



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON TRIBUTIRINA VÍA ORAL EN
RATAS CON DIABETES E INSUFICIENCIA RENAL**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:

SANDRA ALEYDA BARRIGA GUTIÉRREZ

TUTOR PRINCIPAL:

DINORAH VARGAS ESTRADA, FMVZ-UNAM

COMITÉ TUTORAL:

JORGE LUNA DEL VILLAR VELASCO, FMVZ-UNAM

JOSÉ JUAN ESCOBAR CHÁVEZ, FESC-UNAM

Ciudad Universitaria, Cd de México, agosto 2020.



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.

Dedicatoria:

A las personas que viven bajo esta condición y a sus familiares que, como yo, lidian con esta realidad, fue la mejor manera que encontré de ayudar...

Agradecimientos

Gracias totales a la doctora Dinorah Vargas Estrada, por la oportunidad, por ser una gran tutora, una gran compañera y maestra, tanto en el ámbito académico como en la vida, ha sido sin duda una fortuna poder trabajar con ella, estuvo ahí siempre que lo necesité, permitiéndome aprender de ella en muchos aspectos, mostrándome la importancia del trabajo en equipo, siempre dispuesta a apoyar y a trabajar por el equipo, ¡mil gracias por todo!

Gracias a la Unidad de Investigación Preclínica (UNIPREC), conjunto E de la Facultad de Química, por permitirnos llevar a cabo el experimento de nuestra investigación en las instalaciones de su Unidad de Experimentación Animal (UNEXA), Gracias M. en C. Isabel Gracia Mora, por todo el apoyo recibido, desde la asignación de una sala en el bioterio hasta el facilitarnos un equipo de trabajo con experiencia que nos permitió trabajar de manera eficiente, adecuada y siempre cuidando la ética y el bienestar animal.

Gracias Héctor Rico Morales, Lucia Macías Rosales y Abel Zapata Arenas por todo el apoyo recibido, por ser el gran equipo para la toma de muestras, siempre pacientes, siempre con la mejor actitud, siempre aportando conocimiento e ideas propositivas. Gracias a las patólogas clínicas Helena García Rodríguez y Vivian Meléndez Pérez por el procesamiento de las muestras sanguíneas y de orina. M. en C. Marisol Rivera Huerta por toda la paciencia y todas las aportaciones a lo largo del experimento, a Vicente Antonio Ávila Reyes que participo realizando las necropsias, gracias porque sabemos que fue un momento de gran estrés para todos y aun así estuviste ahí paciente.

Se agradece al proyecto PAPIIT IT202317 por el financiamiento parcial de algunos de los materiales y reactivos utilizados en la tesis. Agradezco a los laboratorios BIOQUIFA por la donación de la tributirina utilizada en el presente trabajo.

Gracias a mi comité tutorial, Doctor Jorge Luna Del Villar Velazco y Doctor José Juan Escobar Chávez, por todas las aportaciones, la paciencia y la entrega a mi trabajo.

Gracias a la Doctora Sheila Irais Peña Corona por su apoyo en la parte estadística, y porque como compañera siempre mostro disposición para ayudar.

Gracias a mis compañeros por todo el apoyo y por ayudarme a resolver dudas, compartir su conocimiento, los consejos y todo eso que ahora forma parte de mi experiencia y desempeño en el posgrado, gracias Alonso y Eduardo, tan diferentes y tan importantes en esta etapa.

Gracias doctora María del Carmen Frías Domínguez por tener las palabras justas en el momento exacto.

Gracias a mi familia por ser la inspiración para esta investigación y por la cual no me rendí cuando la situación parecía no favorecerme.

Y gracias a todas aquellas personas que fueron mis ángeles dándome palabras de aliento cuando amanecía con poca fuerza de voluntad o que compartieron conmigo risas y sarcasmos permitiendo aligerar los momentos pesados.

Resumen

La diabetes mellitus (DM) se define como un desorden metabólico crónico complejo caracterizado por niveles glucémicos altos debido a defectos en la secreción de insulina, a su acción o ambas, generando anomalías del metabolismo de los carbohidratos, las grasas y las proteínas. La DM afecta la totalidad de los órganos y tejidos, originando complicaciones crónicas tanto micro como macrovasculares, las primeras relacionadas con daño al endotelio y músculo liso manifestándose como nefropatía, neuropatía y retinopatía diabéticas, las lesiones macrovasculares se observan como infartos al miocardio y derrame cerebral principalmente. La nefropatía diabética (ND) se trata de lesiones renales originadas por afección de los pequeños vasos, es una lesión exclusiva de DM ya que ocurre por la presencia de hiperglucemia crónica, en la que se afecta la microcirculación renal originando una serie de alteraciones funcionales y estructurales principalmente a nivel glomerular. La insuficiencia renal constituye un suceso temprano en la progresión a la nefropatía diabética, pues la hiperglucemia causa hipertrofia en las células mesangiales, con incremento de la transcripción génica y secreción de proteínas de matriz extracelular, como colágena, laminina y fibronectina. A nivel digestivo, la microbiota intestinal y sus metabolitos juegan un papel fundamental en la fisiopatología del huésped. Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), ejercen efectos reguladores positivos sobre el metabolismo energético, la secreción hormonal, la inflamación, la hipertensión y el cáncer, y su función está relacionada con la activación de receptores acoplados a proteínas G transmembranales y la inhibición de la acetilación de histonas. La creciente evidencia sugiere que los AGCC pueden tener un efecto positivo en la enfermedad renal a través de la activación del eje intestino-riñón. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la suplementación con tributirina, un AGCC derivado del butirato, en ratas Wistar con diabetes e insuficiencia renal. Para ello se utilizaron 35 ratas Wistar macho de 8 semanas de edad, divididas en 3 grupos, dos de los cuales fueron sometidos a un modelo de nefropatía por hiperglucemia crónica mediante la administración de estreptozocina (STZ) vía endovenosa, el grupo tratamiento 1 recibió una suplementación con tributirina, mientras que el grupo control negativo recibió una administración de solución salina fisiológica, se realizaron 6 muestreos por grupo para la realización de exámenes de hemograma, bioquímica y urianálisis para observar el comportamiento de los analitos a lo

largo del estudio. Los resultados de laboratorio evidenciaron que el modelo utilizado para la investigación resultó ser útil para la medición de los objetivos. Se demostró que la suplementación con tributirina por vía oral ayuda a disminuir los niveles de glucemia, dando por consecuencia la disminución del daño metabólico por este incremento de glucosa, mejora los valores de enzimas hepáticas, y retarda la presentación clínica de ND en el grupo experimental con respecto al Grupo Control Negativo.

Palabras clave: Diabetes, enfermedad renal, ácidos grasos de cadena corta, tributirina, iHDAC.

Abstract

Diabetes mellitus is defined as a complex chronic metabolic disorder characterized by high glycemic levels due to defects in insulin secretion, its action or both. This results in abnormalities in the metabolism of carbohydrates, fats and proteins. Diabetes mellitus affects all organs and tissues, causing both micro and macrovascular chronic complications, the first ones related to damage to the endothelium and smooth muscle manifesting as diabetic nephropathy, neuropathy and retinopathy, macrovascular injuries are observed as myocardial infarctions and effusion mainly brain. Diabetic nephropathy refers exclusively to kidney lesions caused by involvement of the small vessels, thus being the exclusive chronic injury of diabetes mellitus, in which the renal microcirculation is affected, causing a series of functional and structural alterations, mainly at the glomerular level. Kidney damage constitutes an early event in the progression to diabetic nephropathy, since hyperglycemia causes hypertrophy in mesangial cells, with increased gene transcription and secretion of extracellular matrix proteins, such as collagen, laminin, and fibronectin. The intestinal microbiota and its metabolites play a fundamental role in the pathophysiology of the host. Short Chain Fatty Acids (AGCC) exert positive regulatory effects on energy metabolism, hormonal secretion, inflammation, hypertension and cancer, and their function is related to the activation of transmembrane G protein-coupled receptors and inhibition of histone acetylation. Mounting evidence suggests that AGCCs are involved in kidney disease through activation of the gut-kidney axis. The objective of the present work was to evaluate the effect

of supplementation with tributyrin, an AGCC derived from butyrate, in Wistar rats with diabetes and kidney failure. For this, 8-week-old male Wistar rats were used, divided into 3 groups, two of which were subjected to a model of chronic hyperglycemic nephropathy by administration of streptozocin (STZ) intravenously, 6 samples were carried out per group for carrying out hemogram, biochemistry and urinalysis tests to observe the behavior of analytes throughout the study. The laboratory results showed that the model used for the investigation turned out to be useful. It is shown that oral tributyrin supplementation helps to decrease blood glucose levels, resulting in decreased metabolic damage due to hyperglycemia, improves liver enzyme values as well as delaying the clinical presentation of DN in the treatment group compared to the negative control group.

Key words: Diabetes, kidney disease, short chain fatty acids, tributyrin, HDACi

Contenido

Resumen	III
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	7
2.2 Efecto en la permeabilidad intestinal	10
2.3 Efecto en el sistema inmune.....	10
2.4 Efecto hipoglucemiante	13
2.5 Efecto en HDAC.....	14
2.6 Efecto en síndrome de intestino irritable	15
2.7 Efecto antioxidante	16
2.8 Efecto en el control del apetito	16
3. FARMACOCINÉTICA DEL ÁCIDO BUTÍRICO.....	16
4. TRIBUTIRINA.....	18
4.1 Farmacocinética	18
4.2 Dosis y efectos de la tributirina	19
5. DISBIOSIS EN INDIVIDUOS CON DIABETES Y NEFROPATÍA	20
5.1 Efecto en la enfermedad renal crónica.....	21
5.2 Microbioma.....	¡Error! Marcador no definido.
6. ÁCIDO BUTÍRICO Y SU ROL EN LA DIABETES Y ENFERMEDAD RENAL.....	22
6.1 La inflamación y su relación con el desarrollo de DMT2 al inducir resistencia a la insulina y la disfunción de las células β	25
6.2 Respuesta proinflamatoria de las células inmunes en condiciones de hiperglucemia	27
6.3 Diferentes vías metabólicas impulsan respuestas inmunes pro o antiinflamatorias	28
6.4 Inflamación, metainflamación y senescencia	30

6.5 Las células senescentes dependen del consumo de glucosa para su actividad metabólica ..	32
a. La contribución de la microbiota a la inflamación y a la metainflamación	32
7. FISIOPATOLOGÍA DE LA MICROANGIOPATÍA DIABÉTICA.....	33
7.1 Vía del poliol.....	35
7.2 La glicosilación no enzimática de las proteínas	36
7.2.1 Etapa temprana (iniciación)	36
7.2.2 Etapa tardía.....	38
7.3 Efectos de los AGE que desencadenan la microangiopatía diabética	39
7.4 Incremento del estrés oxidativo (EO) causado por la glucoxidación y la autoxidación de la glucosa	40
7.5 Perspectiva integral de la patogenia del daño microvascular	42
8. NEFROPATÍA DIABÉTICA.....	43
8.1 Contribución de los AGE a la nefropatía	45
8.2 Papel del aumento del sorbitol.....	46
8.3 Flujo de calcio al intracelular, otra fuente de lesión endotelial.....	48
8.4 El eje intestino-riñón.....	49
9. DIAGNÓSTICO DE LA DIABETES MELLITUS.....	52
10. DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD RENAL.....	54
11. JUSTIFICACIÓN	56
12. HIPÓTESIS.....	56
13. OBJETIVOS.....	56
13.1 Objetivo general:.....	56
13.2 Objetivos particulares:	57
14. MATERIAL Y MÉTODOS	57
14.1 Primera fase	58

14.1.1	Diseño experimental	59
14.1.2	Muestreo sanguíneo	59
14.1.3	Inducción experimental de Diabetes mellitus	61
14.2	Segunda fase	63
14.3	Tercera fase.....	63
15.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	64
16.	RESULTADOS	64
16.1	Hemograma	64
16.2	Bioquímica sanguínea	65
16.3	Urianálisis.....	68
16.4	Curvas de glucosa.....	73
17.	DISCUSIÓN	75
17.1	Caracterización del modelo de estudio	75
17.2	Hematocrito	75
17.3	Bioquímica sanguínea	76
17.4	Urianálisis.....	78
17.5	Curvas de glucosa.....	79
18.	CONCLUSIONES	79
19.	PERSPECTIVAS	80
	BIBLIOGRAFÍA.....	81
	ANEXOS	88
21.2	Análisis garantizado de la tributirina	89
21.3	Ficha técnica del alimento para rata.....	99

Lista de gráficas y tablas.

Gráfica 1. Valores de glucosa por periodo

Gráfica 2. Gráfica de mínimos cuadrados para la curva de glucosa pretratamiento

Gráfica 3. Distribución de los valores de glucosa pretratamiento.

Gráfica 4. Gráfica de mínimos cuadrados para la curva de glucosa postratamiento.

Gráfica 5. Curva de glucosa postratamiento.

Tabla 1. Efecto del ácido butírico, fenil butírico y ac. valproico relacionadas a HDAC en enfermedades en humanos.

Tabla 2. Conformación de los grupos del estudio.

Tabla 3. Valores de hemograma por periodo por grupo.

Tabla 4. Comparación de medias de los resultados de hemograma por tratamiento.

Tabla 5. Valores de bioquímica sanguínea por periodo por grupo.

Tabla 6. Comparación de medias de los resultados de bioquímica sanguínea por tratamiento.

Tabla 7. Valores de urianálisis por período por grupo.

Tabla 8. Comparación de medias de los resultados de urianálisis por tratamiento.

Lista de figuras e imágenes.

Figura 1. Metabolismo de los ácidos grasos de cadena corta	8
Figura 2. Estructura química de la tributirina	19
Figura 3. Diferentes vías metabólicas activadas en macrófagos pro y antiinflamatorios (M1/M2) por sustrato energético	29
Figura 4. Efecto de los ácidos grasos de cadena corta en la patología de la enfermedad renal.	48
Figura 5. Eje intestino-riñón en la patología de la enfermedad renal.	51
Figura 6. Fases del experimento	¡Error! Marcador no definido.
Imagen 1. Mesa con material para toma de muestra sanguínea	61
Imagen 2. Racks metabólicos para toma de muestra urinaria	61
Imagen 3. Alojamiento de las ratas	62
Imagen 4. Administración EV de STZ a ratas.	62

Abreviaturas

α -SMA: Gen que codifica para la α actina

AGCC: Ácidos Grasos de Cadena Corta.

AGE: Productos de glicación avanzada

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

CM: Células Mesangiales

DAG: Diacil Glicerol

DSS: Dextrano Sulfato de Sodio

DM: Diabetes mellitus

EC: Estrés Carbolítico

ER: Estrés Reticular, induce a muerte celular.

EMT: Transición Epitelial a Mesenquimatosa

eNOS: Óxido Nítrico Sintasa endotelial

EO: Estrés Oxidativo

ERA: Enfermedad Relacionada a la Edad

ERC: Enfermedad Renal Crónica

ERK: Quinasa reguladora de señales extracelulares

ESRD: Enfermedad Renal en Estadio Renal

EV: Vía endovenosa

FFAR2/3: Receptor de Ácidos Grasos Libres tipo 2 y tipo 3

FOXO1: Proteína Factor de transcripción O1, O3

GLUT4: Transportador de Glucosa Tipo 4

GPCR: Proteína G transmembranal asociada.

GPR41: Receptor Acoplado a Proteína G tipo 41, 43

H₂O₂: Peróxido de hidróxido

HAT: Histona Acetiltransferasa

HbF: Hemoglobina Fetal

HDAC: Histona Deacetilasa

HDACi: Inhibidores de Histona Deacetilasa

HFD: Dieta alta en grasa (por sus siglas en ingles)

IFN- γ : Interferón gamma

IgA: Inmunoglobulina A

IL-6: Interleucina 6

IL-12: Interleucina 12

iNOS: Óxido Nítrico Sintasa inducible

JNK: Quinasas c-Jun N-terminal

KH-1: Hexoquinasa-1

LPS: Lipopolisacárido

MAPK: Proteínas Activadas por Mitógenos

MEC: Matriz Extracelular

ND: Nefropatía Diabética

NF-KB: Factor Nuclear KB

NH₃: Grupo amino

NK: Células Natural Killer

NK/DOQI: National Fundation Kidney Disease Outcomes Quality

NLRP3/6: Proteínas tipo punto asociadas a apoptosis

NO: Óxido Nítrico

O⁻: Anión superóxido

OAT: transportadores de aniones orgánicos

OH⁻: Iones peróxido

p21: Proteína con actividad supresora en células tumorales

PAS+: Ácido periyódico reactivo de Schiff

PKM2: Isoenzimas de piruvato quinasa M2

PMN: Células Polimorfonucleares

PV: Peso vivo

PYY: Péptido YY

p27/p57: Proteína inhibidora de quinasas dependientes de ciclinas

ROS: Espécies Reactivas de Oxígeno

SAPS: Fenotipo asociado a la senescencia

SPF: Organismo libre de patógenos específicos

SII: Síndrome de Intestino Irritable

tFF3: Gen de síntesis de factores tróficos

TID: Tres veces al día

TGF- β : Factor de Crecimiento Transformante – β

TLR: Receptores tipo Toll

TNF: Factor de Necrosis Tumoral

VCAM-1: Proteína 1 de adhesión celular vascular

ZO-1: Zónula occludens-1

1. INTRODUCCIÓN

La DM es una enfermedad crónica degenerativa que se caracteriza por una manifestación clínica de diversos procesos fisiopatológicos desencadenados por la presencia de hiperglucemia por un déficit en el metabolismo de la glucosa, consecuencia de una disminución en la producción y/o acción de la insulina (Mayer-Davis y col., 2018). El resultado de una diabetes no controlada es la hiperglucemia, que si persiste de forma crónica terminará por dañar a los órganos y tejidos del individuo, especialmente el tejido neurológico y vascular. Los signos clínicos principales de la enfermedad son: poliuria, polidipsia, polifagia y agotamiento severo*. Los péptidos producidos por el páncreas son insulina por las células beta y glucagón por las células alfa, la liberación de insulina está regulada por el aumento de los niveles de glucosa sanguínea, la molécula de insulina consta de dos cadenas de péptidos unidos por puentes disulfuro; la molécula de insulina se activa cuando el péptido C se rompe gracias a una molécula de proinsulina dentro de los gránulos secretores de las células beta. Mientras que el glucagón es el encargado de enviar señales gluconeogénicas al hígado para aumentar la presencia de glucosa sanguínea (Ochoa y col., 2017).

La DM se ha catalogado como la epidemia del siglo XXI y es considerada un reto global debido a su alta incidencia y prevalencia calculada al 2019 en 9.4% en adultos mayores de 18 años. Sólo en México representa la segunda causa de muerte en humanos, tan sólo en el 2019 fue la causa directa de 4.2 millones de muertes a nivel mundial**, y se estima que al año 2030 será la séptima causa de muerte a nivel global. De acuerdo con la Federación Mexicana de Diabetes, México ocupa el 6to lugar en diabetes en el mundo, repercutiendo en la sociedad a nivel económico y de calidad de vida, en el primero se estima que el gasto público destinado a la enfermedad y sus consecuencias es aproximadamente \$362,860 millones de dólares anuales, repercute la calidad de vida del individuo reduciendo su esperanza de vida entre 5- 10 años y presentando complicaciones agudas y crónicas.

***fmdiabetes.org**

**<https://es.statista.com/estadisticas/702480/fallecimientos-causados-por-la-diabetes-a-nivel-mundial/>

Las complicaciones agudas entre las que se encuentran hipoglucemia, cetoacidosis y síndrome hiperglucémico híperosmolar, son provocadas por un mal control metabólico, mientras que las consecuencias crónicas se deben al progreso de la enfermedad, entre las más comunes se encuentran (Hernández-Ávila y col 2013; INEGI, 2016):

- Lesiones microvasculares:
 - Retinopatía: ceguera
 - Nefropatía: insuficiencia renal terminal
 - Neuropatía
 - Pie diabético: en muchas ocasiones termina con amputaciones.
- Lesiones macrovasculares:
 - Infarto al miocardio
 - Accidentes cerebrovasculares: derrame cerebral o embolia
 - Insuficiencia circulatoria de los miembros inferiores

La diabetes se considera la segunda causa de insuficiencia renal; la ND se refiere exclusivamente a las lesiones renales originadas por afección microangiopática, siendo por ende una lesión crónica exclusiva de la DM, en la que se afecta la microcirculación renal originando una serie de alteraciones funcionales y estructurales principalmente a nivel glomerular (Mezzano A. y col, 2005). El glomérulo es una estructura con múltiples interacciones de células endoteliales, mesangiales y epiteliales que forman anillos capilares de filtración. Tanto la diabetes como la hipertensión causan la expansión gradual del glomérulo, desencadenando la disfunción endotelial y cambios hemodinámicos: pérdida de la carga eléctrica de la membrana basal glomerular y su engrosamiento, disminución en la cantidad de podocitos y la distensión mesangial, esto se ha observado en lesión glomerular inicial, lo que probablemente desencadena la glomeruloesclerosis. La reacción del tejido renal dañado se asemeja a la reacción común de la reparación de heridas, sin embargo, la recuperación de tejido funcional no siempre ocurre. Durante los 10 años posteriores al diagnóstico de diabetes, entre 5 y 10% de los individuos presentan complicaciones de tipo renal, cuya signo inicial es oligoalbuminuria que progresa al cabo del tiempo a macroproteinuria y que desencadena en una enfermedad renal en estado terminal, la cual requiere de terapia de soporte como la hemodiálisis.

El daño renal constituye un suceso temprano en la progresión a la ND, pues la hiperglucemia causa hipertrofia en las células mesangiales, con incremento de la transcripción génica y secreción de proteínas de matriz extracelular, como colágena, laminina y fibronectina (Álvarez y col., 2017). A nivel histológico se observa engrosamiento de la membrana basal glomerular y tubular, esto trae por consecuencia albuminuria y fibrosis intersticial. Además, se puede observar fibrosis glomerular e intersticial y atrofia tubular renal, lo que desencadena la insuficiencia renal (Viladoms, 2011). Calvo-Vázquez y col., 2015, realizaron una investigación acerca de la prevalencia de la enfermedad renal no diagnosticada en pacientes con diabetes mellitus tipo 2, en la cual concluye que, en ocasiones, la enfermedad no se detecta a tiempo.

