438.
67. Unger, RH; (2003); Minireview: weapons of lean body mass destruction. The role of ectopic lipids in the metabolic syndrome; *Endocrinology*; 144 (12); 5159-5165.
68. Unger, RH; (2003); The physiology of cellular liporegulation. *Annu Rev Physiol*; 65; 333-347.
69. Unger. RH; (1995); Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity; *Diabetes*; 44; 863-870.
70. Voet. D.; Voet. J.G.: *Bioquímica*. Ediciones Omega. Barcelona. España. 1992. pp. 665-668. 682.
71. Wagner. P; (2001) La podocina y los síndromes nefróticos corticorresistentes; *Acta Medica Peruana*; 20 (3); 130-132.
72. Whaba. IM; Mak. RH; (2007); Obesity and Obesity-Initiated Metabolic Syndrome: Mechanistic Links to Chronic Kidney Disease; *Clin J Am Soc Nephrol*; 2; 550-562.
73. Zucker. LM; (1965); Hereditary obesity in the rat associated with hiperlipemia; *Ann N Y. Acad Sci.*; 131; 447-58

74. Zucker. LM; Zucker TF; (1961); Fatty. a new mutation in the rat; J. Hered;  
52; 275-278.
75. Zúñiga. AV; (2002); La inflamación y Fibrosis renales; Nefrología Mexicana;  
39(1) 25-35
76. Zúñiga. AV; (2002); La inflamación y Fibrosis renales; Nefrología Mexicana;  
39(1) 25-35