Uno de los primeros signos que pueden ser indicativos de insuficiencia renal es la presencia de microalbuminuria, que debe ser tratada mediante dieta, control estricto de la glucemia, presión arterial e inclusive medicación farmacológica (Torres y Zacarias, 2002). Varios mecanismos están involucrados en la patogenia de la ND, como el estrés oxidativo, las citoquinas inflamatorias y la fibrosis inducida por el factor de crecimiento transformante β . La literatura reciente destaca la importancia de los mecanismos epigenéticos en su desarrollo, los factores ambientales y de estilo de vida, que se cree que están asociadas con esta patología. Las histonas desacetilasa están involucradas en varias vías biológicas relevantes para la etiología, así como en la patogénesis de la ND. El estrés oxidativo y la inflamación crónica estimulan el factor nuclear κ B, que es el regulador clave de las citocinas proinflamatorias y quimiocinas que promueven la inflamación. La enfermedad renal crónica (ERC) al disminuir el aclaramiento de citocinas proinflamatorias se asocia al desarrollo de estrés oxidativo e inflamación, factores que contribuyen a la progresión de la enfermedad y a sus complicaciones incluyendo enfermedad cardiovascular, caquexia, anemia, entre otras (Cigarran, 2017).

Las células mesangiales (CM) del riñón son un tipo de célula importante para mantener la estructura y función normal del glomérulo, produciendo diversos factores de crecimiento y citoquinas, regulando el intercambio de matriz extracelular en la estructura. En la nefropatía diabética, se cree que las CM son el tipo de células principales responsables de la

acumulación de MEC que caracteriza la lesión, particularmente en la enfermedad temprana (Riser y col., 2010).

Según *National Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative* (NK/DOQI), la insuficiencia renal crónica se define como insuficiencia renal de más de tres meses, que se distingue por anormalidades estructurales y funcionales del riñón, o con disminución de la tasa de filtración glomerular, manifestada por anormalidades patológicas o marcadores de insuficiencia renal. El cuadro patológico generalmente se asocia a micro o macro albuminuria y retinopatía. La mayoría de los diabéticos tienen algún cambio histopatológico que puede revelar daño renal, sin embargo, suelen conservar su función renal normal durante 5 a 10 años, hasta que el daño es evidenciado por cambios en los estudios clínicos. La progresión de la enfermedad renal crónica en diabéticos con macro albuminuria es mayor en los pacientes hipertensos, lo que resalta el papel de la hipertensión en la progresión de la enfermedad renal crónica. (Calvo-Vázquez y col., 2015).

A nivel clínico, el parámetro más utilizado para evaluar la función renal es la creatinina sérica, sin embargo, sus valores no se elevan hasta que se ha producido una alteración significativa en la filtración glomerular, incluso por debajo del 50%. Además, el descenso progresivo de masa muscular que se asocia con la edad hace que la creatinina no ascienda a pesar de la pérdida fisiológica progresiva de la filtración glomerular. (Calvo-Vázquez y col., 2015).

La acumulación excesiva de matriz extracelular (MEC) en los riñones y la transición epitelial a mesenquimatosa (TEM) de las células epiteliales tubulares renales contribuye a la fibrosis renal que se asocia a nefropatía diabética. La histona deacetilasa (HDAC) determina el estado de acetilación de las histonas y, por lo tanto, controla la regulación de la expresión génica. Hyunjin y col., 2009 investigaron acerca de la histona deacetilasa-2, y encontraron que es un regulador clave de la lesión renal inducida por la diabetes y por el factor de crecimiento transformador $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$). Determinaron que las especies reactivas de oxígeno (ROS) funcionan como mediadores de la activación para HDAC y que el uso de inhibidores no selectivos de HDAC disminuye la expresión de ARNm y proteínas que componen la matriz extracelular, evitando así la transición epitelial mesenquimatosa. Además, observó que la

actividad de HDAC-2 aumentó significativamente en ratas que habían sido estimuladas con TGF- β 1.

Algunos autores mencionan que la fibrosis renal es el resultado del colapso del parénquima. El estadio final de la enfermedad renal se caracteriza por la presencia de glomeruloesclerosis, esclerosis vascular y fibrosis tubulointersticial. La glomeruloesclerosis se atribuye inicialmente a la producción desproporcionada de proteínas de la sustancia fundamental por parte de las células mesangiales, lo que genera reducción en la actividad proteolítica extracelular generada por las células. En este sentido, la producción glomerular excesiva de Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- β), la citocina clave del desarrollo de la glomeruloesclerosis y de la fibrosis tubulointersticial, estimula a las células mesangiales, y es probablemente inductor más potente de la transición mesenquimatosas epitelial. La activación de TGF- β da como resultado la activación del ciclo de deposición de MEC, mediante el aumento de la síntesis de proteínas y disminución de la degradación de la proteína de matriz, resultado de la lesión permanente del tejido. La disminución de la bioactividad de esta citocina reduce la deposición de MEC, así como el desarrollo de la fibrosis en lesiones renales experimentales.

Los niveles de ARNm y de proteína de TGF- β 1 aumentan en los riñones de animales diabéticos y también en humanos. El receptor para TGF- β 1 también está regulado de manera positiva. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son bien conocidas como moléculas señalizadoras que actúan como reguladores positivos de la lesión renal en la diabetes.

La evidencia reciente ha sugerido que los ácidos grasos de cadena corta, los cuales se originan principalmente como producto de la digestión de la fibra dietética en el intestino, juegan un papel importante en la regulación de la inmunidad, presión arterial, la glucosa y el metabolismo lipídico, y parecen ser el vínculo entre la microbiota y la homeostasis del individuo. Además de ser una fuente energética para las células epiteliales, también modulan diferentes procesos de transducción celular, a través de receptores acoplados en la proteína G y actúan como reguladores epigenéticos mediante la inhibición de la histona deacetilasa y como mediadores potenciales implicados en la vía de la autofagia. Se ha revelado una

conexión íntima entre los AGCC y la lesión renal, lo que sugiere que podrían actuar como objetivos terapéuticos en esta patología.

Como es conocido, el proceso inflamatorio renal juega un papel primario en la insuficiencia renal promoviendo glomeruloesclerosis y fibrosis intersticial. La inflamación en individuos con disbiosis intestinal está asociada con la carga bacteriana y las endotoxinas generadas por esta, lo que aumenta la permeabilidad intestinal y conduce al desarrollo de una insuficiencia renal aguda, relacionada con la infección y la aceleración de la enfermedad renal crónica. Todo esto ha propuesto la hipótesis de una conexión íntima entre el intestino y los riñones, lo que se denomina: **eje intestino riñón**.

Los efectos benéficos de los AGCC no sólo se relacionan con su propiedad para inhibir la acetilación de las histonas (HDAC), sino que también se relacionaron con su activación de receptores acoplados a proteína G transmembranal asociada (GPCR) y su efecto modulador en la vía de la autofagia.

Estudios sobre la transición entre insuficiencia renal aguda a insuficiencia renal crónica y la enfermedad renal en estado terminal indican que existen cambios en la microbiota intestinal en las enfermedades renales, y realizar modificaciones en la microbiota puede disminuir la permeabilidad intestinal. Los productos bacterianos de la pared celular como el lipopolisacárido (LPS) y peptidoglucanos, son posibles causas de inflamación en individuos con ERC, como en los animales en que la inflamación de la pared del colon está asociada con la ruptura de la barrera de unión tipo “*tight*”, lo que permite la permeabilidad intestinal y la translocación de ADN bacteriano y LPS al torrente sanguíneo (endotoxinas derivadas del intestino), y las células inmunes subyacentes (como los macrófagos, neutrófilos y linfocitos) son responsables de activar una respuesta antimicrobiana e inflamatoria. La exposición a la endotoxina iniciará una respuesta inflamatoria sistémica y estrés oxidativo, lo que inducirá y acelerará aún más la lesión renal y la enfermedad cardiovascular, incluyendo la enfermedad renal aguda y la insuficiencia renal crónica. (Huang, y col., 2017).

2. ANTECEDENTES

Los ácidos grasos son una fuente de energía esencial y son moléculas de señalización que regulan diversos procesos celulares y funciones fisiológicas. (Ichimura, y col., 2014). Los AGCC son resultado de la fermentación bacteriana de carbohidratos no digestibles y oligómeros de hexosa con diversos grados de polimerización, como polisacáridos no almidonados, almidón resistentes, oligosacáridos (inulina y oligofruktosa), disacáridos (lactosa) y alcoholes de azúcar (sorbitol y manitol). Se clasifican de acuerdo al número de carbonos y son de cadena corta porque contienen menos de 6 carbonos. El 60% de la energía que obtiene el enterocito proviene de los AGCC que son absorbidos rápidamente por el epitelio intestinal, comenzando desde estómago y alcanzando su mayor nivel de absorción en ciego y colon ascendente tanto por transporte activo como pasivo, difunden libremente a través del citosol de la mucosa y entran en la circulación venosa actuando sobre médula ósea y en otros órganos mediante circulación sistémica manteniendo su forma de ácido graso libre; éstos son principalmente tres: ácido butírico, acético y propiónico, los cuales representan aproximadamente el 83% del total de AGCC emitidos en el colon. Se metaboliza a acetil-CoA, lo que demuestra que es importante no solo para la energía, sino también para la actividad de las histonas acetiltransferasas (HAT). (Dallas y col., 2012).

De entre los AGCC estudiados, el ácido butírico es el más importante para el metabolismo de los colonocitos, ya que cerca el 95% es metabolizado *in situ*. El orden de utilización de combustibles respiratorios por el colonocito es el siguiente: butirato > acetato > glutamina > glucosa. La oxidación del butirato ha sido demostrada en modelos murinos y en el humano, después de absorbido, el butirato es oxidado y convertido en cuerpos cetónicos, como acetoacetato y β -hidroxibutirato, implicados en la síntesis de ATP (Figura 1). El metabolismo puede también activar proteinasas específicas, promoviendo el trofismo celular por la generación, a partir acetil-CoA, de mevolanato, que actúa en la vía para la biosíntesis del colesterol y en la activación de la proteína G. Defectos en el metabolismo del butirato pueden estar envueltos en la patogénesis de la colitis ulcerativa, pues los colonocitos en pacientes con esta enfermedad, presentan una disminución en la oxidación de butirato con respecto a colonocitos sin anormalidades en la mucosa. Estudios recientes han identificado receptores

de ácidos grasos libres acoplados a proteínas de membrana catalogados como “huérfanos” que están involucrados en el metabolismo energético en varios tejidos: adiposo, intestinal e inmune. Se ha detectado que la expresión de estos receptores en células intestinales está ligada a la homeostasis energética. Además, se han encontrado abundantes receptores de AGCC a nivel de ganglios simpáticos, la activación de estos receptores promueve directamente la liberación de noradrenalina de las neuronas simpáticas. En contraste, en condiciones de ayuno los ácidos grasos suprimen el gasto energético. Por lo que se deduce que los receptores de AGCC regulan la actividad simpática al detectar el estado nutricional del cuerpo, manteniendo así la homeostasis de la energía de este. Además del sodio, los AGCC proveen también la absorción de potasio y agua, lo que les confiere un importante efecto anti secretorio. Se ha observado en estudios experimentales que una reducción de la concentración de AGCC en el lumen intestinal está relacionada con cuadros diarreicos. En concordancia, una infusión de estos o simplemente de butirato puede aumentar significativamente la absorción de sodio y agua por los colonocitos.

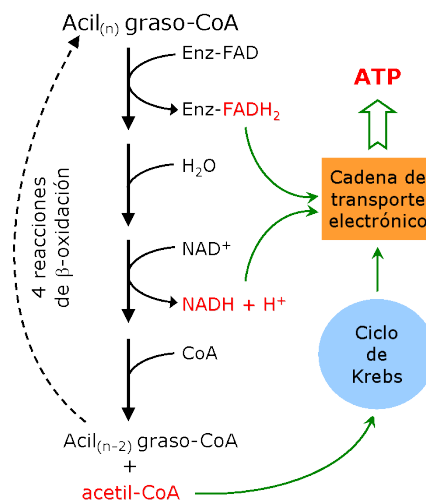


Figura 1. Metabolismo de los ácidos grasos de cadena corta

Kelly y col., 2015 reportaron el papel del butirato en el consumo de CO_2 a nivel intestinal, dando como resultado la estabilización del factor inducible de hipoxia (HIF), factor de transcripción involucrado en la protección de barrera, también reportaron la observación de que el uso de antibióticos provoca reducción de la producción de butirato en colon, así como de HIF, aseverando que la concentración de ambos puede ser restaurada por la

suplementación con tributirato. (Kelly y col., 2015). En humanos ha podido observarse el mismo efecto, un estudio demostró que los enemas a base de AGCC restauran la absorción acuosa en pacientes con diarrea. En el síndrome de intestino corto, donde se puede observar la pérdida considerable de agua y sodio, el efecto antidiarreico de los AGCC podría tener relevancia clínica, promoviendo la mejora de los cuadros diarreicos, disminuyendo la necesidad de la terapia de líquidos en el individuo. Esto debido a que el intestino delgado y el colon llevan a cabo la función de absorción de iones sodio, generando un gasto de ATP, sin embargo, la presencia de AGCC estimula esta absorción. La presencia intracelular de butirato aumenta los niveles de gas carbónico, que posteriormente suministran el número de protones para la absorción de sodio por el canal de iones Na^+/H^+ en la superficie del epitelio (Saemann y col., 2002). Otros estudios reportaron que por cada 10 nmol de AGCC se absorben cerca de 40mmol de Sodio y 360 ml de agua (Ruppin y col., 1980; Márquez, 2003).

Además de ser una fuente importante de energía para los colonocitos, el butirato también interviene en varias funciones celulares que afectan la salud e integridad del colon. Posee efecto anticancerígeno y antiinflamatorio, puede alterar la barrera intestinal e interviene en la saciedad y el estrés oxidativo. Watkins y col., publicaron en el año 1999 los efectos proapoptóticos del ácido butírico en células cancerígenas en colon, observando el mismo efecto en células cancerígenas de hígado en estudios *in vitro*. En el año 2011 se le atribuyen propiedades de inhibición de la síntesis de factor de necrosis tumoral ($\text{TNF-}\alpha$) mediante la atenuación de la activación del factor nuclear κB ($\text{NF-}\kappa\text{B}$) en ratas con lesión hepática inducida por lipopolisacárido (LPS) que recibieron un suplemento vía oral con tributirato. Los investigadores comprobaron que esta suplementación aumentaba la concentración de tributirato en circulación portal, además de observarse la atenuación de la respuesta inflamatoria. (Miyoshi y col, 2011).

2.1 Efecto en cáncer

El butirato también potencia la acción de quimioterapéuticos. Tratamientos en líneas celulares de leucemia linfoblástica aguda, muestran aumento en los efectos citotóxicos de los quimioterapéuticos, así como un mejor efecto antineoplásico al usar de manera simultánea

medicaciones de butirato, observando un efecto sinérgico después de la medicación, resultando en la reducción significativa de la proliferación celular (Kim S y col., 2013).

Esta propiedad anticancerígena se debe principalmente a la capacidad del butirato para hiperacetilar histonas. Estudios *in vitro* han demostrado la capacidad e inhibición de la enzima histona desacetilasa, lo que aumenta la concentración de histonas acetiladas, afectando la organización de la cromatina. Esto permite que el ADN se vuelva más accesible a factores de transcripción responsables de activar genes específicos para la apoptosis. El tratamiento de líneas celulares de cáncer de colon con butirato resulto en la hiperacetilación de histonas H3 y H4, además del aumento en la expresión de p21, proteína que ejerce la actividad supresora en células tumorales (Koh A. y col., 2016).

Existe un efecto conocido como: la paradoja del butirato; este efecto depende de los diferentes perfiles metabólicos para las células. Las células neoplásicas no utilizan el butirato como fuente de energía, prefieren sustratos como la glucosa. Este mecanismo permite que este nutrimento pueda actuar de manera directa en la regulación de la expresión génica, induciendo apoptosis en estas células que presentan un ciclo celular alterado. (Kim S y col., 2013).

2.2 Efecto en la permeabilidad intestinal

El butirato, en bajas concentraciones, induce la disminución de la permeabilidad intestinal, todo esto relacionado al aumento en la expresión de proteínas de unión intercelular, en concentraciones altas presenta un efecto contrario, al observarse un aumento en la permeabilidad intestinal provocando la disminución en el recambio celular por el efecto HDACi en las células madre intestinales. Este ácido graso también evita la translocación bacteriana, aumentando la protección contra *Campylobacter jejuni* Además de aumentar la producción de moco por su acción en las células productoras de mucina, lo que sirve como barrera física que evita la traslocación bacteriana. (Kim S y col., 2013.)

2.3 Efecto en el sistema inmune

Otras investigaciones mostraron la influencia del butirato en el aumento de la síntesis de mucina y también en la expresión de tff3, gen responsable de la síntesis de factores tróficos

y de péptidos que constituyen el moco. Diversos estudios indican que metabolitos bacterianos como el butirato, pueden afectar la respuesta inmune del hospedero, aumentando la actividad inmunomoduladora. Butirato puede generar el aumento de la actividad antiinflamatoria a través de la inhibición de la producción y señalización de IFN- γ y de la disminución de la expresión de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, iNOS y de metaloproteinasas. Además, aumenta la expresión de IL-10 en monocitos humanos (Li M y col., 2018).

También tiene múltiples efectos en leucocitos, particularmente en células polimorfonucleares, alterando el pH citoplasmático, la concentración de calcio, el metabolismo de oxígeno, la fagocitosis, la proliferación celular y la distribución de actina centro de la célula.

Dentro de los mecanismos propuestos para la acción inmune del butirato, la supresión del factor nuclear kappa B (NF- κ B) es la más estudiada. El NF- κ B es un factor de transcripción que controla la expresión de genes que codifican citocinas proinflamatorias, enzimas inductoras de la inflamación, moléculas de adhesión, factores de crecimiento, algunas proteínas de fase aguda y receptores inmunes.

Algunos investigadores que se han interesado en los AGCC inicialmente se probaron en enfermedades como la anemia donde se observó que estimulaba la producción de hemoglobina fetal (HbF), particularmente en anemia falciforme; Además otros estudios dieron por resultado la observación del efecto inmunomodulador mediante la inhibición en la producción de citocinas proinflamatorias, disminuyendo la cascada de activación del NF- κ B. Estudios en psiquiatría probaron tratamientos que exhibieron una actividad neuroprotectora de los AGCC revirtiendo signos de Alzheimer, así como atrofia muscular en modelos animales de ratón y rata, así como en humanos mediante la inhibición de Histonas Deacetilasas (HDAC), en otros estudios de neurología se observó que ayudan en la disminución del dolor neuropático, y mejora la memoria y el aprendizaje en animales de laboratorio. (Kim, 2013).

Otras investigaciones demuestran que el butirato puede modular la actividad del NF- κ B en diferentes tipos celulares, incluyendo las líneas de células cancerosas, células aisladas de la

lámina propia del colon, macrófagos, neutrófilos y monocitos. La habilidad del butirato para modular la actividad de NF-kB está relacionada con el potencial en inhibir las proteínas desacetilasas, en acción similar a la observada con la histona desacetilasa, inhibiendo la transcripción de este factor. Tabla 1.

Con relación a la inmunidad adaptativa, estudios con linfocitos provenientes de linfonodos mesentéricos demostraron que el butirato posee efecto inmunomodulador con acción inhibitoria semejante a la encontrada en otras células como los macrófagos, neutrófilos y células dendríticas. En cultivos de linfocitos, la administración de butirato al medio de cultivo inhibió la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-2 e IFN- γ , además de promover cambios fenotípicos de las células Th1 para Th2, debido a defectos en la producción de IL-12 y supresión de la expresión del receptor de esta misma citocina.

En humanos, estudios demuestran que 5 de 10 pacientes con colitis ulcerativa han respondido a la administración del butirato, reflejando una mejora en la inflamación; diferentes estudios demuestran que pacientes con mala respuesta a tratamientos con corticoides, responden bien al tratamiento de AGCC. Otros estudios clínicos avalan el uso de tratamientos para colitis ulcerativa, demostrando mejoras en parámetros histológicos e inflamatorios, disminución en la activación de NF-kB y menor infiltración de células inflamatorias en la mucosa colónica. La combinación de butirato en conjunto con fármacos antiinflamatorios como la mesalazina, también muestran eficiencia en estos pacientes. Sin embargo, existen estudios similares que presentan resultados opuestos (Steinhart y col., 1996; Breuer y col., 1997).

Hablando de la administración oral de butirato, son muy pocos los estudios *in vivo* y estos presentan resultados contradictorios.

Tabla 1. Efecto del ácido butírico, fenil butírico y ac. Valproico relacionadas a HDAC en enfermedades en humanos. KIM S y col., 2013.				
Patología/ proceso	Relevancia	Ac. Butírico	Ac. Fenilbutírico	Ac. Valproico
Anemia	Inhibición de HDAC estimula producción de hemoglobina fetal (HbF). Particularmente en “anemia falciforme”	Humano Rata	Humano	Humano

Cáncer	Inhibidores de HDAC aumentan la sensibilidad celular a múltiples quimoterapéuticos.	Ratón	Humano	Humano
Modulación inmune	Inhibiciones de HDAC con efecto antiinflamatorio, disminuyendo la cascada de activación de NF-kB e inhibiendo la producción de citocinas inflamatorias.	Ratón	Ratón	Ratón
Neurología/ psiquiatría	Inhibidores de HDAC en tratamiento psiquiátricos, exhiben propiedades neuroprotectoras. ha revertido síntomas en modelos animales de Alzheimer's, ALS y atrofia muscular. Han demostrado reducir la severidad del dolor neuropático, mejoran la memoria y el aprendizaje en animales de laboratorio.	Ratón	Humanos Rata Ratón	Ratón Humano
Otros	Enfermedad intestinal inflamatoria (ac. Butírico) Diabetes (fenil butirato) VIH (Ac. Valproico)	Humanos	Humanos	Humanos

2.4 Efecto hipoglucemiante

Se ha estudiado el efecto de dietas con suplementación de butirato al 1% en lechones y ratas con diabetes, se observó que los animales suplementados mostraron mejor absorción hepática de los nutrimentos, menor predisposición de resistencia a la insulina y mayores niveles de insulina en sangre, así como menor concentración de glucosa circulante. Estudios en aterogénesis señalaron que el butirato reduce 50% de aterosclerosis en aorta y válvula aórtica, reduciendo la acción de citocinas en el área de inflamación (Aguilar y col, 2014). En estudios más complejos, el butirato de sodio ha demostrado reducir la inflamación y el daño oxidativo en ratas con lesión renal aguda inducida con medio de contraste (Machado y col, 2012). Otros estudios abordan la suplementación por vías de administración intravenosa en comparación con la administración oral evidenciando a esta última como una opción viable en la implementación de protocolos clínicos para diversas enfermedades.

2.5 Efecto en HDAC

Las investigaciones demuestran que los derivados de butirato, como el butirato de sodio (NaB) mejoran algunas condiciones fisiopatológicas en diversos modelos de estudio mediante la inhibición de HDAC. El NaB activa los genes del desarrollo pancreático temprano en células madre embrionarias y aumenta la diferenciación de células beta, así como la expresión de genes de insulina en líneas de células de islotes pancreáticos de rata. Además de aumentar la fosforilación de la quinasa reguladora de señales extracelulares (ERK) y modula la vía de proteínas activadas por mitógenos (MAPK) que conduce a la proliferación celular, aunado a su acción evitando la permeabilidad intestinal, este efecto se ha estudiado en ratas recién nacidas. En un estudio en ratas juveniles con diabetes tipo 2 mostró mejorar la sensibilidad a la insulina, aumentar el gasto energético, así como mejorar el almacenamiento de glucógeno hepático. (Khan and Jena, 2014).

Otras investigaciones han clasificado al butirato de sodio como un inhibidor no selectivo de histona deacetilasa (HDACi) que inhibe a la mayoría de las histonas con excepción de la clase III. En concentraciones milimolares aumenta la acetilación de histonas por inhibición de HDAC tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*. Además, dos moléculas de NaB pueden inhibir las HDAC al ocupar sus sitios hidrófobos. El butirato inhibe la producción de citocinas proinflamatorias con el TNF- α y, por lo tanto, puede reducir la inflamación. Recientemente se ha informado que las HDAC atenúan el daño citológico en diversas patologías incluida la fibrosis pancreática inducida por L-arginina (Kanika y col, 2015).

Algunas investigaciones demuestran que la inhibición de las HDAC reduce las respuestas inflamatorias al regular la síntesis de citoquinas y al inducir la apoptosis y / o disminuir la proliferación de células inflamatorias (Moreira y col, 2003). Está comprobado que la inhibición de HDAC restaura la hipoacetilación de histonas y la disfunción transcripcional (Sinn y col., 2007), mejora la neurogénesis, disminuye el riesgo de infarto al miocardio (Qi y col., 2004; Faraco y col., 2006), disminuye la neuroinflamación (Kim y col, 2007, 2009), déficits neurológicos (Ren y col, 2004 ; Meisel y col., 2006 ; Yildirim y col, 2008), y aumenta de la plasticidad sináptica (Guan y col., 2009). También se ha informado que el NaB causa un aumento en la acetilación de histonas y la remodelación de la cromatina (Schroeder y col.

2008; Strasák y col, 2009). También se ha publicado que la inhibición de HDAC previene la apoptosis neuronal en condiciones citotóxicas e hipóxicas (Li y col, 2008). Además, se ha sugerido que la inhibición de HDAC también puede aumentar la transcripción de moléculas protectoras como factores de crecimiento, como el factor neurotrófico derivado del cerebro y el factor neurotrófico derivado de la glía.

El butirato es notable porque es un inhibidor de histona desacetilasa (HDAC) que regula la expresión génica y también sirve como la fuente de energía primaria para el epitelio del colon. Teniendo en cuenta que el butirato es un ácido graso de oxidación mitocondrial, es razonable que los genes involucrados en el metabolismo de los ácidos grasos, el metabolismo de los glicerolípidos, el ciclo del tricarboxílico (TCA), la fosforilación oxidativa y la disfunción mitocondrial también se encuentra entre las principales categorías de KEGG. (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (Dallas y col., 2011)

2.6 Efecto en síndrome de intestino irritable

Otros estudios acerca de la concentración de AGCC en individuos con síndrome de intestino irritable (SII) han permitido demostrar que pacientes con SII con estreñimiento presentan menores concentraciones de ácido propiónico y butírico, mientras que pacientes con SII y diarrea presentan mayor cantidad de butirato en heces, por lo tanto, propionato como butirato pueden servir como biomarcadores para el diagnóstico de SII. (Sun y col, 2019). Se sabe también que en estudios funcionales el butirato induce contracciones fásicas y tónicas en el músculo circular de colon de rata, (Tazoe, 2008) lo que promueve la motilidad intestinal, disminuyendo el tiempo de tránsito intestinal, que como es sabido es prolongado en pacientes con diabetes e insuficiencia renal. El butirato puede inclusive reducir el estrés oxidativo secundario a la inflamación. Estudios basados en la administración oral de butirato mostraron la disminución en la administración de neutrófilos y eosinófilos en modelos de colitis experimental inducida por DSS (Vieira y col., 2011). La disminución de estas células confiere menor producción de especies reactivas de oxígeno en el tejido intestinal, contribuyendo a la disminución del estrés oxidativo.

2.7 Efecto antioxidante

Estudios *in vitro* demuestran que la reducción del estrés oxidativo está relacionada con activación de sistemas de reparación de ADN y de enzimas antioxidantes (Hamer y col. 2008). La incubación de células colónicas con butirato resulto en disminución del daño al ADN, inducido por el peróxido de hidrógeno y en mayor medida, del sistema glutatión-S-transferasa.

2.8 Efecto en el control del apetito

Se han detectado dos receptores con afinidad por AGCC, GPR41 y GPR43 los cuales a su vez presentan ligandos FFAR3 y FFA2, otras investigaciones amplían la información describiendo la detección de ligandos- receptores para FFAR3 y FFAR2 en intestino delgado e intestino grueso y que estos receptores al ser activados desencadenan la liberación de péptido YY (PYY) y de péptido similar a glucagón (GLP-1), con lo que mejoran el control del apetito, el butirato activa el receptor GPR41, se ha encontrado que la activación del receptor GPR43 activa la respuesta inmune de células Polimorfonucleares (PMN) en sitios de infección bacteriana. (Le Poul y col., 2003: 08; Ichmura y col, 2014).

3. FARMACOCINÉTICA DEL ÁCIDO BUTÍRICO

A pesar de todos estos efectos, el uso clínico del butirato es limitado por su vida útil muy corta, de entre 3 – 4 horas, metabolismo y excreción rápidos, además de los efectos colaterales, como cefalea, náuseas, anorexia, entre otros. La administración por vía rectal también es posible y la forma más utilizada. En pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal es común la indicación de enemas con cantidades en aumento de butirato en el colon, aunque el uso tiene baja aceptación por los pacientes por ser un procedimiento incómodo y que necesita su aplicación de manera repetida durante el día.

Existen alternativas para aumentar la disponibilidad de butirato en el ambiente intestinal. Una de ellas es el uso de micropartículas de butirato que envuelven el compuesto hasta su llegada al intestino, donde se disuelven y liberan su contenido en el ambiente intestinal, disminuyendo algunas desventajas del butirato, además de aumentar el tiempo de exposición del compuesto, con la intención de generar una liberación lenta y sostenida de partículas. Un

estudio comparando el efecto antiinflamatorio del butirato y de micropartículas del butirato mostro que el uso de micropartículas parece tener efectos más favorables, ya que se observó mejor eficiencia al disminuir la adhesión de las células polimorfonucleares, la producción de iones superóxido y liberación de mieloperoxidasa por neutrófilos.

Los AGCC se absorben mediante difusión pasiva y transporte activo. La difusión pasiva se lleva a cabo gracias a la bicapa lipídica de las células del epitelio intestinal formada por fosfolípidos y colesterol principalmente. La proporción de la absorción depende del gradiente de concentración entre el lumen y la sangre portal o simplemente de la concentración luminal de AGCC. El flujo sanguíneo influye sobre el gradiente de concentración de nutrimentos y en su tasa de absorción. Se ha visto que la absorción de AGCC aumenta el flujo sanguíneo en los vasos del colon en perro y del ciego en ratas a diferentes niveles dependiendo la especie. En gatos se ha observado vasodilatación a nivel de intestino delgado, lo que permite un aumento en la absorción de butirato. El índice de absorción de AGCC no cambia por acción de inhibidores metabólicos y tampoco se han demostrado interacciones de competitividad. Se sabe que la forma disociada de los AGCC influye en la absorción del sodio, en ratas se ha observado que el sodio estimula la absorción de AGCC en el intestino delgado. Se puede considerar que los AGCC tienen un efecto antidiarreico debido a su capacidad para unirse al sodio, lo que da como consecuencia la disminución de agua en el lumen intestinal. Se considera que presenta transporte activo debido a que difunde en contra del gradiente químico y electroquímico, y porque requiere de energía para los mecanismos de regulación del pH. (Ros y col, 2011).

Se describen dos tipos de flujo de los AGCC, el porcentaje de distribución, que describe la cantidad de estos que pasa del lumen intestinal a la mucosa, y el porcentaje de transporte, que describe la cantidad de AGCC que llega a la circulación sanguínea, este último considerablemente más bajo que el de distribución, especialmente cuando la capacidad del epitelio para metabolizar AGCC no está saturada. Los AGCC pueden atravesar placenta o ser liberados a través de la leche materna e influir en la expresión génica y el desarrollo del sistema inmunológico. Se ha demostrado que, en un lumen con un pH bajo, la absorción de AGCC es más rápida.

4. TRIBUTIRINA

Una alternativa farmacológica a las limitantes del butirato es su presentación como tributirina, constituida por 3 moléculas de ácido butírico esterificadas por glicerol (Hamer y col., 2008) (Figura 2).

4.1 Farmacocinética

La tributirina se puede encontrar presente en forma natural, en la leche y sus derivados, es hidrolizada por lipasas más rápidamente que los triglicéridos de cadena larga y libera moléculas de ácido butírico en el medio intestinal. Se absorbe rápidamente y es químicamente estable en el plasma, se difunde a través de membranas biológicas y se metaboliza por las lipasas intracelulares, liberando butirato terapéuticamente eficaz directamente en la célula, además puede ser hidrolizada por lipasas intestinales y liberar butirato al lumen intestinal. Estudios relacionados a enfermedades metabólicas como diabetes y enfermedad renal han demostrado que la administración de ácido butírico en diferentes formas farmacéuticas puede ser una alternativa como tratamiento que contribuya al control metabólico de estas enfermedades.

La tributirina ha sido estudiada con la finalidad de mejorar la problemática en la farmacocinética del butirato natural como fármaco, es decir, su rápida metabolización y su incapacidad para alcanzar concentraciones farmacológicas en células neoplásicas. Se ha estudiado el efecto que tiene sobre el crecimiento, la diferenciación y la expresión del receptor de vitamina D en células de cáncer de colon en humanos. Se ha observado que la tributirina es más potente para inhibir el crecimiento e inducir la diferenciación que el butirato natural (Alvarez y col., 2012).

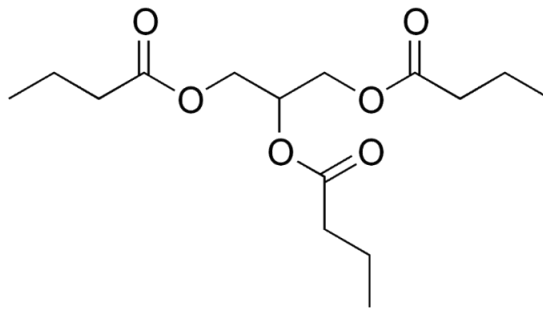


Figura 2. Estructura química de la tributirina

En comparación con el butirato, la tributirina tiene una farmacocinética más favorable y es bien tolerada. *In vitro*, la tributirina tiene potentes efectos anti proliferativos, proapoptóticos y de inducción de la diferenciación en células neoplásicas. (Gaschott y col, 2001). Los estudios realizados muestran que su uso reduce el reclutamiento de neutrófilos al sitio de inflamación y también inhibe la producción de citocinas proinflamatorias: TNF- α y CINC-2 $\alpha\beta$ y de óxido nítrico por neutrófilos (Vinolo y col., 2011). Mier y col, publica en el año 2000 la prueba de que tributirina es una forma más activa que el butirato para la diferenciación de células en casos de leucemia.

4.2 Dosis y efectos de la tributirina

Estudios de toxicidad y farmacocinética de la tributirina muestran que las concentraciones en plasma son perceptibles a los 5 min pos-administración y alcanzan el pico de concentración entre 15 y 60 minutos pos-administración vía endovenosa, y que dosis de 10.3g/kg en camundongos (ratón doméstico) son letales (Egorin y col., 1999). La administración de concentraciones menores a la dosis letal, no presentan toxicidad. En humanos se han realizados pruebas con tributirina en pacientes con diferentes tipos de cáncer, observándose buena tolerancia de la medicación oral tres veces al día en dosis de 150-200mg/kg durante varios meses. Las concentraciones plasmáticas observadas en el estudio fueron 25 μ M, concentraciones adecuadas con la acción biológica, además de observar una toxicidad mínima y muchos pacientes reportaron mejora de síntomas como: bienestar, control del apetito y control del dolor. (Eelman y col., 2003; Jusceline y col., 2017).

Se ha relacionado el microbioma a la creciente población con problemas alérgicos y con enfermedades autoinmunes, describiendo a los AGCC como metabolitos que presentan funciones protectoras en el individuo. En un estudio reportado en el 2011. Las especies bacterianas involucradas en la producción de ac. Butírico son las siguientes: *Clostridium* spp., *Eubacterium* spp., *Fusobacterium* spp., *Butyrivibrio* spp., *Megasphaera elsdenii*, *Mitsuokella multocida*, *Roseburia intestinalis*, *Faecalibacterium prausnitzii* y *Eubacterium hallii*, los mejores sustratos para éstas son el plátano verde, papa cruda, varios tipos de vegetales, semillas y granos. Las dietas actuales están basadas en carbohidratos de fácil digestión, lo que disminuye las cantidades de fibra en la dieta dando como resultado niveles bajos de producción de ácido butírico a nivel de colon, alteraciones en la microbiota intestinal y consecuencias a causa de lo anterior.

5. DISBIOSIS EN INDIVIDUOS CON DIABETES Y NEFROPATÍA

La microbiota tiene un fuerte efecto sobre la homeostasis energética del colon en comparación con otros tejidos, esta especificidad se debe a los colonocitos que utilizan butirato producto de la digestión bacteriana como su fuente primaria de energía. Los estudios muestran que los colonocitos de ratones SPF viven un estado de privación energética y presentan una menor producción de enzimas catalizadoras, sustancias clave en el metabolismo intermedio, incluido el ciclo TCA. Todo esto trae como consecuencia una disminución muy marcada en NADH/NAD⁺, fosforilación oxidativa y niveles de ATP, lo que resulta en la activación de AMPK, fosforilación de p27^{kip1} y autofagia. Cuando se agrega butirato a ratones SPF se observa una mejora en el déficit de respiración mitocondrial, evitando la autofagia. El mecanismo se debe a que el butirato actúa como fuente de energía en lugar de como un inhibidor de HDAC.

Dallas y col en 2011 realizaron un experimento, el cual consistió en incubar colonocitos aislados de ratones GF, así como de ratones CONV-R, a estos se les midió la conversión de CO₂ marcado, el resultado arrojó que los colonocitos GF presentan una disminución del 31% en el CO₂ marcado en comparación con los colonocitos CONV-R. Además, se pudo observar una disminución de los niveles de Acetil- CoA en los ratones GF hasta de un 30% en comparación con los ratones CONV-R. Acetil-CoA ingresa al ciclo TCA, y cinco de las ocho

enzimas del ciclo TCA se regulan negativamente a nivel de ARNm y /o proteína. Tanto malato como oxalato se observan disminuidos en condiciones GF.

Uno de los objetivos principales del ciclo TCA es reducir NAD^+ a NADH , que ingresa a la cadena de transporte de electrones, donde la fosforilación oxidativa culmina en la producción de ATP. La disminución de la actividad del ciclo TCA en los colonocitos GF debería dar como resultado una disminución de la actividad del ciclo TCA en los colonocitos GF, lo que a su vez dio como resultado una disminución de la relación NADH/NAD^+ en las mitocondrias. Estos investigadores aislaron mitocondrias de colonocitos GF, así como de colonocitos CONV-R, y les midieron la producción de NADH y NAD^+ por HPLC/ LC-MS. Esta cuantificación demostró ser 22 veces más baja en GF que en animales CONV-R. Los estudios concluyeron que la colonización de los colonocitos GF con microbiota disminuye la autofagia de estas células.

En respuesta a la privación de nutrimentos, la activación de AMPK induce autofagia, que es un proceso catabólico en el que la célula degrada sus propios componentes celulares en un intento de mantener la homeostasis energética. AMPK puede inducir autofagia al fosforilar (Thr198) y estabilizar el inhibidor de la quinasa dependientes de ciclina 1B ($p27^{\text{kip1}}$).

5.1 Efecto en la enfermedad renal crónica

En la enfermedad renal crónica se ha descrito una disbiosis en la microbiota con aumento de bacterias patógenas sobre las simbiotas; desde estadios tempranos se producen alteraciones de forma cuantitativa y cualitativa, lo que afecta la composición y actividades metabólicas *in situ*. Estas alteraciones incluyen disfunción del tránsito intestinal, baja absorción de proteínas, modificaciones a la dieta que conllevan bajo consumo de fibra dietética (aunado al bajo consumo de potasio y fósforo), tratamiento con hierro vía oral y antibioterapia frecuente y prolongada; estos factores alteran el microbioma normal, permitiendo el sobrecrecimiento de bacterias productoras de toxinas urémicas como lo son las moléculas de indoxil y cresol, aunado a la disminución de la cantidad de bacterias que sintetizan ácidos grasos (Lau, 2014; Pahl and Vaziri, 2015; Razola, 2016). Se ha reportado la interrupción de las uniones estrechas de los enterocitos en diferentes modelos animales de ERC de investigación, altamente relacionado a la conversión luminal de urea a amonio por bacterias productoras de ureasa. Todos los cambios antes descritos influyen en la patología de

inflamación sistémica y toxicidad urémica a causa de la translocación de endotoxinas y fragmentos microbianos a circulación sistémica. Adicionalmente, la microbiota del colon es la principal fuente de diversas toxinas urémicas proinflamatorias, como indoxil sulfato y P-cresol. Se ha demostrado que los mecanismos epigenéticos, como la metilación del ADN, la modificación de histonas y los cambios de microARN, son importantes para la regulación de las funciones celulares. Entre ellas, las histonas desacetilasas (HDAC) son enzimas que equilibran las actividades de acetilación de las histonas acetiltransferasas en la remodelación de la cromatina y desempeñan funciones esenciales en la transcripción de genes para regular la proliferación celular, la migración y la muerte. Las histonas desacetilasas (HDAC) son enzimas que equilibran las actividades de las histonas acetiltransferasas (HAT) en la remodelación de la cromatina, teniendo por consecuencia un papel esencial en la transcripción de genes para la regulación de la proliferación celular, la migración y la apoptosis, las vías inmunitarias y la angiogénesis.

6. ÁCIDO BUTÍRICO Y SU ROL EN LA DIABETES Y ENFERMEDAD RENAL

La diabetes es una enfermedad multifactorial y multisistémica, en la cual el desarrollo, incidencia y prevalencia está relacionada con factores inherentes a variables como edad, etapa fisiológica, genotipo y sexo, además de la influencia de factores ambientales como la alimentación (Kim y col, 2013). Uno de los desencadenantes en el desequilibrio metabólico y desarrollo de diabetes es la obesidad, por un lado, y los desórdenes alimentarios por otro, ya que también los ayunos prolongados provocan cambios metabólicos que pueden derivar en síndrome metabólico y diabetes gracias a la acción de las hormonas contrarreguladoras de la glucemia. La concentración de glucosa sanguínea es uno de los principales parámetros de referencia del estado metabólico en los mamíferos; ésta representa la cantidad de energía disponible que tienen los organismos para mantenerse con vida. La glucemia es evaluada generalmente en condiciones de ayuno moderado (4 a 6 h posteriores a la última toma de alimento). De acuerdo con los parámetros en ratas, uno de los criterios para el diagnóstico de la DM es la concentración alterada de glucosa durante este periodo (> 209 mg/dL). Uno de los principales factores que modifican la concentración de glucosa sanguínea es el ayuno, el

cual se define como el cese total o parcial de la ingesta calórica. Durante esta etapa se presentan eventos metabólicos regulados por hormonas, liberadas para el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa, evitando así daño a los diferentes tejidos, sobre todo a aquellos que de forma normal la utilizan como único sustrato como son el músculo estriado y los adipocitos. El ayuno es uno de los principales factores que modifican la concentración de glucosa sanguínea; la cual comienza a elevarse 10 min después de la ingesta del primer bocado, como resultado de la absorción de los nutrimentos de la dieta a nivel intestinal (carbohidratos). El ayuno puede clasificarse según su duración en breve y prolongado, aunque no exista una delimitación temporal clara. La concentración de glucemia postprandial está regulada por varios factores: el aporte y tipo de carbohidratos de la dieta, la duración de la ingesta y el tiempo que tardan en absorberse, así como la secreción de insulina y glucagón y sus efectos coordinados en el metabolismo de la glucosa en el hígado y tejidos periféricos. Uno de los biomodelos ampliamente usados en la experimentación es la rata de laboratorio debido a que tiene características que favorecen su manipulación y reproducción: rápido crecimiento y desarrollo, fácil manejo, gran número de crías, y reproducibilidad de algunas de las enfermedades que aquejan a los humanos. Los parámetros fisiológicos de referencia de la rata son una herramienta indispensable en los procesos de experimentación, sobre todo al momento de analizar los datos obtenidos en este modelo experimental. Esta herramienta permite evaluar situaciones que pueden ser críticas durante la toma de decisiones en el desarrollo de un experimento, debido a que cualquier cambio en los parámetros fisiológicos de los animales en estudio influye en los resultados obtenidos. Sin embargo, existe poca información acerca de algunos de estos parámetros o algunos de ellos son homologados a los del humano sin tomar en cuenta factores como: tasa metabólica, comportamiento alimentario y conducta, o el mismo proceso salud-enfermedad. (Figuroa-García y col., 2016).

Kumar y col., 2002, observaron una disminución en los niveles plasmáticos de glucosa en ratones alimentados con ácido butírico, también se pudo identificar que una dieta alta en fibra más la administración de ácido butírico, ayuda a mejorar los niveles de glucosa plasmática permitiendo observar valores más bajos de este analito en comparación de la administración con este ácido como único manejo.

Estudios realizados por Sharma y Singh en el 2011 concluyen que el butirato de sodio puede considerarse un agente farmacológico potencial para el tratamiento de la demencia vascular inducida por la diabetes. Se ha encontrado una fuerte correlación entre la demencia vascular y la diabetes, la demencia vascular se ha convertido en la segunda causa de demencia a nivel mundial, sólo después del Alzheimer. Los principales factores de riesgo vascular de la disfunción endotelial son: la diabetes, el control glucémico alterado, la hipertensión, la obesidad y la hÍper o dislipidemia. La demencia vascular se caracteriza por la pérdida de función motora con una pérdida de memoria más leve y se asocia con infarto cerebral y hemorragia. Las personas diabéticas tienen un riesgo de 1.5 a 4 veces mayor de presentar demencia vascular. (Sharma and Singh, 2011). Existen estudios probados en ratas diabéticas de la línea Sprague dawley, en los cuales la administración de butirato de sodio por vía intraperitoneal previo y posterior a la diabetización inducida mediante una inyección única de estreptozotocina a dosis de 60mg/kg, mientras que la dosis de butirato de sodio fue 500mg/kg durante 21 días, arrojaron como resultado: reducción en la glucosa plasmática, creatinina, urea así como en las alteraciones fibróticas, apoptosis y daño al ADN a nivel renal de las ratas del estudio. Todo esto gracias a la inhibición del daño inducido por eNOS, iNOS y TGF-B. Investigaciones *in vitro* e *in vivo* mostraron que los inhibidores de HDAC previenen la activación de eNOS / iNOS inducida por la diabetes y, por lo tanto, reducen la deposición y la apoptosis de la MEC inducida por TGF-β1. (Khan and Jena, 2014). El estrés oxidativo se produce cuando se rompe el balance entre las sustancias pro y antioxidantes presentes en el organismo, encontrándose una mayor presencia de especies reactivas de oxígeno (**EROs**) debido a un incremento en su formación y a una disminución en su neutralización o eliminación.

En 2017, Lingling y col, reportaron los efectos del uso de una cepa de *Clostridium butyricum*, como su nombre lo dice, la cepa bacteriana incrementó los niveles de butirato a nivel intestinal. El resultado que obtuvieron fue la mejora en marcadores de diabetes: glucosa postprandial, tolerancia a la glucosa, tolerancia a la insulina, GLP-1 y secreción de insulina, y un decremento en los valores de lípidos e inflamación. La cepa utilizada en su estudio incluso mostró revertir los daños causado a nivel hepático y mejorar el uso de la glucosa.

También observaron cambios en la microbiota, obteniendo un incremento en bacterias sintetizadoras de butirato.

Se han encontrado los receptores de ácidos grasos libres que dependiendo su ubicación promueven la utilización de AGCC, se informó que el receptor FFAR3 mejora la resistencia a la insulina a través del circuito neuronal intestinal-cerebral, mediante de la activación de este receptor en nervios periféricos. Por lo tanto, los agonistas de activadores de receptores de AGCC que actúan en los nervios periféricos pueden servir como un nuevo tipo de agente terapéutico para los trastornos metabólicos. (Palop y col, 2009; Ichimura y col., 2014)

En la publicación de González y col, (2018) se muestran los resultados obtenidos del experimento de la nefrectomía unilateral y nefrectomía 5/6 a ratas, además de que se administró tributirina en una dosis 400 mg/kg/PV, se observó que los niveles de glucosa, urea y creatinina se mantuvieron estables en las ratas que recibieron esta suplementación, no así en las ratas sin suplemento, deduciendo que es la presencia de butirato en intestino lo que promueve la síntesis de péptido similar a glucagón 1 (GLP-1), por medio de este mecanismo disminuye la resistencia a la insulina provocando la inhibición de la inflamación en adipocitos (Jia, y col, 2017; González y col, 2018.)

La literatura plantea que, en modelos animales de DM tipo 1 y tipo 2, las ratas diabéticas hiperglucémicas presentan un incremento de la expresión génica de SGLT2 y SGLT1, lo que implica un aumento de la capacidad renal máxima de reabsorción tubular de la glucosa. Probablemente, el informe de esos investigadores, unido a las hiperglucemias moderadas (7.03 mmol/L/126.54 mg/dL en ayunas) que se manifiestan en el modelo experimental empleado, sean la explicación a los signos clínicos poco marcados en las ratas diabéticas de 90 días de edad, lo que coincide con las etapas iniciales de la enfermedad humana, donde dichos síntomas pueden pasar inadvertidos. (Alvarez, y col, 2007).

6.1 La inflamación y su relación con el desarrollo de DMT2 al inducir resistencia a la insulina y la disfunción de las células β

Diversos estudios han demostrado el papel de la inflamación en la inducción a la alteración por diabetes, todo esto reforzado con el hallazgo de que las enfermedades infecciosas

crónicas pueden conducir al desarrollo de DMT2. Las citocinas inflamatorias pueden inducir directamente la resistencia a la insulina al interferir en la transducción de la señal de insulina. El TNF α e IL-6 activan diferentes quinasas Ser/Thr intracelulares, por ejemplo, quinasa Jun NH2-terminal (JNK) e IKK-b. A su vez, estas quinasas catalizan la fosforilación de serina del sustrato receptor de insulina-1 (IRS1), inhibiendo su habilidad de reclutar fosfatidil inositol-3-quinasa (PI3K) y AKT interrumpiendo así la ruta de la insulina.

Además de la resistencia a la insulina, las moléculas proinflamatorias pueden incluso inducir el deterioro de las células B, en particular, tanto la glucotoxicidad como la lipotoxicidad pueden fomentar la producción de IL-1b, IL-6 e IL-8 en islotes pancreáticos. Un microambiente proinflamatorio puede entonces, regular negativamente el gen de la insulina y promover la infiltración de macrófagos y la apoptosis de las células B, contribuyendo en general a la incapacidad del páncreas para compensar la demanda de insulina en pacientes resistentes a la insulina.

La inflamación de bajo grado es un fenómeno observado en varios tejidos en respuesta a la sobrecarga de glucosa y lípidos. Incluso el hipotálamo manifiesta una expresión génica proinflamatoria después de una dieta alta en grasa (HFD) o una dieta alta en carbohidratos y alta en grasas. Al igual que los tejidos musculares y grasos, JNK e IKK-b están emergiendo como piezas clave que determinan la señalización de insulina alterada, lo que sugiere que las vías inflamatorias comunes en diferentes órganos pueden promover el desarrollo de DMT2. Aparte de la sobrenutrición, el envejecimiento aumenta la actividad del eje IKK-b NF-kB en el hipotálamo, lo que inicia inflamación cerebral de bajo grado como denominador común de ambas afecciones.

Los efectos aditivos y el cuadro exacerbado de la metainflamación e inflamación son sugestivos de un efecto combinado de estos dos fenómenos en el fenotipo que resulta en un menor tiempo de vida en el paciente. Existe una Hipótesis de factores compartidos entre ambas condiciones en individuos con DMT2. Las principales vías que impulsan el envejecimiento de los organismos están íntimamente relacionadas con el metabolismo. La estimulación prolongada del sistema inmune, la acumulación de células senescentes, el reordenamiento epigenético y un cambio en la composición de la microbiota (disbiosis).

6.2 Respuesta proinflamatoria de las células inmunes en condiciones de hiperglucemia

La evidencia científica confirma que existe respuesta inflamatoria en las células inmunes después de la exposición a altas concentraciones de glucosa *in vitro*. La secreción de IL-1b, IL-6, IL-8, MCP-1 y otras citocinas principales se ha demostrado tanto en monocitos como en macrófagos derivados de individuos con DMT2 y en líneas celulares monocíticas expuestas a hiperglucemia. Todo esto como consecuencia de la activación mediada por especies reactivas de oxígeno (**ROS**) de p38 y otras quinasas proinflamatorias, inducción de NF-kB, sobreexpresión de TLR, desacoplamiento mitocondrial con el consiguiente estrés oxidativo y glucosilación no enzimática con sobreactivación de la vía AGE-RAGE. Además, se ha comprobado el estado proinflamatorio más pronunciado en células *ex vivo* de individuos con DMT2, tanto en estado basal como después de la estimulación. La glicemia y el estado inflamatorio son casi directamente proporcionales porque los niveles de HbA1c muestran una correlación lineal con la expresión de IL-6 y TNF α en las células inmunes circulantes de pacientes con diabetes.

Otras investigaciones muestran la ineficiencia fagocítica de los macrófagos expuestos a altos niveles de glucosa, un fenómeno que explica en parte la mayor incidencia de infecciones crónicas entre los pacientes con diabetes, los estudios sobre la relación inversa entre los niveles de HbA1c y la tasa fagocítica respaldan la idea de que la función inmune adecuada está fuertemente relacionado al control glucémico. Con respecto a esto, las células inmunes en un medio diabético tienen características similares a las de las células sometidas a inmunosenescencia. La movilización alterada de las células inmunes, así como de las progenitoras hematopoyéticas es evidente en la DMT2, contribuyendo posiblemente a la aterosclerosis y a la neoangiogénesis alterada observada en muchos tejidos diabéticos.

Se sabe que la hiperglucemia posprandial está asociada con una respuesta inflamatoria transitoria tanto en humanos como en ratones. Los hallazgos recientes sugieren una supuesta función beneficiosa de la inflamación inducida por el pico glucémico posprandial, los macrófagos peritoneales secretan IL-1b de manera dependiente de la glucosa. Esta citocina a su vez estimula la secreción de insulina y juntas actúan sobre macrófagos para inducir la

absorción de glucosa, y la insulina mantiene el perfil de expresión génica proinflamatoria. De igual forma, la inflamación mediada por IκB quinasa beta (IKKβ) es un regulador positivo de la homeostasis de la glucosa hepática después de la alimentación. Cabe mencionar que la inflamación posprandial se puede controlar mediante el control glucémico en ratones y humanos.

Todo esto indica que la hiperglucemia puede inducir una respuesta proinflamatoria en las células inmunes, posiblemente consiste con el grado de sobrecarga de glucosa y “susceptible” al control glucémico.

6.3 Diferentes vías metabólicas impulsan respuestas inmunes pro o antiinflamatorias

Los estados de activación de los macrófagos tipo 1 y tipo 2 (M1, M2) con respecto al metabolismo se diferencian del modo siguiente: los M1 de actividad proinflamatoria consumen principalmente glucosa, con el ciclo de Krebs, por lo tanto, el aumento en la presencia de glucosa refuerza la inflamación. Por el contrario, los M2 de actividad antiinflamatoria, obtienen energía principalmente de los ácidos grasos. La vía de la pentosa fosfato es un determinante importante de la polarización de los macrófagos, principalmente debido a la regulación de la proteína similar a carbohidrato quinasa (CARKL). Es de destacar que el aumento del flujo de glucosa a través de la vía de la pentosa fosfato es un evento temprano inducido por diabetes experimental. (Figura 3)

Las células de la inmunidad innata, las células de inmunidad adquirida tienen un perfil metabólico distinto según su función pro o antiinflamatoria. Por ejemplo, glucólisis y la síntesis de ácidos grasos son características principales de las células T helper 1 (Th1), mientras que la oxidación de los ácidos grasos es más prominente en las células T reguladoras. Además, las células inmunes son reprogramables a través de cambios metabólicos forzados, dado que la inhibición de la glucólisis produce la conversión de Th17 a Treg. Por lo tanto, la posibilidad de modulación de las respuestas inflamatorias a través de una intervención basada en el metabolismo selectivo de células es prometedora para remodelar por completo la metainflamación en la DMT2.

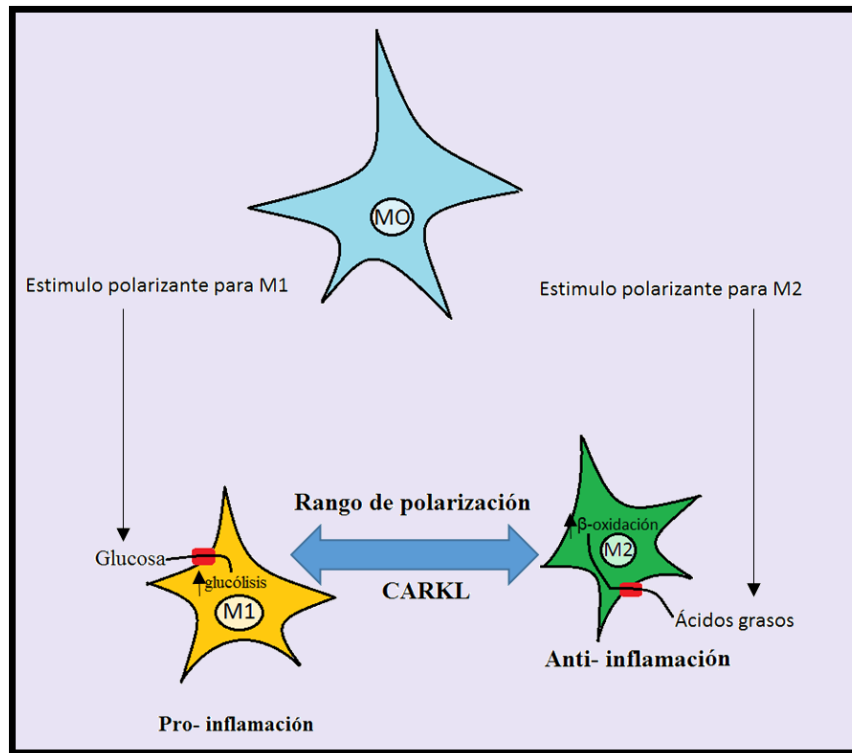


Figura 3. Diferentes vías metabólicas activadas en macrófagos pro y antiinflamatorios (M1/M2) por sustrato energético

La figura 3 representa las diferencias en el metabolismo entre los macrófagos M1 y M2. Los macrófagos M1 proinflamatorios se polarizan a partir de la vía clásica, en la que componentes bacterianos como el LPS, las citocinas inflamatorias Th1 e $\text{IFN-}\gamma$ y $\text{TNF-}\alpha$ impulsan la expresión de citocinas proinflamatorias, consumen principalmente glucosa a través de un aumento de la glucólisis, mientras que los macrófagos M2 utilizan ácidos grasos a través de la β -oxidación como las principales fuentes, estos últimos activados por citocinas Th2, IL-4 e IL-13. Los M2 residen en el tejido adiposo magro y se cree que participan en la remodelación, reparación y mantenimiento de la sensibilidad a la insulina a través de la producción y expresión de IL-10, antagonista del receptor de IL-1 y arginasa-1. La regulación del metabolismo del sustrato de macrófagos es un medio potencial para la manipulación de la respuesta inflamatoria. La proteína similar a carbohidratos quinasas (CARKL), que cataliza una reacción huérfana en la vía de la pentosa fosfato, dirige la polarización de los macrófagos a través del control del metabolismo de la glucosa. (Diagrama adaptado de Johnson, y col., 2012. La inflamación de la mucosa intestinal resulta de la activación mediada

por células T helper tipo 1 (Th1) o tipo 2 (Th2), las cuales se han observado en la enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa, respectivamente. Con la activación mediada por células Th1, se aumenta la síntesis de IL-12, INF- γ , y de TNF- α , mientras que la presencia de células Th2, se observa un aumento en la síntesis de IL-4, IL-5 e IL-13.

6.4 Inflamación, metaflamación y senescencia

La diabetes tipo 2 se caracteriza por un bajo grado de inflamación crónica, recientemente denominado “metaflamación”, factor relevante que contribuye al desarrollo de la diabetes y sus complicaciones. La metaflamación se asemeja a la inflamación de bajo grado inducida por el envejecimiento en términos de presentación clínica y perfil molecular, lo que apunta a una etiología común para ambas afecciones.

Las principales características patológicas de la DMT2 son la hiperglucemia crónica y la dislipidemia, que desencadenan una gran cantidad de reacciones moleculares que finalmente conducen al desarrollo de complicaciones, como la retinopatía, nefropatía, neuropatía, cardiopatía isquémica y vasculopatía periférica. La metaflamación juega un papel crítico en esta patología, ya que es la inflamación de bajo grado inducida por el metabolismo. Esta afección crónica involucra las mismas moléculas de la respuesta inflamatoria aguda. Los estudios han demostrado el papel que la metaflamación juega en la patología, encontrando su papel como determinante principal de la resistencia a la insulina inducida por la obesidad. Varios modelos murinos de obesidad y diabetes muestran sobreexpresión de TNF α en el tejido adiposo, siendo suficiente el bloqueo de TNF α para aumentar la sensibilidad a la insulina. El tejido adiposo se considera la principal fuente de factores inflamatorios en la obesidad, con adipocitos agrandados, disfuncionales o moribundos que secretan moléculas capaces de atraer células inmunes y sensibilizarlas hacia un perfil proinflamatorio.

Se ha presentado hallazgos consistentes para otras citocinas y quimiocinas importantes, como MCP-1 (Proteína quimio atrayente de monocitos 1) e IL-6, lo que respalda que la inflamación es el vínculo entre la obesidad y el desarrollo de diabetes.

La hiperglucemia induce la acumulación de células senescentes que pueden tener un fenotipo proinflamatorio.

La hiperglucemia provoca una gran variedad de desequilibrios moleculares, muchos de los cuales persisten después de la normalización de la glucosa. Los individuos con diabetes se caracterizan por una alteración duradera de la expresión génica, lo que explica el fenómeno de la memoria metabólica (o glucémica), es decir, la menor incidencia de complicaciones “CV” si se proporciona un control glucémico intensivo poco después del diagnóstico. El estrés oxidativo es un evento temprano estimulado por un medio hiperglucémico, y una semana es suficiente para documentar el aumento de la peroxidación lipídica en la aorta y en el corazón en ratas diabéticas. A su vez, el estrés oxidativo puede conducir a la acumulación de diversas formas de daño macromolecular, por ejemplo, peroxidación lipídica, oxidación y agregación de proteínas y daño al ARN y ADN, incluido el acortamiento de los telómeros. El resultado celular general de esta cascada puede ser la senescencia, apoptosis o muerte celular necrótica, según el fenómeno estudiado. El estado de la célula, el tipo de célula involucrada y el tipo y la cantidad de daño acumulado son solo algunos de los determinantes del peso relativo de varios resultados posibles. Se sabe que las células apoptóticas se eliminan eficientemente por el sistema inmune, mientras que las células senescentes se reconocen cada vez más como un motor acumulador de enfermedades crónicas y relacionadas con la edad.

La senescencia se define como un estado de detención permanente del ciclo celular, acompañado de cambios morfológicos y de expresión génica. Se ha documentado la evidencia del aumento de la senescencia durante el envejecimiento del organismo. La alta concentración de glucosa desencadena la senescencia prematura de varios tipos de células *in vitro* y principalmente en el lecho vascular y en los riñones *in vivo* (en ratones). Además del aumento del estrés oxidativo, se han propuesto la disfunción mitocondrial y la glicación no enzimática como mecanismos alternativos responsables de la senescencia inducida por hiperglucemia. También se ha proporcionado evidencia de senescencia de varios tejidos en pacientes con diabetes. Además, las células senescentes se caracterizan por una alta expresión de inhibidores del ciclo celular, es decir, p16, p19, p21 y p53, junto con la respuesta persistente al daño del ADN que eventualmente puede inducir un estado proinflamatorio llamado fenotipo secretor asociado a la senescencia (SAPS). El SAPS consiste en la secreción crónica de una amplia variedad de citocinas, quimiocinas y otros factores solubles, algunos de los cuales pueden propagar la senescencia a los tejidos cercanos.

EL SAPS ha sido sugerido recientemente como un mecanismo relevante que promueve la inflamación y el envejecimiento. Los individuos con DMT2 tienen una puntuación inflamatoria aumentada, y la mayoría de las citocinas circulantes reguladas por aumento son factores secretados por las células que expresan SAPS, por ejemplo, la familia IL-1, IL-6 e IL-8. Además, la DMT2 se asocia con un fenotipo de envejecimiento acelerado que incluye un mayor riesgo de muerte, por lo cual es SAPS se ha propuesto como un contribuyente relevante a la inflamación de bajo grado observada en pacientes con DMT2.

6.5 Las células senescentes dependen del consumo de glucosa para su actividad metabólica

Al igual que las células inmunes activadas, las células senescentes tienen un perfil metabólico distinto. En particular, un cambio hacia una glucólisis más pronunciada es evidente en las células senescentes, un fenómeno no asociado con una mejora del estado energético. Estos datos son especialmente importantes porque las diferencias en el metabolismo pueden eventualmente dirigirse a matar selectivamente las células senescentes o atenuar su capacidad secretora.

La hiperglucemia induce un reordenamiento epigenético subyacente a un programa proinflamatorio crónico, altera la metilación/ o acetilación de histonas, induciendo la expresión de genes proinflamatorios. La exposición a altos niveles de glucosa afecta principalmente a la región promotora de NF- κ B, el principal factor proinflamatorio que controla una respuesta inmune y la secreción de factores SASP. Las células endoteliales e inmunes expuestas a hiperglucemia muestran hiper expresión persistente de la subunidad p65 de NF- κ B.

En general, las investigaciones indican que la hiperglucemia imprime epigenéticamente un programa inflamatorio en los tejidos diabéticos, y algunas de estas marcas están estrechamente relacionadas con el proceso de envejecimiento celular.

a. La contribución de la microbiota a la inflamación y a la metainflamación

Los ratones libres de gérmenes (GF) son resistentes a la inflamación. Además de las alteraciones epigenéticas provocadas por la diabetes y la acumulación de células senescentes,

se han sugerido modificaciones en la composición de la microbiota como un factor importante que contribuye tanto a la inflamación como a la metaflamación. Hallazgos recientes prueban una teoría de hace 100 años, es decir, que la fuga de bacterias y compuestos relacionados a través de la barrera intestinal es responsable de la inflamación sistémica de bajo grado y, por lo tanto, es un importante impulsor del envejecimiento. La estimulación continua del sistema inmune a lo largo de la vida es uno de los mecanismos propuestos que explican el daño, con muchas posibles fuentes endógenas y exógenas de moléculas “tóxicas” que promueven la inflamación. Los ratones negros mantenidos en condiciones libres de gérmenes no muestran un aumento relacionado con la edad de los niveles circulantes de citocinas proinflamatorias, un fenómeno acompañado de una extensión de la vida media.

Además, se ha encontrado que los ratones con deficiencia de TNF están protegidos de la inflamación asociada a la edad, sin un cambio de microbiota detectable relacionado con la edad, lo que indica una compleja interrelación bidireccional entre la inflamación y el cambio en la microbiota provocado por el envejecimiento. La observación de que los ratones GF desarrollan defectos en el sistema inmunitario también indica que se requiere de la microbiota para una función inmune adecuada. El LPS derivado de la microbiota puede inducir características de senescencia, por ejemplo, expresión de p16, en macrófagos peritoneales en ratones, reforzando más aún el vínculo entre los productos derivados de la microbiota y el envejecimiento celular.

Por el contrario, el probiótico *Bifidobacterium lactis* atenúa la inflamación de bajo grado y prolonga la vida útil de los ratones. Considerando también la longevidad extrema se acompaña un perfil específico de microbiota, las intervenciones basadas en microbiota tienen un tremendo potencial contra la inflamación.

7. FISIOPATOLOGÍA DE LA MICROANGIOPATÍA DIABÉTICA

Como explica León-Regal y col., 2013, en su revisión sobre microangiopatía diabética, la incorporación intracelular de glucosa depende de la presencia de transportadores específicos, las proteínas transmembranales GLUT1 a la GLUT5. A excepción de GLUT4 que requiere de insulina y se encuentra en músculo y tejido adiposo, el resto de los tejidos usa proteínas

transmembranales no dependientes de insulina, por lo que en estos la glucosa fluye por gradiente de concentración. La microangiopatía diabética causada por la hiperglicemia crónica es capaz de modificar las vías metabólicas intracelulares, así como la estructura y composición proteica.

En el caso de tejidos que toman libremente glucosa y contienen enzima reductasa, el flujo de glucosa al interior de la célula está limitado en condiciones de normoglucemia, tanto por las concentraciones de dicha azúcar como por la afinidad con la enzima.

En presencia de hiperglicemia, la enzima **aldosa reductasa (ALR)** produce sorbitol a partir de glucosa y otra enzima, la sorbitol deshidrogenasa, transforma el sorbitol en fructosa. El NADP⁺ y el NADH procedentes de estas reacciones, desvían el metabolismo de la glucosa hacia una vía aparte, llamada síntesis de Novo de diacilglicerol (DAG). El DAG es un segundo mensajero intracelular, activador natural de la proteína quinasa C (PKC-_{fin}) que interviene en la regulación de numerosas enzimas por fosforilación. La expresión de endotelina-1, una citoquina que hace disminuir el flujo capilar constituye el resultado de la activación de la PKC-_{fin} que mayores implicaciones parece tener en la aparición de la microangiopatía, al producirse la isquemia local por constricción de la microvasculatura, lo que se ha propuesto que constituye el inicio de otros cambios aberrantes.

Otros efectos observados a causa de la activación de la PKC son: disminución de los niveles de la enzima convertidora de angiotensina, por inducción de metabolitos como la subunidad Nox1 de la NADPH oxidasa que deprimen la activación de enzimas necesarias para la producción de la convertidora. La depleción de angiotensina podría estar implicada en la hiperfiltración inicial de la nefropatía diabética. También se distingue que los eritrocitos presentan disminución en su fluidez, en el potencial de membrana, en el sistema antioxidante y una resistencia a los cambios térmicos, características todas específicas de los individuos con diabetes. Todo esto trae como consecuencia la modificación de las propiedades reológicas de estas células: elasticidad, resistencia a la ruptura al deformarse, entre otras, relacionándolas así con los problemas micro circulatorios. Estas alteraciones juegan un papel importante en la microangiopatía diabética. Un factor relevante es la reducción de la deformabilidad eritrocitaria, con tendencia a elevada estasis y aumento del hematocrito local.

Se ha encontrado un aumento en la presencia de aldosa reductasa y de sorbitol en esas células, pero aún falta por esclarecer las consecuencias de esto en las alteraciones reológicas de los pacientes.

7.1 Vía del poliol

Las alteraciones producidas en esta vía a causa de la hiperglicemia tienen como consecuencia complicaciones en tejidos como el nervioso, causando neuropatía diabética, en el parénquima renal provocando nefropatía diabética y la retina provocando retinopatía diabética.

El aumento de los niveles de glucosa en la matriz intracelular reduce el ingreso de mioinositol por inhibición competitiva, simultáneamente al aumento de sorbitol intracelular lo que inhibe la síntesis de mioinositol. El sorbitol es un alcohol que produce gradiente osmótico, como se mencionó anteriormente es producido a partir de glucosa por la enzima aldosa reductasa, que utiliza NADPH dejando como residuo NADP^+ . El daño celular se produce por 4 causas principales:

- Disminución de la disponibilidad de NADPH que conlleva a menor síntesis de Glutación reducido, lo que provoca un aumento de radicales libres.
- Edema celular causado por aumento de sorbitol intracelular (alcohol osmótico).
- Disminución del óxido nítrico que desencadena problemas Vasculares.
- Disminución en la concentración de mioinositol, lo que conlleva a una disminución de diacil glicerol, provocando problemas de la bomba Na/K ATPasa
- Activación de la PKC por la hiperglucemia que a su vez activa a la fosfolipasa A2, produciendo inhibidores de la Na/K ATPasa: ac. Araquidónico y la prostaglandina E2 (PGE2)

En nervios se observa un decremento en la velocidad de conducción lo que provoca la denominada neuropatía diabética. A nivel renal el sorbitol es un osmolito orgánico eléctricamente neutro, que se acumula para mantener el transporte de agua-soluto sin distorsionar el volumen celular. Un incremento en la vía del poliol conlleva a desórdenes en

la hemodinámica renal, incluso de ha encontrado una relación directa entre los componentes de esta vía y la microalbuminuria.

7.2 La glicosilación no enzimática de las proteínas

La reacción no enzimática entre la glucosa y proteínas es denominada productos de glicosilación avanzada (**AGE**). En la actualidad se sabe que los productos finales de la glicosilación avanzada se forman en personas diabéticas principalmente y en menor medida en personas no diabéticas, en presencia de hiperglucemia crónica, pueden acumularse en presencia de proteínas con poco recambio, como las que constituyen el cristalino del ojo, en el colágeno de las membranas basales de los capilares de la retina y el glomérulo renal, y también en el componente proteico de la mielina en el sistema nervioso periférico, es importante recalcar que este fenómeno precisa de condiciones de hiperglucemia para que pueda ocurrir.

Este proceso se ha dividido en dos etapas: inicial o temprana y tardía o avanzada, la diferencia fundamental entre ambas es la característica irreversible de la primera, contrariamente a la segunda, pues una vez que el proceso se encuentra en un estadio avanzado se van produciendo reacciones en cascada que involucran y afectan de forma permanente a la gran mayoría de las moléculas orgánicas conocidas. Los factores que condicionan la intensidad y el grado de reversibilidad de este proceso son exclusivamente: la concentración de glucosa y el tiempo de contacto de este monosacárido con las proteínas, determinado por la vida media de cada proteína en particular. Lo anterior es esencial para comprender el proceso, ya que las proteínas que se recambian con frecuencia no suelen verse involucradas en etapas irreversibles de glicación, y por lo tanto no intervienen en la patogenia asociada a este proceso, aun cuando casi todas las proteínas del organismo son glicosilables: albúmina, hemoglobina, lipoproteínas, colágeno, fibrinógeno, inmunoglobulinas, entre otras.

7.2.1 Etapa temprana (iniciación)

La glicosilación no enzimática de las proteínas comienza con la reacción no catalizada enzimáticamente de la glucosa en conformación lineal con los grupos amino (NH_2) de las proteínas ubicados en el carbono terminal $-\epsilon$ (épsilon)- del aminoácido lisina o en el extremo

α -amino de la proteína. Este tipo de interacción puede ocurrir con otras macromoléculas como las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos.

Durante esta reacción se enfrenta el grupo carbonilo de la glucosa en conformación lineal (función aldehído) con los grupos aminos ya mencionados, formándose la base de Schiff: aldimina, en un proceso que resulta fácilmente reversible. De no revertirse, ocurre un reordenamiento intramolecular lento que transforma la base Schiff en fructosamina (1-amino-1-desoxicetona) o compuesto de Amadori, un producto más estable que surge cuando el grupo glucosil de la base de Schiff se transforma en fructosil, por el desplazamiento del grupo carbonilo del carbono 1 al 2 durante el reordenamiento.

Tanto la reacción de Schiff y la conversión en el compuesto de Amadori, son reversibles si se interrumpe el contacto de la glucosa con la proteína, lo que evita la progresión hacia los estadios de irreversibilidad. Es de suma importancia recalcar que la desglicosilación de la fructosamina no libera glucosa, sino intermediarios dicarbonilos muy reactivos (glicotoxinas) como la 3-desoxiglucosona y la carboximetil-lisina que tiene la capacidad de oxidar a otras proteínas dañándolas. Tomando en cuenta el tiempo de exposición que requiere la formación de cuerpos de Amadori, esta es la etapa de glicosilación que alcanzan las proteínas de vida media en pacientes con hiperglicemia, y la hemoglobina es el ejemplo más estudiado. La determinación de las concentraciones de **hemoglobina glicosilada (HbA1c)** permite evaluar el progreso de la glicosilación no enzimática. Esta fue la primera proteína glicosilada estudiada. Su modificación ocurre de manera lenta y continua, de ahí que la medición del porcentaje de glucosilación se utilice en la práctica médica como un índice de control glicémico del paciente a largo plazo, la prueba hace una predicción del comportamiento de la glicosilación durante los últimos 120 días. También se puede medir el grado de glicosilación de las proteínas totales y utilizarlo como una medida de control metabólico a corto plazo, como una predicción de la dinámica de los últimos 21 días y es un indicador de riesgo de eventos asociados a las lesiones microvasculares.

7.2.2 Etapa tardía

Cuando las concentraciones de glucosa se mantienen altas durante varias semanas, ya sea porque el paciente no se ha tratado, o no ha logrado un buen control metabólico, o han fallado los mecanismos enzimáticos de detoxificación, los productos inestables que se producen en la cascada de reacciones se estabilizan y se transforman en los llamados productos finales de glicosilación, conocidos como AGE, que no retornan a sus sustratos de origen después de haber logrado que disminuyan los niveles de glucosa. La conversión de los compuestos de Amadori en AGE es un proceso que ocurre como se ha mencionado en proteínas estructurales abundantes en el organismo y de vida media larga, como: colágeno, elastina, mielina, actina, miosina y proteínas del cristalino, también puede afectar a algunas proteínas de vida media corta como las lipoproteínas, especialmente cuando estas están retenidas por períodos prolongados en la pared arterial. La formación de fructosamina es un requisito para que ocurra la glicosilación avanzada.

Una vez formados los compuestos de Amadori, se inicia con el tiempo la fase de propagación que parte con la formación de carbonilos oxidantes (glioxal y de 3-desoxiglucosona) que provienen de la oxidación de los residuos de fructosamina. Estos se desprenden de la proteína y actúan como potentes agentes glicantes, capaces de catalizar nuevas reacciones de unión de glucosa a proteínas. En esta fase ocurren varias reacciones de glicooxidación proteica, todas ellas tendientes a formar productos de glicosilación que, como están unidos a una sola proteína, no forman puente entre dos de ellas: pirrilina y N-carboximetil-lisina. La N-carboximetil-lisina puede formarse tanto a partir de la combinación de glioxal con proteína, como a partir de la acción oxidativa del glioxal y otros radicales libres sobre el producto Amadori que ha persistido de la fase temprana o iniciación.

La vasodilatación, el incremento de flujo sanguíneo y el aumento de permeabilidad capilar, constituyen las manifestaciones típicas del comienzo de la microangiopatía diabética. Es conocido que las proteínas modificadas por los AGE son capaces de producir estos cambios y además, alteran el enlace heparán sulfato con otros componentes de la matriz extracelular, lo que influye también en el incremento de la permeabilidad capilar debido a la pérdida de los sitios aniónicos.

7.3 Efectos de los AGE que desencadenan la microangiopatía diabética

Sobre los componentes de la matriz extracelular: el colágeno o la lámina; la formación de AGE establece enlaces cruzados entre los polipéptidos, lo que provoca interacciones anormales matriz-matriz y matriz-célula, el caso más representativo lo constituyen los enlaces cruzados establecidos por los AGE entre las moléculas de colágeno tipo IV (el predominante en la membrana basal) que disminuyen la adhesión de las células endoteliales e incrementa la filtración de líquidos.

- Además, se ha mostrado que las proteínas que establecen enlaces con los AGE son resistentes a la digestión proteolítica, por lo que las proteínas afectadas ven reducida su tasa de eliminación y se facilita su depósito.
 - Las proteínas con enlaces cruzados a través de los AGE atrapan proteínas plasmáticas no glicadas o proteínas intersticiales, esto es de gran importancia pues ayuda a explicar el engrosamiento de la membrana basal de los capilares, que incluye los glomerulares, característico de la microangiopatía diabética, al quedar atrapadas proteínas plasmáticas como la albúmina que se fija a la membrana basal glicada.
 - La circulación de proteínas plasmáticas a las que se le ha adicionado residuos AGE permite la puesta en marcha de señalizaciones intracelulares que parten de receptores AGE de diversos tipos celulares: células endoteliales, mesangiales, macrófagos, etc. La unión AGE-receptores produce translocación del factor transcripcional NF- κ B, que genera diversas citocinas, factores de crecimiento y otras moléculas proinflamatorias.
- a) Liberación de citocinas y factores de crecimiento por los macrófagos y células mesangiales: factor de necrosis tumoral (TNF- α), factor de crecimiento insulinoide tipo 1, factor transformador de crecimiento (TGF-1), factor de crecimiento derivado de plaquetas (DPFG), factor de crecimiento derivado del endotelio vascular (VEGF).

- b) Incremento de la permeabilidad vascular probablemente por disrupción de la barrera endotelial al inducir reordenamientos de las fibras contráctiles del endotelio con trastornos funcionales.
- c) Incremento de la actividad procoagulante sobre las células endoteliales y los macrófagos.
- d) Aumento de la proliferación y síntesis de matriz extracelular por los fibroblastos y células musculares.

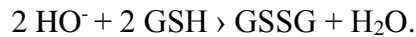
Después de esto se concreta la disfunción endotelial multifactorial, caracterizada en su comienzo por vasodilatación, incremento del flujo sanguíneo, aumento de la permeabilidad vascular, estado protrombótico y zonas de exudado, lo que evoluciona progresivamente a una marcada vasoconstricción, reparación aberrante de los vasos y matriz perivascular con depósito de proteínas.

7.4 Incremento del estrés oxidativo (EO) causado por la glucoxidación y la autoxidación de la glucosa

En el organismo se producen de manera continua radicales de oxígeno altamente reactivos como el anión súper óxido (O_2^-), iones perhidróxilo (OH^\cdot) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), todos estos resultado del uso del oxígeno en el metabolismo celular, especialmente como aceptor final de electrones en la cadena transportadora mitocondrial y los cuales pueden lesionar seriamente la peroxidación lipídica de las membranas, la modificación oxidativa de proteínas que estimula la degradación de proteínas críticas mediante el complejo multicatalítico proteosoma, y las lesiones en el ADN al reaccionar con la timina nuclear y mitocondrial que produce roturas de una cadena del ADN, y todas estas reacciones también producen envejecimiento celular.

Las células han desarrollado múltiples mecanismos de eliminación de radicales libres para minimizar daño, aun cuando algunos de estos radicales son inherentemente inestables y se degradan espontáneamente.

Dentro de los sistemas enzimáticos más notables se encuentran algunos que son afectados por la incorporación excesiva de glucosa al medio intracelular, un ejemplo es la presencia de la glutatión peroxidasa, que descompone radicales libres superóxido e hidroxilo por las reacciones:



Cuando el flujo de glucosa citoplasmática es elevado y se estimula la vía del poliol, se reduce la síntesis de glutatión reducido GSH, disminuyendo el mecanismo de protección al daño oxidativo celular, obteniendo como resultado un incremento del estrés oxidativo.

También se ha comprobado que la hiperglicemia *per se* tiene un efecto nocivo sobre otras enzimas que participan en el sistema antioxidante de defensa (superóxido dismutasa y catalasa), efecto que se ve favorecido también por el propio proceso de glucosilación no enzimática. Otro efecto probado recientemente, y que explica una buena parte del incremento de radicales superóxido durante la hiperglicemia, lo constituye el aumento de la tasa de metabolismo mitocondrial de la glucosa por el aumento en su disponibilidad en el citoplasma.

Se ha demostrado que el incremento del superóxido intracelular deprime los niveles de óxido nítrico en arteriolas de músculo liso, lo que disminuye la capacidad de dilatación de la microvasculatura, y también a la aparición de los trastornos vasomotores asociados al inicio de microangiopatía.

Existe una teoría, conocida como la teoría del estrés carbonílico (EC), esta consiste en la producción de especies reactivas al carbonilo formadas a partir de pequeñas moléculas de carbono, tanto por vía enzimática o metabólica (EO) como por vía no enzimática sin participación del oxígeno. La concentración del estado estacionario de estas especies va a estar determinada por las velocidades relativas de producción y de detoxificación. El aumento de ellas conduce de manera acelerada a la modificación química de las biomoléculas y a toda una serie de eventos relacionados con el daño vascular, tales como: crecimiento celular,

reparación y remodelación de tejido, apoptosis y necrosis, lo que se le suma a las lesiones provocadas por las especies altamente reactivas de oxígeno.

La glicosilación enzimática da como resultado gran cantidad de productos con un elevado potencial glico-oxidativo, entre ellos: pentosidina, carboximetil-lisina, la 3-desoxiglucosona y el glioxal. La carboximetil-lisina también es obtenida en la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados durante la peroxidación lipídica, interconectando los efectos del estrés oxidativo con la génesis de la oxidación carbonílica. Retomando la fase de propagación de la glucosilación no enzimática de las proteínas, estas formas tienen alta reactividad con proteínas y residuos amino de otras macromoléculas que producen variadas lesiones en la estructura y el funcionamiento celular, por lo que se denominan glicotoxinas y se suponen medulares en la génesis de la disfunción endotelial.

Esta disfunción endotelial provoca en el vaso un incremento en la permeabilidad, una disminución de la antitrombogenicidad, una disminución en la actividad fibrinolítica y el incremento de la adhesión de plaquetas y monocitos, todo lo cual provoca una superficie endotelial permeable y trombogénica. Está descrito que la disfunción endotelial precede al comienzo de las lesiones tanto micro como macrovasculares.

7.5 Perspectiva integral de la patogenia del daño microvascular

Se conoce que incluso antes de manifestarse los hallazgos morfológicos anteriormente descritos: reducción de la luz, engrosamiento de la membrana basal capilar, etc., es posible observar la disfunción motora en la vasculatura que afecta a los mecanismos mediados, tanto por el endotelio como por el músculo liso, que de manera general, se caracteriza por un aumento de la presión inducido por la constricción miogénica, un deterioro de la dilatación y un aumento de flujo mediado por el endotelio, diversos estudios muestran que esto no ocurre sino en casos específicos de hiperglicemia local de al menos 24 horas. Estos cambios ocurren como una consecuencia a la elevada producción de endotelinas, por el incremento de sorbitol intracelular aunado a la reducción del óxido nítrico por el incremento de estrés oxidativo.

Cronológicamente ocurre el aumento de la permeabilidad de los capilares, mediada por diversos factores como son: alteraciones estructurales de la matriz extracelular inducidas por los AGE, remodelación vascular causada por la liberación de factores de crecimiento causada ya sea por el estímulo isquémico inicial o por los receptores celulares para proteínas AGE, muerte de pericitos y células endoteliales a causa de la isquemia, el estrés oxidativo, la acumulación de sorbitol intracelular, etc.

Acorde a la cronicidad de estas alteraciones se observa el engrosamiento de la membrana basal de los capilares con depósito de material PAS+ (ácido periyódico reactivo de Schiff) perivascular, a causa de la filtración, depósito de proteínas y acúmulo de proteínas en la matriz rica en AGE, se pueden observar zonas exudativas e inclusive patrones de intensa neovascularización, con un engrosamiento marcado de la irrigación sanguínea local.

8. NEFROPATÍA DIABÉTICA

El daño renal constituye un suceso temprano en la progresión a la ND, pues la hiperglucemia causa hipertrofia en las células mesangiales, con incremento de la transcripción génica y secreción de proteínas de matriz extracelular, como colágena, laminina y fibronectina (Álvarez y col., 2017). **La ND se caracteriza acumulación progresiva de MEC en el mesangio con engrosamiento de las membranas basales glomerular y tubular y una mayor cantidad de matriz mesangial en los compartimentos glomerular y tubulointersticial.** El TGF- β parece ser el estímulo clave para la acumulación de matriz extracelular y de la transición de epitelial mesenquimatoso ya reconocida como la vía final hacia la fibrosis renal. La nefropatía diabética es considerada una de las lesiones más importantes en individuos diabéticos, con repercusiones en la calidad de vida del individuo así como en el pronóstico de la enfermedad; resultado de un descontrol glucémico frecuentemente complicado por la presencia de hipertensión sanguínea, lo que genera un daño estructural sobre las nefronas primeramente a nivel mesangial para posteriormente tornarse en un daño difuso que va provocando una lesión cada vez mayor sobre el parénquima renal y que, a través de los años, llega a manifestarse como una enfermedad renal terminal. La nefropatía diabética se refiere exclusivamente a las lesiones renales originadas por afección microangiopática o de los pequeños vasos, siendo por ende una lesión crónica

exclusiva de la DM, en la que se afecta la microcirculación renal originando una serie de alteraciones funcionales y estructurales principalmente a nivel glomerular. Uno de los primeros signos que pueden ser indicativos de insuficiencia renal es la presencia de microalbuminuria, que debe ser tratada mediante dieta, control estricto de la glucemia, presión arterial e inclusive medicación farmacológica (Torres and Zacarías, 2002). Representa aproximadamente el 40% de los pacientes que requieren terapia de reemplazo renal. El engrosamiento de la membrana basal glomerular y la expansión de la matriz extracelular mesangial, que conduce a la fibrosis, son las características principales de Nefropatía diabética. (Rossi, y col., 2018). La insuficiencia renal constituye un suceso temprano en la progresión a la ND, pues la hiperglucemia causa hipertrofia en las células mesangiales, con incremento de la transcripción génica y secreción de proteínas de matriz extracelular, como colágena, laminina y fibronectina (Álvarez y col., 2017). Varios mecanismos están involucrados en la patogénia de la ND, como el estrés oxidativo, las citoquinas inflamatorias y la fibrosis inducida por el factor de crecimiento transformante β (TGF- β). La literatura reciente destacó la importancia de los mecanismos epigenéticos en el desarrollo de ND, los factores ambientales y de estilo de vida pueden desencadenar cambios epigenéticos como las modificaciones de las histonas, que se cree que están asociadas con esta patología. Las histonas desacetilasas (HDAC) están involucradas en varias vías biológicas relevantes para la etiología, así como en la patogénesis de la DN. El estrés oxidativo y la inflamación crónica estimulan el factor nuclear κ B (NF- κ B), que es el regulador clave de las citocinas proinflamatorias y quimiocinas que promueven la inflamación. (Cigarran, 2017)

Al igual que la retinopatía diabética, es más frecuente en diabetes tipo I, tratada tardíamente conduce a insuficiencia renal crónica. La lesión del glomérulo renal llamada glomeruloesclerosis o síndrome de Kimmelstiel Wilson es específica de la diabetes.

El trastorno desencadenante es funcional y consiste en el aumento de flujo sanguíneo a nivel renal con hipertrofia de los corpúsculos renales y aumento de la filtración glomerular. Estas son alteraciones precoces que se pueden revertir. La hipertrofia renal continúa con el engrosamiento de la membrana basal y del mesangio de los capilares en forma difusa y por

depósito de las proteínas plasmáticas filtradas: glomeruloesclerosis difusa. Estas manifestaciones estructurales aumentan la fuga de las proteínas del plasma.

A medida que avanzan las lesiones renales aparecen nódulos hialinos de una sustancia proteica similar a la membrana basal en sectores del glomérulo que anulan en segmentos todas las estructuras: glomeruloesclerosis nodular, de algunos glomérulos respetando otros para después comprometerlos en su totalidad, reemplazándolos por acúmulos de sustancia acidófila sin ninguna arquitectura. Se puede observar cilindruria sin hematuria ni leucocituria. La tensión arterial comienza a elevarse, junto con la creatininemia y la uremia, lo que conlleva a la insuficiencia renal terminal.

Con respecto a la hiperfiltración renal al comienzo de la nefropatía, los mecanismos asociados principalmente relacionados a la microangiopatía diabética, no sólo en el comienzo de la disfunción, sino también de forma determinante en su progreso por lo que se concluye que la disfunción renal del diabético constituye una expresión particular del daño microvascular.

8.1 Contribución de los AGE a la nefropatía

Los AGE resultantes de la hiperglicemia inducen un aumento de la permeabilidad vascular y por lo tanto a la hiperfiltración. Dentro de los mecanismos que lo propician se encuentra la liberación de mediadores vasoactivos y proliferativos al actuar sobre receptores para proteína-AGE de las células mesangiales.

Se ha demostrado el papel del factor de crecimiento insulinoide tipo 1 (IGF-1), cuya administración en sujetos sanos consigue replicar parte de los fenómenos observados en la nefropatía diabética: vasodilatación e hiperfiltración. Este es uno de los factores de crecimiento que son inducidos por la interacción de las proteínas glicosiladas con sus receptores.

Por otro lado, el depósito de proteínas glicadas constituye al engrosamiento de la membrana basal y a los cambios en la permeabilidad glomerular que en conjunto con la expansión mesangial explican la glomeruloesclerosis difusa nodular.

8.2 Papel del aumento del sorbitol

El aumento del sorbitol intracelular generado por la acción de la enzima aldosa reductasa sobre la glucosa juega un papel determinante en la hiperfiltración, se ha descrito una disminución de la tasa de filtración glomerular (TFG), tras la administración prolongada de inhibidores de aldosa reductasa. Este efecto se atribuye a la reducción de los niveles de angiotensina producto de la reducción de la enzima convertidora, según investigaciones recientes, la entrada profusa de glucosa a la célula mesangial produce alteraciones clave en la patogenia de la nefropatía diabética. En ella, la activación de PKC, a causa de la estimulación de la vía del poliol. En el núcleo, la PKC y las MAP-quinasas activadas por esta, estimulan la expresión de los genes de proteínas matriz mesangial y de TGF- β . Lo primero contribuye a la acumulación de matriz mesangial ya mencionada. En cambio, el TGF- β activa a dos proteínas reguladores: p21 y p27, que detienen el ciclo reproductivo de la célula mesangial en la transición G₁/S. Se bloquea así la síntesis de ADN, la célula mesangial duplica su volumen citoplasmático sin que se produzca la mitosis, ocurre hipertrofia celular resultando en expansión mesangial, que si no se detiene a tiempo termina estrangulando a los capilares glomerulares y que desencadena la insuficiencia renal. Se cree que la activación mesangial se favorece por la presencia de AGE en esta región, y que las células mesangiales son cruciales para la estimulación fibroblástica y la fibrosis.

Otros factores que participan en el desarrollo de la nefropatía diabética son las condiciones de hiperinsulinemia e hiperglicemia que aumentan *per se* la reabsorción tubular de sodio, lo que produce la disminución del flujo distal y la expansión del volumen extracelular que causan un aumento de la TFG.

Se puede afirmar que la microangiopatía diabética tiene su origen en el estado de hiperglicemia crónica y que los mecanismos fisiopatológicos por los que la hiperglicemia desencadena las lesiones microvasculares son:

- La estimulación de la vía metabólica del poliol que conduce a hipertrofia celular.
- Liberación de vasoconstrictores.
- Trastornos en la reología sanguínea.

-Depleción de las defensas enzimáticas contra el estrés oxidativo en las células sanguíneas y endoteliales.

-La formación de productos finales de la glicosilación avanzada (AGE) causante de afecciones estructurales de las proteínas que conforman la matriz extracelular son:

-El estancamiento y depósito de proteínas no glicadas.

-Inducción de la síntesis de mediadores químicos proinflamatorios, procoagulantes y factores de crecimiento y obstrucción progresiva del área luminal en los vasos y al incremento del estrés oxidativo y carbonilo, producido por la depleción de los sistemas antioxidantes de la célula y la producción de intermediarios glicosados altamente reactivos responsables de catalizar y producir lesiones endoteliales.

El estudio de los mecanismos fisiopatológicos de la retinopatía y la nefropatía diabética enriquecen el análisis de la microangiopatía en diferentes tipos celulares. Las lesiones de la retinopatía diabética se producen al dañarse los pericitos retinianos por el incremento del sorbitol intracelular en la barrera hematorretinal y favorece la proliferación. Las lesiones de la nefropatía se producen por el engrosamiento de la membrana basal y a los cambios en la permeabilidad glomerular que en conjunto con la expansión mesangial explican la glomerulosclerosis difusa y nodular. (León-Regal y col., 2013).

8.3 Flujo de calcio al intracelular, otra fuente de lesión endotelial

Se ha encontrado que el aumento en el flujo de calcio intracelular, inducido por glicemia, lo que a su vez induce la expresión de proteínas formadoras de Canales Iónicos de Potenciales Transitorios Tipo 1 (TRPC1) en las células endoteliales, es lo que incrementa a largo plazo la entrada de calcio a la célula, aumentando sus conocidos efectos tóxicos, contribuyendo a su vez al daño microvascular.

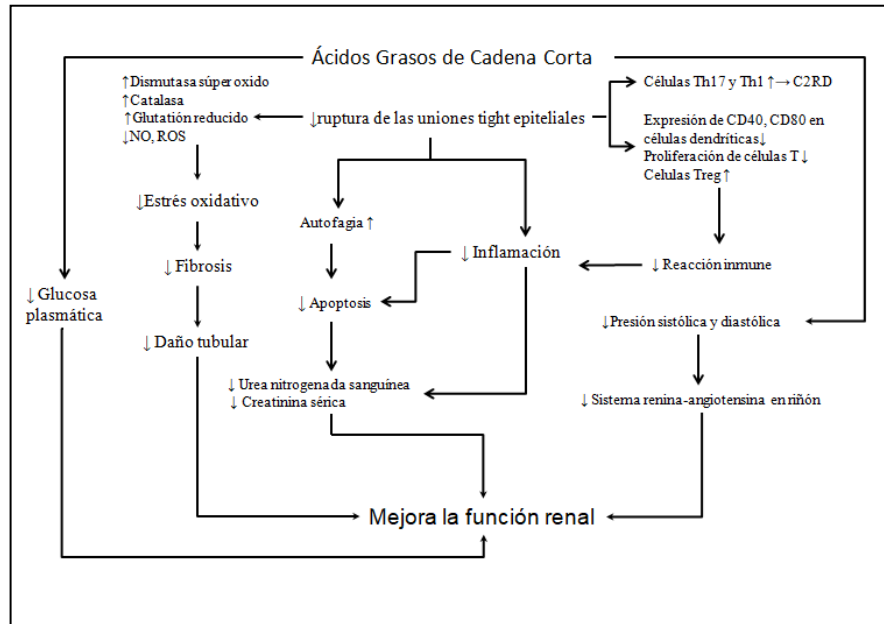


Figura 4. Efecto de los ácidos grasos de cadena corta en la patología de la enfermedad renal.

Li y col., 2017 mencionan los posibles efectos benéficos de los AGCC en la mejora de la función renal, disminuyendo la pérdida de las uniones tight epiteliales. Después de ser absorbidos en la sangre, los AGCC suprimen el estrés oxidativo al aumentar la superóxido dismutasa, la catalasa y el glutatión reducido, y al disminuir el óxido nítrico (NO) y las especies reactivas de oxígeno (ROS), proponen que esto puede disminuir la fibrosis renal y disminuyendo el daño tubular. Además, plantean que también pueden inhibir la apoptosis al promover la autofagia y suprimir la inflamación participando en la polaridad de los macrófagos hacia un perfil antiinflamatorio, disminuyendo así la creatina sérica y el nitrógeno ureico en sangre para mejorar la función renal. Concluyendo que los AGCC

mejoran en la presión arterial y los niveles de glucosa en plasma, lo que puede ayudar a mejorar la función renal en las enfermedades renales crónicas (Figura 4).

El tributirato, un derivado del butirato que en estudios recientes han demostrado que modula la generación y función de Factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), proteína que interviene en la generación de fibrosis por acción inductora de síntesis de procolágeno y colágeno en los podocitos peritubulares renales, esto observado en estudios a nivel histológico de animales con insuficiencia renal.

8.4 El eje intestino-riñón

Como se mencionó anteriormente, la enfermedad renal crónica provoca una disbiosis importante a nivel de colon, además de una alteración significativa en la estructura y función de la mucosa colónica, estos cambios contribuyen de manera importante a la progresión de la enfermedad renal.

Huang y col., en 2017 resaltan el papel de los AGCC en la lesión renal inducida por la respuesta inflamatoria. Ahora es sabido que los procesos renales inflamatorios e inmunes juegan un papel principal en la lesión renal que conduce a glomeruloesclerosis y fibrosis intersticial. La inflamación renal se ha podido relacionar directamente con la carga bacteriana y las endotoxinas generadas por la disbiosis intestinal y conduce al desarrollo de la insuficiencia renal aguda, y que aunado a condiciones de infección permanente acelera el proceso de la enfermedad renal crónica, por lo que proponen una íntima conexión entre el intestino y el riñón denominada eje intestino-riñón

En la ERC el flujo de urea en el colon se encuentra incrementada, esta urea se convierte en hidróxido de amonio por acción de bacterias productoras de ureasa, el resultado es la alteración del pH y consecuente daño a la mucosa. Estudios recientes confirman la Hipótesis de disbiosis- progresión de enfermedad renal. En los estudios en ratas con nefrectomía parcial se han encontrado diferencias significativas en las colonias y *phylum* bacterianos que presentan. Adicionalmente, otros investigadores han encontrado incrementos en el número de bacterias productoras de ureasa, uricasa, p-cresol y formadoras de indoles en pacientes

con enfermedad renal en fase terminal (ESRD por sus siglas en inglés), y reducción en el número de bacterias que sintetizan AGCC. Esta disbiosis puede resultar en un incremento de la producción de sustancias tóxicas y urémicas proinflamatorias.

Aronov y col. Verificó el origen de los compuestos urémicos en plasma de pacientes en ESRD, comparando una base de datos proveniente de pacientes que habían requerido colostomía en comparación con los pacientes con colon intacto. Identificaron cerca de 30 compuestos incluyendo indoxil sulfato, sulfato de p-cresol en pacientes con hemodiálisis, los cuales estaban ausentes aún en pacientes con colostomías, confirmando la teoría de que el colon es fuente de muchos compuestos urémicos.

Otros estudios han demostrado endotoxemia en ausencia de infecciones clínicas en pacientes con ERC, incremento de la permeabilidad intestinal a glicoles de polietileno de alto peso molecular, presencia de bacterias en la pared intestinal y linfonodos y presencia de DNA bacteriano en sangre de pacientes con hemodiálisis y no hemodializados. Adicionalmente se ha descrito una reducción marcada de las proteínas de las uniones estrechas: Claudina -1, ocludina y ZO1 como consecuencia de las toxinas urémicas, particularmente de urea. Vaziri y col., ha demostrado que las afectaciones en las uniones estrechas son en parte provocadas por la conversión de la urea intestinal en amonio e hidróxido de amonio, compuesto capaz de disolver proteínas por las bacterias productoras de ureasa. Otros factores como edema en la pared intestinal, isquemia por uso excesivo de diuréticos e hipotensión consecuencia de la hemodiálisis pueden empeorar la integridad de la barrera intestinal.

Rossi y col. (2015) mencionan que animales urémicos presentan la disminución de marcada de proteínas que conforman las uniones estrechas o uniones tight del colon: 70% menos de Claudina-1, 50-70% de Ocludina y hasta un 80-90% en ZO-1.

En la ERC el aclaramiento de citocinas proinflamatorias se asocia al desarrollo de estrés oxidativo e inflamación. El estrés oxidativo y la inflamación crónica estimulan el factor de transcripción NF- κ B, que es el regulador clave de las citocinas proinflamatorias y quimiocinas que promueven la inflamación. El aumento de los productos bacterianos de

origen intestinal activa la inmunidad innata, favorece el estado inflamatorio asociado a ERC, aumenta la incidencia de enfermedad cardiovascular y la mortalidad. (Cigarran y col, 2017).

En resumen, tenemos que la translocación de bacterias, LPS, endotoxinas, entre otros promueve la activación de proteínas TLR4, NF- κ B, citocinas como TNF α , IL-1 β de acción proinflamatoria; además el aumento de toxinas urémicas en el lumen intestinal promueve la síntesis de óxido nítrico, aumentando la irrigación del tejido inflamado y liberación de radicales libres. Indoxil sulfato se considera la toxina urémica con mayor efecto proinflamatorio, pudiendo promover el aumento de NF- κ B, TGF- β 1, inhibiendo activadores de plasminógeno, aumentando la producción de pro colágena α 1. (Figura 5)

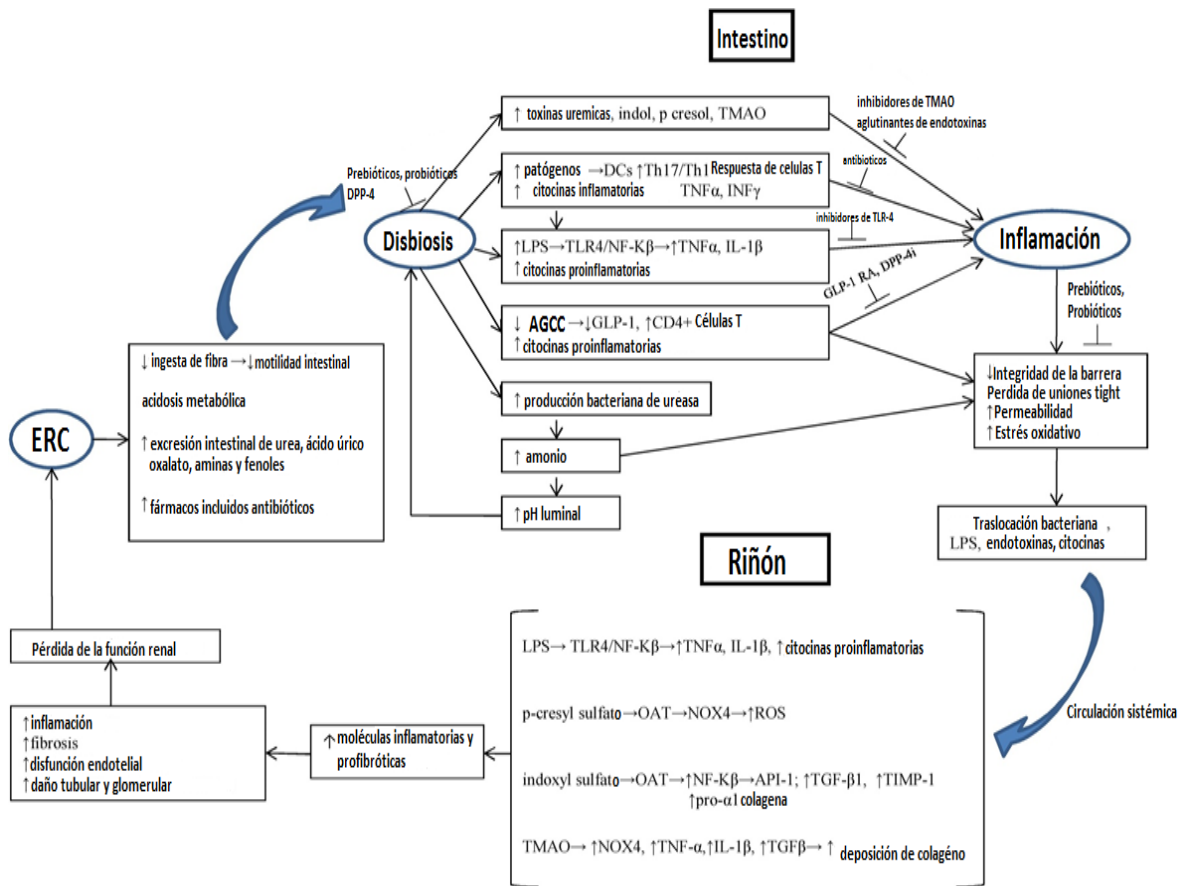


Figura 5. Eje intestino-riñón en la patología de la enfermedad renal.

Modificado del artículo "Ácidos grasos de cadena corta derivados de microbiota intestinal y enfermedades renales". Li L, Ma L, Fu P. 2017

La transcripción génica en células eucariotas está profundamente influenciada por la forma en que se empaqueta el ADN. Las modificaciones postrasduccionales de las histonas, incluidas la acetilación, la fosforilación, la metilación y la ubiquitinación, juegan un papel importante en la regulación transcripcional. En particular, la acetilación de las colas de histona, mediada por la histona acetiltransferasas, se asocia con la activación transcripcional del gen, mientras que la disminución de los niveles de acetilación, mediada por histona desacetilasa (HDAC), se asocia con la represión transcripcional. (Noh y col., 2009). La acetilación de histonas desempeña un papel crucial en la estructura, integridad y función de la cromatina. Es un proceso reversible, y la acetilación de la cromatina modula su estructura y expresión de genes.

9. DIAGNÓSTICO DE LA DIABETES MELLITUS

La insulina permite la entrada de glucosa a las células que presentan GLUT4 para transportar glucosa a su interior, así como para síntesis de glucógeno, anabolismo de lípidos y proteínas y el almacenamiento de estos. Inhibe el proceso de glucogenólisis, cetogénesis, lipólisis y gluconeogénesis. En individuos diabéticos la deficiencia de insulina permite el control de glucagón sobre la glucogenólisis hepática, incrementando la producción de glucosa, generando hiperglucemia que se agrava por la baja absorción de esta del torrente sanguíneo al medio intracelular. Cuando los niveles de glucosa exceden los 12mmol/L, se rebasa la capacidad de los túbulos renales para absorber glucosa, lo que genera glucosuria, en consecuencia, diuresis osmótica y polidipsia compensatoria.

Cuando el organismo detecta cantidades bajas de sustrato energético, activa la movilización de los sustratos de reserva, generando cetonas a partir de lípidos. La deficiencia severa de insulina o exceso de glucagón estimulan la cetogénesis, cuando los niveles de cetonas rebasan la capacidad del organismo para amortiguar el pH, se presenta acidosis metabólica generando un individuo cetoacidótico.

Existen diversas pruebas para diagnóstico de diabetes en individuos con hiperglucemia y glucosuria crónica. Algunas se mencionan a continuación.

Hemoglobina Glucosilada: Las proteínas séricas glucosiladas que se forman como resultado de la reacción entre glucosa y el grupo amino de los residuos de lisina de las proteínas. Esta reacción es irreversible, por lo tanto, el resultado refleja la concentración de glucosa plasmática en un periodo prolongado, de dos a tres meses.

Prueba de tolerancia a la glucosa: se puede realizar en individuos con hiperglucemia leve, para determinar si presentan diabetes de manera definitiva. Se utilizan soluciones glucosadas que se administran por vía oral o endovenosa, para posteriormente realizar mediciones de glucosa en sangre a distintos tiempos: 0, 5, 10, 15 y 30 minutos y determinar de acuerdo con los valores que presenta el individuo, cuál es el tratamiento por seguir.

Alteraciones bioquímicas: en estas se incluyen hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia. La lipemia se observa notablemente aumentada en individuos con diabetes.

La lipidosis hepática origina un aumento en la concentración de fosfatasa alcalina (FA). La obstrucción de las vías biliares y la enfermedad hepatocelular pueden producir elevación de alanina aminotransferasa (ALT) e incluso aspartato aminotransferasa (AST), lo cual refleja el catabolismo de los tejidos periféricos, aunado a la enfermedad hepatocelular.

Determinación de cetonas: dependiendo del tipo y severidad de la DM, pueden presentarse cetonemia o cetonuria. Esta determinación suele ser semicuantitativa, cuando su medición es mediante tiras reactivas, las cuales suelen ser más sensibles al acetoacetato y a la acetona que al beta hidroxibutirato, también puede ser de tipo cuantitativo de beta hidroxibutirato.

Hemograma: los cambios suelen ser poco evidentes, la deshidratación puede incrementar el valor del hematocrito (HT) y la inflamación asociada puede aumentar la cuenta de las células blancas (leucocitosis) e inclusive desviación izquierda.

Urianálisis: se pueden observar infecciones de tracto urinario; hematuria, piuria, proteinuria y bacteriuria, también se observa glucosuria, cetonuria en casos crónicos no controlados, poliuria e incremento de la densidad urinaria (hiperstenuria).

10. DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD RENAL

Este se puede basar en: Historia Clínica; examen clínico del individuo, análisis de orina, bioquímica sanguínea y hemograma. Examen microbiológico, estudios de gabinete: radiografía, ultrasonografía, endoscopia, laparoscopia, además de otros como la biopsia y citología y a la necropsia.

Pruebas de funcionamiento renal: estas pruebas incluyen a los analitos que nos permiten conocer el sitio y grado de afectación del parénquima renal para establecer el diagnóstico y brindar un pronóstico, entre ellas se encuentran:

Urea sérica: esta prueba en conjunto con creatinina, densidad urinaria y el examen clínico, son las más importantes para el diagnóstico diferencial de hiperazotemia. Es el principal producto del catabolismo proteico, es filtrada por los glomérulos. Es un indicador con especificidad limitada, ya que en el túbulo renal se reabsorbe del 25 al 40%.

Creatinina sérica: formada a partir de la creatinina muscular y de la fosfocreatina, no se afecta por el consumo en dieta, catabolismo proteico, edad, sexo o ejercicio. Se excreta en la orina después de ser filtrada en los glomérulos, no sufre reabsorción en túbulos renales y se considera un buen indicador del ritmo de filtración glomerular. La creatinina se elimina con más facilidad que la urea y generalmente se aumenta después que esta, es por ello que ambas en conjunto son muy importantes en la determinación de la función renal.

Densidad urinaria: se refiere a la masa que posee por unidad de volumen. Es la forma indirecta de medir la concentración de partículas que hay disueltas en la orina. Refleja la capacidad del riñón para concentrar la orina, cuando estos valores están por debajo del punto crítico hay que analizar en conjunto las características de la orina, así como la historia clínica para determinar la causa.

Análisis de orina: la orina se forma a partir del plasma que circula por los riñones y es producto de la activación de tres mecanismos: filtración glomerular, secreción y reabsorción tubular. Si alguno de estos mecanismos es afectado se verá reflejado en las características de

la orina, consta del estudio físico y químico de la orina, los parámetros a evaluar son los siguientes:

Examen físico: color, olor, aspecto, volumen, osmolaridad, densidad y espuma.

Examen químico: pH, proteinuria, glucosuria, cetonuria, bilirrubinuria, urobilinógeno, hemoglobina/sangre oculta, hematuria. Hemoglobinuria, mioglobinuria.

Examen microscópico del sedimento: leucocitos, eritrocitos, células epiteliales, cilindros, cristales, bacterias, hongos, espermatozoides, fases evolutivas de parásitos, grasa.

Proteínas en suero: en especial albúmina, al ser una proteína muy pequeña, puede observarse pérdidas por capilaridad o secuestro.

Pruebas de concentración: la deshidratación estimula la liberación de la hormona antidiurética en la hipófisis, esta hormona aumenta la reabsorción de agua en células epiteliales de los túbulos colectores, aumenta la concentración de orina y por ende la densidad urinaria. La prueba de concentración de agua es la más sencilla de todas las pruebas de concentración de orina y proporciona buena información acerca del estado de la función renal.

Pruebas de depuración o aclaramiento: la prueba de excreción fraccional urinaria es la prueba de depuración de uso más frecuente, también existe la prueba de depuración de creatinina, entre otras. Las sustancias para obtener la tasa de filtración glomerular (TFG) deben caracterizarse por ser filtradas en su totalidad por el glomérulo, y no ser reabsorbidas o secretadas en los túbulos, ni tener efecto sobre la tasa de filtración.

Hemograma: un hemograma con anemia normocítica normocrómica refleja incapacidad del organismo por reposición de las células rojas, la eritropoyetina se produce en riñón, por lo que este tipo de anemia evidencia la incapacidad de este para producirla, sin embargo, este cambio sólo se observa en enfermedad renal crónica en estado avanzado.

11. JUSTIFICACIÓN

Dada la importancia de una buena concentración de ácidos grasos a nivel intestinal, así como los beneficios que estos confieren en circulación sistémica en enfermedades donde es importante el control glucémico e inflamatorio del individuo, es necesario tener opciones viables de medicación que ayuden a contrarrestar los efectos degenerativos en individuos con diabetes y enfermedad renal. Conociendo las diferentes formas de acción del ácido butírico y por lo tanto en su forma farmacéutica como tributirina y sus posibles beneficios para ambas enfermedades, es importante probar el efecto de la suplementación con tributirina por vía oral en ratas con diabetes e insuficiencia renal inducidas experimentalmente, para conocer los efectos a nivel sistémico, mediante la medición de los marcadores metabólicos de ambas enfermedades.

12. HIPÓTESIS

La suplementación a corto plazo (4 semanas) con tributirina por vía oral a ratas con diabetes e insuficiencia renal, mejorará la salud intestinal, disminuyendo el paso de compuestos tóxicos del lumen intestinal a la circulación sistémica, contribuyendo a mantener la salud renal y mejorando el metabolismo de la glucosa disminuyendo así el daño a tejidos provocado por hiperglucemia, esto puede corroborarse con la medición de parámetros sanguíneos y urianálisis.

13. OBJETIVOS

13.1 Objetivo general:

Conocer el efecto de la suplementación con tributirina administrada por vía oral en ratas Wistar macho inducidas experimentalmente con diabetes e insuficiencia renal, mediante el análisis de resultados obtenidos a partir de hemogramas, bioquímicas sanguíneas y urianálisis, que permitan observar el comportamiento de los analitos en ambas enfermedades, con la finalidad de determinar si existen efectos deseables para su posible uso terapéutico.

13.2 Objetivos particulares:

- Realizar monitoreo sanguíneo de 3 grupos de ratas, 2 grupos inducidos experimentalmente con DM y un grupo de ratas sanas, mediante:

- análisis de sangre: hemograma y bioquímica sanguínea

- toma de orina: urianálisis.

- Realizar monitoreo sanguíneo de 3 grupos de ratas, 2 grupos inducidos experimentalmente con DM y un grupo de ratas sanas, para evaluar la función renal mediante:

- análisis de sangre: hemograma, bioquímica

- toma de orina: urianálisis

- Realizar curvas de glucosa a los grupos del estudio para comparar el comportamiento de la curva en cada grupo.

14. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio se llevó a cabo en ratas Wistar macho clínicamente sanas con un peso aproximado de 200-250g de 8 semanas de edad aproximadamente. El experimento contó con tres grupos experimentales con n=10, calculada para el estudio considerando una $P \leq 95$, de mínimo 9 individuos por grupo. Las ratas fueron adquiridas del Banco Genético del Bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bioterio autorizado por SAGARPA-SENASICA B00.02.08.01.01. 1955/2016. Clave AUT-B-C-1216-030. **(Imagen 4)**

Para la fase experimental las ratas se alojaron en la sala 516 del bioterio de la Unidad de Experimentación Animal (UNEXA) en el edificio E perteneciente a la Facultad de Química que cumple con la NOM-062-ZOO-1999, por lo que se mantuvieron bajo condiciones controladas de luz- oscuridad 12h/12h, humedad relativa de 50%, temperatura entre $23 \pm 1^\circ\text{C}$, sistema de ventilación con filtro HEPA permitiendo 14 recambios de aire/h y gradientes de presión entre los cuartos de experimentación y el resto de las áreas y ruido menor a 85 decibeles,. El material de cama que se utilizó como sustrato fue sometido esterilización por

autoclave y bajo en polvos. Las ratas fueron alimentadas *ad libitum* con alimento balanceado para animales de laboratorio en fase de mantenimiento BDL-7100®, Avene y bebían agua esterilizada con ozono.

El experimento fue aprobado por el SUBCOMITÉ INSTITUCIONAL PARA EL CUIDADO Y USO DE ANIMALES EXPERIMENTALES (SICUAE), con el número MC-2018/2-1.

El experimento estuvo dividido en tres fases. (Figura 6).

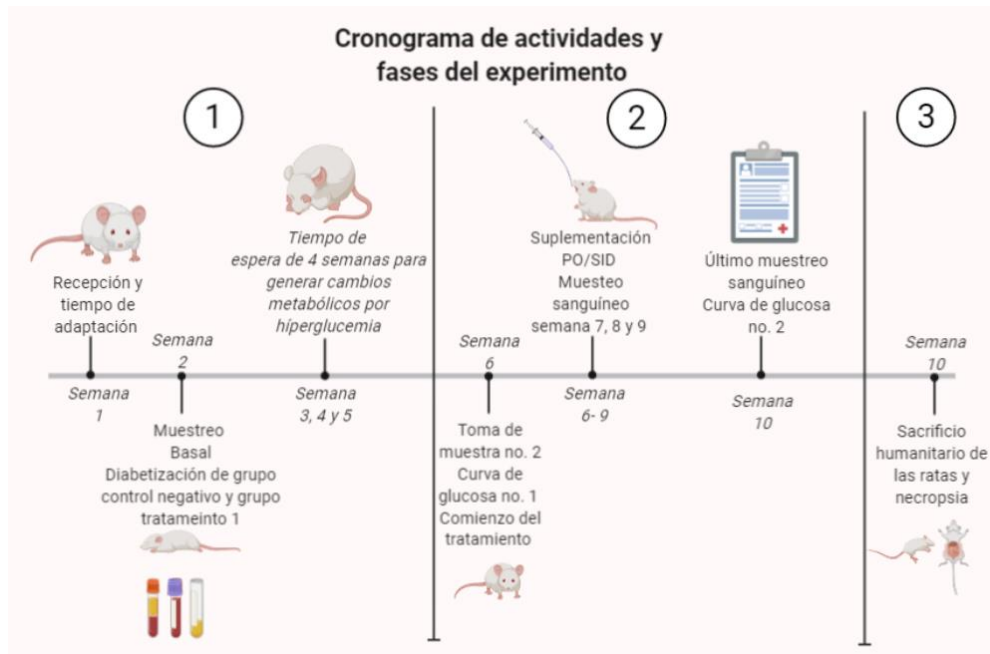


Figura 6. Cronograma de actividades y fases del experimento

14.1 Primera fase

En esta fase se llevó a cabo la recepción de las ratas, y su adecuación al nuevo ambiente, pesaje, conformación de cada grupo, dosificación de estreptozotocina a los grupos correspondientes e inducción a la enfermedad, tuvo una duración de aproximadamente 2 semanas.

Los grupos se conformaron de la siguiente manera (Tabla 2):

14.1.1 Diseño experimental

Se realizó un diseño completamente al azar para modelos mixtos con medidas repetidas a lo largo del tiempo, compuesto por dos grupos experimentales (DM-Tb y DM-Placebo) y un grupo control (Sanas-Tb).

Tabla 2 Conformación de los grupos del estudio.

Grupo	Estreptozotocina	Tributirina	Suplementación
Grupo experimental 1 DM-Tb (n=10)	✓	✓	Tributirina 450mg/kg
Grupo control negativo DM-Placebo (n=10)	✓	✓	SSF 4.5ml/kg
Grupo experimental 2 Sanas-Tb (n=10)	-	✓	Tributirina 450mg/Kg

- Grupo experimental 1 DM-Tb: Diabetes + suplementación por vía oral con tributirina 450mg/Kg.
- Grupo control negativo DM-Placebo: Diabetes + administración vía oral de SSF 4.5ml/kg
- Grupo experimental 2 Sanas-Tb: Ratas sanas + suplementación vía oral con tributirina 450mg/Kg

14.1.2 Muestreo sanguíneo

En esta fase se llevó a cabo el primer muestreo sanguíneo de las ratas para así obtener los valores basales de los parámetros sanguíneos. Previo a la toma de muestra sanguínea se colocó a las ratas en racks metabólicos individuales con acceso a agua *ad libitum*, pero sin acceso a alimento sólido durante cuatro horas, lo que permitió coleccionar orina para realizar urianálisis, la muestra se coleccionó en un tubo para colección de orina (BD Vacutainer Urine Analysis Preservative tube) para realizar la medición de pH, proteína, glucosa, cetonas, bilirrubina, hemoglobina/sangre, densidad urinaria y creatinina (**Imagen 1**). La muestra

sanguínea fue extraída introduciendo un capilar sin anticoagulante en el canto medial del ojo de las ratas para acceder a seno orbital y las muestras fueron almacenadas en tubos microtainer de 1 ml (BD Microtainer), de los cuales en tubos con EDTA (BD Microtainer con K₂EDTA) se colectó un aproximado de 300µL para realizar hemogramas y alrededor de 800µL para el estudio de bioquímica sanguínea se colectaron en tubos sin anticoagulante (BD Microtainer no additive tubes) (Morales, 2018) (**Imagen 2**). Posterior al muestreo se aplicó en el ojo humectante a base de hialuronato de sodio (Humectan®) para disminuir complicaciones de irritación del globo ocular. Este procedimiento requirió de la anestesia de las ratas, el protocolo a usar fue isoflurano (Sofloran® 250 mL) a dosis efecto. A las ratas del grupo 1 y grupo 2 les fueron realizados un total de seis muestreos a lo largo del estudio, a las ratas del grupo 3 se les realizaron 5 muestreos, ya que a causa de la contingencia sanitaria fue necesario recortar el experimento.

Los analitos medidos fueron:

Hemograma: Hematocrito, hemoglobina, eritrocitos, Volumen Globular Medio (**VGM**), Concentrado Globular Medio de Hemoglobina (**CGMH**), plaquetas, leucocitos, neutrófilos, linfocitos y eosinófilos.

Bioquímica: Glucosa, BUN, urea, creatinina, proteína, albumina, globulina, relación A/G, colesterol, triglicéridos, Bilirrubinas, alanina aminotransferasa (**ALT**), aspartato transaminasa (**AST**), fosfatasa alcalina (**FA**).

Urianálisis: pH, microproteínas totales, creatinina, glucosa, cetonas, sangre/hg y densidad urinaria.

Después de la primera muestra sanguínea comenzó el protocolo de diabetización de los grupos 1 y 2.



Imagen 2. Racks metabólicos para toma de muestra urinaria



Imagen 1. Mesa con material para toma de muestra sanguínea

14.1.3 Inducción experimental de Diabetes mellitus

Se realizó el procedimiento al Grupo experimental 1 DM-Tb y al Grupo control negativo DM-Placebo, fueron inducidos a presentar diabetes de origen químico. La inducción a la diabetes se realizó mediante la administración de estreptozotocina (Sigma-Aldrich) vía endovenosa a una dosis de 45mg/kg en vena caudal (Nogueira y col. 2017) (Imagen 3). La estreptozotocina (STZ) fue diluida previamente en buffer de citratos pH 4.5 (Velázquez, 2008; Miric y col., 2001). Para la administración del fármaco se requirió la canalización de la vena caudal con un catéter de 24G y $\frac{3}{4}$ de pulgada de largo (ESTRUCAT™).

Se utilizaron 15 ratas para la determinación del modelo de diabetización, ya que el artículo de referencia recomienda la dosis de 75 mg/kg de estreptozotocina (STZ) vía endovenosa (EV), a 5 ratas les fue practicado este protocolo, sin embargo, la dosis recomendada fue letal para cuatro de las ratas, por lo que se procedió a utilizar 10 ratas para probar diferentes dosis de STZ y así encontrar la dosis mínima efectiva. Se probaron las siguientes dosis: 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg, 50mg/kg y 55 mg/kg. Posterior a la administración de STZ se monitoreo

el estado físico de las ratas, actitud, así como la cuantificación de glucosa a las 24, 48 y 72 horas. Después de la inducción se concluyó que la dosis mínima efectiva fue de 45mg/kg.



Imagen 4. Administración EV de STZ a ratas.



Imagen 3. Alojamiento de las ratas

Posterior a la administración de estreptozotocina se comenzó con el monitoreo de glucosa a través de la toma de muestras sanguíneas de la vena caudal por punción y la cuantificación de glucosa, mediante el uso de glucómetro digital (OneTouch®ultra mini Johnson&Johnson) y tiras reactivas (OneTouch® mini) (Trinder, 1969), la primera toma a las 48 horas y la segunda a las 72 horas posteriores a la administración con STZ. Se consideró diabéticas a las ratas que en ayuno de alimento sólido de 4 horas presentaron valores arriba de los 209 mg/dL de glucosa (Miric y col., 2001). Con este método de Diabetización se observó un buen porcentaje de éxito, 85% de las ratas inducidas a diabetes presentaron hiperglucemia, sin embargo, por este método el monitoreo de glucosa se extendió hasta las 72 hrs.

El Grupo experimental 2 Sanas-Tb lo conformaron 10 ratas Wistar macho con iguales características del G1 y G control negativo, las cuales se conservaron sanas y solo recibieron la suplementación con tributirina calculada a dosis de 450g/kg PV.

Una vez que se caracterizaron los grupos experimentales, se mantuvo al grupo 1 y 2 durante cuatro semanas sin tratamiento. Este tiempo de espera formó parte del protocolo de enfermedad renal crónica por hiperglucemia reportado por Nogueira y col 2017, en una revisión de modelos experimentales de enfermedad renal crónica.

14.2 Segunda fase

Comenzando la semana seis se realizó el segundo muestreo sanguíneo y colección de orina bajo las mismas condiciones del primer muestreo.

Seguido del muestreo sanguíneo se realizaron curvas de glucosa a los tres grupos experimentales, este procedimiento requirió del ayuno de las ratas, por lo que para cada curva se mantuvo a las ratas en condiciones de ayuno de alimento sólido de 4 horas, con disponibilidad de agua *ad libitum*. Posteriormente se administró una solución de dextrosa al 30% en dosis de 2g/kg PV vía oral a cada una, administrada por medio de una sonda larga de alimentación. Se tomó la glucosa mediante la punción de vena caudal y se cuantificó la glucosa con un glucómetro (glucómetro OneTouch®ultra mini Johnson&Johnson) y tiras reactivas (OneTouch® mini), documentando los valores en los minutos: 0, 30, 60, 90 y 120 post administración de solución. La glucosa utilizada fue dextrosa reconstituida en agua destilada a una concentración de 30% (Urzúa, 2011).

Al terminar las curvas de glucosa comenzó la administración de tributirina vía oral con ayuda de una sonda gástrica larga a dosis de 450 mg/kg, esta dosis fue establecida a partir de la investigación publicada por González y col, en el año 2018 a los grupos Tratamiento 1 y Tratamiento 2 del experimento, mientras que al Grupo Control Negativo se le administró solución salina fisiológica vía oral a dosis de 4.5 ml/kg.

La suplementación con tributirina se realizó diariamente durante cuatro semanas al grupo Tratamiento 1 DM-Tb y Grupo Tratamiento 2 Sanas-Tb, tiempo en el cual se realizaron muestreos sanguíneos semanales, hasta la semana ocho para el grupo Tratamiento 1 DM-Tb y Grupo Tratamiento 2 Sanas-Tb, y hasta la semana 4 para el grupo.

Después de la última toma de muestra sanguínea se realizó una segunda curva de glucosa a los tres grupos como se describió anteriormente.

14.3 Tercera fase

Después de realizadas las curvas de glucosa se procedió a la muerte humanitaria de las ratas, para ello se colocaron en grupos de cuatro en una cámara de CO₂ durante 5 minutos, para

determinar la muerte se observaron signos de ausencia de vida: ausencia de frecuencia cardíaca, ausencia de frecuencia respiratoria y relajación de esfínter anal, dilatación pupilar. Al salir de la cámara se realizó dislocación cervical manual para asegurar la muerte y se procedió a realizar necropsias, observación de lesiones macroscópicas. (NOM-062-ZOO-1999. AVMA Guidelines for the Euthanasia of animals: 2020 edition. pp60).

A lo largo del estudio se realizó la observación del comportamiento de los individuos de los grupos procurando su calidad de vida, fueron sometidos a intoxicación con CO₂ los individuos que presentaron signos de dolor como: anorexia, lo que se puede determinar por ausencia de heces, hiporexia, actitudes de rascado o inflamación localizada, vocalización, inquietud, descarga de porfirinas, hiperventilación, resistencia al movimiento, cambios de comportamiento, falta de acicalamiento.

15. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se analizaron mediante análisis de varianza, utilizando PROC GLM de SAS (versión 9.3; SAS Ins. Inc., Cary, NC). Se realizó un análisis de medias de mínimos cuadrados con ajuste para comparaciones múltiples: Tukey- Kramer. El modelo incluyó tratamiento, muestra, animal, muestra / animal e interacciones. Los resultados expresan la media y el error estándar con una significancia $p < 0.0001$

16. RESULTADOS

El análisis permitió observar las concentraciones de cada analito por periodo, que se refiere a cada toma de muestra y por tratamiento, analizando la media de los valores obtenidos a lo largo del estudio por grupo, evidenciando lo siguiente:

16.1 Hemograma

La tabla 2 describe el registro de los analitos durante el muestreo por periodo y por grupo, resaltando en color azul los periodos que mostraron significancia estadística. El periodo uno corresponde al muestreo basal de los animales, en el análisis por periodo por grupo tanto en hematocrito, eritrocitos, VGM, CGMH, plaquetas, leucocitos y eosinófilos no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos del estudio.

El análisis de hemoglobina mostró diferencia estadística en el periodo 5, el grupo Tratamiento 2 mostró valores significativamente más bajos en comparación con el grupo Tratamiento 1 y el Grupo Control Negativo. Neutrófilos y linfocitos mostraron significancia estadística en el segundo periodo entre los grupos de estudio, donde tanto el Grupo Control Negativo como el grupo Tratamiento 2 mostraron niveles significativamente más bajos que el grupo Tratamiento 1. (**Tabla 3**).

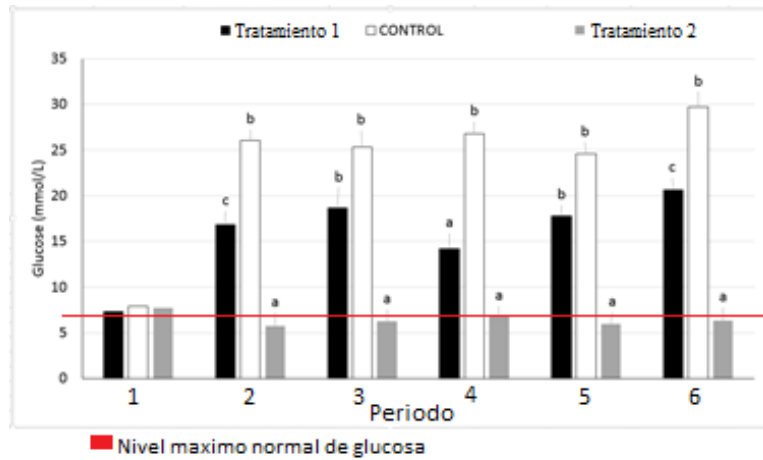
Los resultados del análisis por tratamiento y por grupo permitieron observar que los valores de eritrocitos, VGM, CGMH, leucocitos, neutrófilos, linfocitos y eosinófilos no presentaron significancia estadística. En el análisis por tratamiento por grupo los valores de hematocrito y hemoglobina fueron significativamente más bajos en el grupo Tratamiento 2 en comparación con el grupo Tratamiento 1 y Control negativo, además se observó que las plaquetas son significativamente más bajas en el grupo tratamiento en comparación con los grupos Control Negativo y Tratamiento 2. (**Tabla 4**).

16.2 Bioquímica sanguínea

La **tabla 5** describe el registro de los analitos durante el muestreo por periodo a cada grupo. AST, globulina, relación A/G no mostraron diferencias estadísticas en el análisis por periodo entre los grupos del estudio. Los valores de creatinina, colesterol, triglicéridos, ALT, BUN y bilirrubinas solo presentaron significancia estadística en uno de sus periodos, cada uno de estos identificados por las literales a, b, y c.

En cuanto a glucosa se pudo observar diferencias estadísticamente significativas por periodo entre los grupos del estudio a partir del segundo muestreo, correspondiente al inicio de la suplementación, además de que la diferencia estadística es significativa entre los grupos diabéticos con respecto al grupo Tratamiento 2, también se puede observar significancia entre los grupos diabéticos en el periodo 4 y 6, en la tabla las diferencias estadísticas están caracterizadas por literales: a, b, c.

Grafica 1. Valores de glucosa por periodo. Se muestra el registro de la media de los niveles de glucosa de los grupos del estudio en cada periodo, los valores resultaron significativos para cada grupo



Urea presenta diferencia estadísticamente significativa en los periodos 5 y 6, donde el grupo Tratamiento 1 y el grupo Tratamiento 2 presentan la misma literal, a diferencia del Grupo Control Negativo, que muestra valores para BUN estadísticamente más altos. En el análisis por tratamiento por grupo se observan diferencias estadísticamente significativas para los tres grupos, donde el grupo Tratamiento 1 presenta los valores más altos, seguido por el Grupo Control Negativo, el grupo Tratamiento 2 presenta los valores más bajos.

Creatinina mostró diferencias significativas en el análisis por periodo 5 donde el Grupo Control Negativo presentó una elevación en los valores con respecto al grupo Tratamiento 1 y al grupo Tratamiento 2. En el análisis por tratamiento por grupo, se observó diferencias estadísticas donde el Grupo Control Negativo presento valores más altos con respecto al grupo Tratamiento 2 y grupo Tratamiento 1, que presentan la misma literal.

Colesterol y triglicéridos mostraron un comportamiento similar en el análisis por periodo, mostrando significancia en el periodo 6 entre el grupo Tratamiento 1 con respecto al grupo Tratamiento 2. En el análisis por tratamiento por grupo sólo triglicéridos mostraron diferencias estadísticamente significativas, en las cuales el grupo Tratamiento 2 presento valores más bajos con respecto al Grupo Control Negativo y al grupo Tratamiento 1, que presentan las mismas literales.

Alanina aminotrasferasa (ALT) muestra un aumento estadísticamente significativo de esta enzima en el periodo 5, para el Grupo Control Negativo con respecto al grupo Tratamiento 1 y al grupo Tratamiento 2. En el análisis por tratamiento por grupo se observa significancia estadística de los grupos Tratamiento 1 y Tratamiento 2 con respecto al Grupo Control Negativo, este presenta valores significativamente más altos.

Aspartato aminotrasferasa (AST) solo mostró significancia en el análisis por tratamiento por grupo, donde se pudo observar que el grupo Tratamiento 2 mantuvo los valores dentro de rango, mientras que el Grupo Control Negativo y el grupo Tratamiento 1 mostraron valores elevados compartiendo la misma literal.

Fosfatasa alcalina (FA) en el análisis por periodo presenta significancia para el Grupo Control Negativo con respecto al grupo Tratamiento 2, donde el Grupo Control Negativo presenta valores estadísticamente más altos con respecto al grupo Tratamiento 2. Al análisis por tratamiento por grupo se pudo observar diferencias estadísticas entre los tres grupos, donde el grupo Tratamiento 2 presentó los valores más bajos, seguido del grupo Tratamiento 1 y el Grupo Control Negativo que presentó los valores más altos.

En cuanto a proteína total (PT), en el segundo periodo el Grupo Control Negativo y el grupo Tratamiento 1 mostraron un comportamiento similar, presentando valores estadísticamente más bajos con respecto al grupo Tratamiento 2, en el 5 periodo el grupo Tratamiento 1 mostró resultados estadísticamente más bajos con respecto al grupo Tratamiento 2. El análisis por tratamiento por grupo presenta diferencias estadísticas entre el grupo Tratamiento 2 que presenta valores más altos con respecto al Grupo Control Negativo y al grupo Tratamiento 1.

La albumina presentó algunas diferencias estadísticas entre periodos, donde el Grupo Control Negativo presentó valores significativamente más bajos al grupo Tratamiento 2 en el periodo 2 y en el 5. En el análisis por tratamiento los valores de los grupos Grupo Control Negativo y Tratamiento 1 fueron significativamente más bajos en los grupos control y Tratamiento 1 en comparación con el grupo Tratamiento 2.

Globulina no presentó diferencia estadística en el análisis por periodo. El análisis por tratamiento presenta diferencias estadísticas donde el grupo Tratamiento 1 presentó los valores más bajos, y los grupos Grupo Control Negativo y grupo Tratamiento 2 compartieron literal.

BUN presenta diferencias estadísticas en el análisis por periodo, en el periodo 2 donde el Grupo Control Negativo y el grupo Tratamiento 2 presentaron valores significativamente más bajos que el grupo Tratamiento 1, y en el periodo 5 donde el Grupo Control Negativo mostró valores significativamente más altos al grupo Tratamiento 2.

Las bilirrubinas solo muestran diferencias estadísticas en el periodo 2, donde el grupo Tratamiento 2 presentó valores más altos con respecto al Grupo Control Negativo, no se observaron diferencias en la comparación por tratamiento por grupo. **(Tabla 6).**

16.3 Urianálisis

Se pudo observar que los niveles de pH en orina presentan significancia estadística para los tres grupos en el análisis por tratamiento, el grupo Tratamiento 2 presentó la orina más alcalina, seguido del grupo Tratamiento 1 y por último el grupo Control Negativo. **(Tabla 7).**

En cuanto a la comparación de medias por tratamiento no hubo significancia estadística para PT, cetonas, bilirrubina y sangre/Hg.

La PT en orina no fue detectada ya que el método de medición solo detecta gramos sobre litro, y por las cantidades PT excretadas en orina no se considera diagnóstico para esta medida.

Los valores de glucosa en orina muestran significancia para los tres grupos, se observa los niveles más bajos de glucosa en el grupo Tratamiento 2, los grupos Tratamiento 1 y Grupo Control Negativo presenta los valores elevados de glucosa, en el periodo 6. En el análisis por tratamiento por grupo se puede observar significancia estadística entre los tres grupos, el grupo Tratamiento 2 presentó los niveles más bajos, seguido por el grupo Tratamiento 1 y los valores más altos de glucosuria correspondieron al grupo Tratamiento 2.

La DU presentó significancia estadística para el Grupo Control Negativo que presentó una orina más densa con respecto al grupo Tratamiento 1 y Tratamiento 2.

Creatinina mostro diferencia para el grupo Tratamiento 2, con niveles significativamente más altos con respecto a los grupos diabéticos (**Tabla 8**).

Tabla 3. Valores de Hemograma por período por grupo

HEMOGRAMA											
TRT	PERIODO	Hematocrito %	Hemoglobina g/L	Eritrocitos x10 ¹² /L	VGM fL	CGMH g/L	Plaquetas x10 ⁹ /L	Leucocitos x10 ⁹ /L	Neutrofilos %	Linfocitos %	Eosinófilos %
Valores de referencia		0.39-0.53	137-176 g/L	7.27-9.65	48.9-57.9	329-375 g/L	638-1177	1.96-8.25	6.2-26.7	66.6-90.3	0.2-3.5
Control Negativo	1	0.4508 ± 0.0066	183.923 ± 2.544	8.0462 ± 1.6426	57.077 ± 12.759	398.846 ± 14.403	1193.462 ± 57.556	23.038 ± 4.614	26.069 ± 2.307	70.062 ± 2.646	4.062 ± 0.839
Control Negativo	2	0.5200 ± 0.0066	203.615 ± 2.544	9.1315 ± 1.6426	55.923 ± 12.759	397.385 ± 14.403	861.846 ± 57.556	13.454 ± 4.614	26.646 ± 2.307 a	67.484 ± 2.646	5.869 ± 0.839
Control Negativo	3	0.5125 ± 0.0068	200.017 ± 2.648	15.9000 ± 1.7097	55.875 ± 13.280	388.833 ± 14.991	858.500 ± 59.906	24.858 ± 4.802	26.908 ± 2.402	69.067 ± 2.754	3.650 ± 0.873
Control Negativo	4	0.5083 ± 0.0068	198.500 ± 2.648	9.1925 ± 1.7097	55.450 ± 13.280	389.750 ± 14.991	856.667 ± 59.906	14.108 ± 4.802	28.292 ± 2.402	67.617 ± 2.753	4.092 ± 0.873
Control Negativo	5	0.5153 ± 0.0068	199.750 ± 2.648 b	9.3300 ± 1.7097	55.075 ± 13.280	387.500 ± 14.991	883.000 ± 59.906	13.950 ± 4.802	31.100 ± 2.402	63.667 ± 2.753	5.425 ± 0.873
Control Negativo	6	0.5078 ± 0.0079	186.556 ± 3.058	9.1778 ± 1.9742	55.489 ± 15.334	366.556 ± 17.310	867.000 ± 69.174	11.644 ± 5.545	26.856 ± 2.773	68.744 ± 3.180	4.400 ± 1.008
Tratamiento 1 DM-Tb	1	0.4725 ± 0.0068	185.750 ± 2.648	7.9750 ± 1.7097	57.667 ± 13.280	403.750 ± 14.991	1242.750 ± 59.906	12.908 ± 4.802	23.533 ± 2.402	72.658 ± 2.754	3.808 ± 0.873
Tratamiento 1 DM-Tb	2	0.5192 ± 0.0068	205.917 ± 2.648	9.2250 ± 1.7097	56.333 ± 13.280	395.750 ± 14.991	701.250 ± 59.906	25.492 ± 4.802	39.833 ± 2.402 b	54.05 ± 2.754 b	6.117 ± 0.873
Tratamiento 1 DM-Tb	3	0.5073 ± 0.0071	200.636 ± 2.766	9.0055 ± 1.7857	56.700 ± 13.871	394.273 ± 15.658	804.364 ± 62.570	12.082 ± 5.016	29.209 ± 2.508	66.018 ± 2.876	7.309 ± 0.912
Tratamiento 1 DM-Tb	4	0.5127 ± 0.0071	203.273 ± 2.766	9.0582 ± 1.7857	56.682 ± 13.871	396.000 ± 15.658	710.091 ± 62.570	12.527 ± 5.016	30.164 ± 2.508	66.900 ± 2.876	2.936 ± 0.912
Tratamiento 1 DM-Tb	5	0.5189 ± 0.0079	204.444 ± 3.058 b	9.1433 ± 1.9742	115.022 ± 15.334	393.222 ± 17.310	730.889 ± 69.174	13.800 ± 5.545	29.733 ± 2.773	65.833 ± 3.180	4.433 ± 1.008
Tratamiento 1 DM-Tb	6	0.5025 ± 0.0084	198.375 ± 3.243	8.7500 ± 2.0939	57.500 ± 16.265	394.000 ± 18.360	781.375 ± 73.370	10.675 ± 5.882	31.450 ± 2.941	63.875 ± 3.372	4.675 ± 1.069
Tratamiento 2 Sanas-Tb	1	0.4320 ± 0.0106	177.400 ± 4.102	7.6400 ± 2.6486	58.200 ± 20.573	398.200 ± 23.224	1107.800 ± 92.806	14.700 ± 7.440	25.720 ± 3.721	71.080 ± 4.266	3.220 ± 1.353
Tratamiento 2 Sanas-Tb	2	0.4970 ± 0.0075	197.900 ± 2.901	8.8000 ± 1.8729	56.500 ± 14.548	397.900 ± 16.422	954.700 ± 65.624	15.740 ± 5.261	25.03 ± 2.631 a	71.01 ± 3.016 a	3.960 ± 0.956
Tratamiento 2 Sanas-Tb	3	0.4856 ± 0.0079	190.556 ± 3.058	8.7556 ± 1.9742	55.589 ± 15.334	391.778 ± 17.310	1001.667 ± 69.174	14.744 ± 5.545	27.633 ± 2.773	67.889 ± 3.180	4.478 ± 1.008
Tratamiento 2 Sanas-Tb	4	0.4900 ± 0.0079	193.889 ± 3.058	8.7567 ± 1.9742	55.911 ± 15.334	396.222 ± 17.310	957.778 ± 69.174	14.644 ± 5.545	24.622 ± 2.773	69.589 ± 3.180	5.789 ± 1.008
Tratamiento 2 Sanas-Tb	5	0.4811 ± 0.0079	180 ± 3.058 a	8.6244 ± 1.9742	90.811 ± 15.334	444.000 ± 17.310	906.567 ± 69.174	13.633 ± 5.545	32.422 ± 2.773	59.467 ± 3.180	6.444 ± 1.008
Tratamiento 2 Sanas-Tb	6	0.4828 ± 0.0079	185.611 ± 3.058	8.7094 ± 1.9742	73.133 ± 15.334	417.833 ± 17.310	945.228 ± 69.174	14.344 ± 5.545	29.428 ± 2.773	63.544 ± 3.180	6.200 ± 1.008

70

Tabla 4. Comparación de medias de los resultados de hemograma por tratamiento. Los valores que muestran significancia se encuentran señalados mediante las literales a, b y c.

DIFERENCIA ENTRE TRATAMIENTOS EN HEMOGRAMA										
TRT	Hematocrito %	Hemoglobina g/L	Eritrocitos x10 ¹² /L	VGM fL	CGMH g/L	Plaquetas x10 ⁹ /L	Leucocitos x10 ⁹ /L	Neutrofilos %	Linfocitos %	Eosinófilos %
Valor de ref.	0.39-0.53	137-176 g/L	7.27-9.65	48.9-57.9	329-375 g/L	638-1177	1.96-8.25	6.2-26.7	66.6-90.3	0.2-3.5
Control negativo	0.502 ± 0.0028 b	195.393 ± 1.097 b	10.130 ± 0.708	55.815 ± 5.502	388.145 ± 6.211	920.079 ± 24.820 b	16.8422 ± 1.990	27.645 ± 0.995	67.773 ± 1.141	4.583 ± 0.362
Tratamiento 1	0.506 ± 0.0030 b	199.732 ± 1.169 b	8.860 ± 0.755	66.651 ± 5.862	396.166 ± 6.6176	828.453 ± 26.445 a	14.581 ± 2.120	30.654 ± 1.060	64.889 ± 1.216	4.880 ± 0.385
Tratamiento 2	0.478 ± 0.0034 a	187.560 ± 1.319 a	8.548 ± 0.852	65.024 ± 6.615	407.656 ± 7.468	978.956 ± 29.842 b	14.6344 ± 2.392	27.476 ± 1.196	67.096 ± 1.372	5.015 ± 0.435

Tabla 5. Valores de Bioquímica sanguínea por período por grupo

BIOQUÍMICA SANGUÍNEA															
TRT	PERIODO	Glucosa mmol/L	Urea mmol/L	Creatinina umol/L	Colesterol mmol/L	Triglicéridos mmol/L	ALT U/L	AST U/L	FA U/L	PT g/L	Albumina g/L	Globulina g/dL	RelacionAG	BUN mmol/L	Bilirrubina total umol/L
Valores de referencia		5.7- 8.4	14-22	37-53	1.20-2.38	0.23- 1.3	17-50	39-93	62-255 U/L	63-86	33-49	24-39	1.58-2.67	11.42- 19.28	0.85-2.56
Control Negativo	1	7.93 ± 1.1899	6.700 ± 0.651	42.077 ± 1.596	1.991 ± 0.118	1.032 ± 0.492	83.385 ± 47.253	110.077 ± 47.019	342.000 ± 113.871	73.769 ± 0.981	32.692 ± 0.565	41.077 ± 0.924	0.8031 ± 0.025	14.308 ± 1.467	1.654 ± 0.598
Control Negativo	2	26.044± 1.43 c	8.7 a ± 0.783	53.889 ± 1.919	2.573 ± 0.142	3.203 ± 0.591	213.667 ± 56.792	207.000 ± 56.510	1028.556 ± 136.856 b	70.778± 1.179 b	30.778 ± 0.680 b	40.000 ± 1.111	0.7778 ± 0.030	18.667± 1.763 a	3.044± 0.718 b
Control Negativo	3	25.3 ± 1.5168 b	8.538 ± 0.830	53.750 ± 2.035	2.663 ± 0.151	3.330 ± 0.627	275.375 ± 60.236	284.625 ± 59.938	1199.375± 145.158 b	74.875 ± 1.250	32.000 ± 0.721	42.875 ± 1.178	0.7500 ± 0.032	18.250 ± 1.870	3.675 ± 0.762
Control Negativo	4	26.7875±1.5168 a	8.200 ± 0.830	49.875 ± 2.035	2.819 ± 0.151	3.166 ± 0.627	267.250 ± 60.236	275.500 ± 59.938	1222.875± 145.158 b	72.375 ± 1.250	31.125 ± 0.721	41.250 ± 1.178	0.7613 ± 0.032	17.625 ± 1.870	3.275 ± 0.762
Control Negativo	5	24.55± 1.516 b	11.25 ± 0.830 b	59.5± 2.035 b	2.604 ± 0.151	2.533 ± 0.627	483.625± 60.236 b	384.000 ± 59.938	983.875± 145.158 b	73.125 ± 1.250	31± 0.721 b	42.125 ± 1.178	0.7450 ± 0.032	24.25± 1.870 b	4.413 ± 0.762
Control Negativo	6	29.667± 1.751 b	11.325± 0.959 b	47.750 ± 2.350	2.593 ± 0.174	2.650 ± 0.724	353.417 ± 69.555	420.583 ± 69.210	1115.25± 167.614 b	72.000 ± 1.443	31.083 ± 0.832	40.917 ± 1.361	0.7625 ± 0.037	24.167 ± 2.159	4.083 ± 0.880
Tratamiento 1 DM-Tb	1	7.333 ± 1.238	7.267 ± 0.678	38.000 ± 1.662	2.112 ± 0.123	1.243 ± 0.512	83.583 ± 49.183	111.167 ± 48.939	349.000 ± 118.521	74.417 ± 1.021	33.000 ± 0.589	41.417 ± 0.962	0.7983 ± 0.026	15.417 ± 1.527	1.992 ± 0.622
Tratamiento 1 DM-Tb	2	16.84± 1.516 c	16.823± 0.830 b	50.766 ± 2.035	2.530 ± 0.151	1.143 ± 0.627	139.328 ± 60.236	219.266 ± 59.938	730.438 ± 145.158	68.281± 1.250 b	30.110± 0.721 b	38.172 ± 1.178	0.7983 ± 0.032	37.281± 1.870 b	4.453 ± 0.762 c
Tratamiento 1 DM-Tb	3	18.683± 1.516 b	9.541 ± 0.830	48.656 ± 2.035	2.851 ± 0.151	3.629 ± 0.627	106.406 ± 60.236	118.078 ± 59.938	567.734 ± 145.158	71.906 ± 1.250	31.813 ± 0.721	40.094 ± 1.178	0.8014 ± 0.032	20.531 ± 1.870	3.153 ± 0.762
Tratamiento 1 DM-Tb	4	14.1671± 1.516 b	8.523 ± 0.830	50.484 ± 2.035	2.669 ± 0.151	2.674 ± 0.627	237.031 ± 60.236	315.359 ± 59.938	710.891 ± 145.158	73.125 ± 1.250	34.359 ± 0.721	38.766 ± 1.178	0.9030 ± 0.032	18.453 ± 1.870	3.006 ± 0.762
Tratamiento 1 DM-Tb	5	17.775± 1.516 b	7.481 ± 0.830 a	48.063± 2.035 a	2.409 ± 0.151	2.419 ± 0.627	150.313± 60.236 a	166.438 ± 59.938	958.688± 145.158 b	69.375± 1.250 b	31.125± 0.721 b	38.250 ± 1.178	0.8181 ± 0.032	15.938 ± 1.870	3.250 ± 0.762
Tratamiento 1 DM-Tb	6	20.6562± 1.516 c	7.713± 0.830 a	51.133 ± 2.035	3.330 ± 0.151 b	5.423 ± 0.627 b	260.984 ± 60.236	323.125 ± 59.938	963.406 ± 145.158	73.680 ± 1.250	32.156 ± 0.721	41.523 ± 1.178	0.7814 ± 0.032	16.664 ± 1.870	4.241 ± 0.762
Tratamiento 2 Sanas-Tb	1	7.72 ± 1.918	6.980 ± 1.050	40.600 ± 2.574	2.262 ± 0.191	1.124 ± 0.793	84.400 ± 76.194	104.000 ± 75.816	380.200 ± 183.612	69.200 ± 1.581	32.000 ± 0.912	37.200 ± 1.491	0.8700 ± 0.041	15.000 ± 2.365	2.140 ± 0.964
Tratamiento 2 Sanas-Tb	2	5.76 ± 1.356 a	7.62 ± 0.742 a	48.400 ± 1.820	2.334 ± 0.135	1.439 ± 0.561	89.000 ± 53.877	132.300 ± 53.610	287.8± 129.833 a	77.4 ± 1.118 a	35.2± 0.645 a	42.200 ± 1.054	0.8440 ± 0.029	16.2± 1.672 a	7.08± 0.682 a
Tratamiento 2 Sanas-Tb	3	6.222± 1.43 a	7.056 ± 0.783	47.222 ± 1.919	2.524 ± 0.142	1.340 ± 0.591	86.333 ± 56.792	122.111 ± 56.510	259.333± 136.856 a	76.889 ± 1.179	33.778 ± 0.680	43.111 ± 1.111	0.7867 ± 0.030	15.111 ± 1.763	2.556 ± 0.718
Tratamiento 2 Sanas-Tb	4	6.755 ± 1.43 a	7.022 ± 0.783	48.667 ± 1.919	2.664 ± 0.142	1.167 ± 0.591	80.111 ± 56.792	123.111 ± 56.510	233.556± 136.856 a	76.778 ± 1.179	34.000 ± 0.680	42.778 ± 1.111	0.8011 ± 0.030	14.889 ± 1.763	2.478 ± 0.718
Tratamiento 2 Sanas-Tb	5	5.922 ± 1.43 a	6.533± 0.783 a	48.111± 1.919 a	2.593 ± 0.142	1.147 ± 0.591	79.333± 56.792 a	113.000 ± 56.510	234± 136.856 a	77.666± 1.179 a	34.667± 0.680 a	43.000 ± 1.111	0.8111 ± 0.030	14.111± 1.763 a	2.800 ± 0.718
Tratamiento 2 Sanas-Tb	6	6.3055± 1.43 a	6.706± 0.783 a	47.722 ± 1.919	2.440 ± 0.142 a	1.198± 0.591 a	85.111 ± 56.792	112.111 ± 56.510	298.333± 136.856 a	78.167 ± 1.179	34.389 ± 0.680	43.778 ± 1.111	0.7917 ± 0.030	14.389 ± 1.763	2.628 ± 0.718

Tabla 6. Comparación de medias de los resultados de bioquímica sanguínea por tratamientos. Los valores que muestran significancia se encuentran señalados mediante las literales a. b v c.

DIFERENCIA ENTRE TRATAMIENTOS EN BIOQUÍMICA SANGUÍNEA														
TRT	Glucosa mmol/L	Urea mmol/L	Creatinina μmol/L	Colesterol mmol/L	Triglicéridos mmol/L	ALT U/L	AST U/L	FA U/L	PT g/L	Albumina g/L	Globulina g/dL	RelacionAG	BUN mmol/L	Bilirrubina total umol/L
Valor de ref.	5.7- 8.4	14-22	37-53	1.20-2.38	0.23- 1.3	17-50	39-93	62-255 U/L	63-86	33-49	24-39	1.58-2.67	11.42- 19.28	0.85-2.56
Control negativo	23.380± 0.61 b	9.129± 0.334 b	51.140± 0.819 b	2.540 ± 0.061	2.652± 0.252 b	279.452± 24.256 b	280.298± 24.136 b	981.989± 58.453 c	72.820± 0.503 b	31.446 ± 0.290 b	41.374± 0.475 b	0.767± 0.013 b	19.544± 0.753 b	3.357 ± 0.307
Tratamiento 1	15.910± 0.60 a	9.558± 0.329 a	47.850± 0.807 a	2.650 ± 0.060	2.756± 0.249 b	162.940± 23.898 a	208.905± 23.780 b	713.359± 57.590 b	71.798± 0.496 b	32.093± 0.286 b	39.704± 0.468 a	0.817± 0.013 a	20.713± 0.742 b	3.349 ± 0.302
Tratamiento 2	6.448± 0.62 c	6.987± 0.338 c	46.788± 0.827 a	2.470 ± 0.061	1.236± 0.255 a	84.048± 24.500 a	117.772± 24.378 a	282.203± 59.040 a	76.017± 0.508 a	34.006± 0.293 a	42.011± 0.479 b	0.817 ± 0.013 a	14.95± 0.760 a	3.280 ± 0.310

Tabla 7. Valores de Urianálisis por período por grupo

URIANÁLISIS									
TRT	PERIODO	pH	PT g/L	Glucosa mmol/L	Cetonas mmol/L	Bilirrubina $\mu\text{mol/L}$	SangreHg erit/ μL	Densidad	Creatinina mg/dL
Valores de ref		7.3-8.5	0.019- 0.0278	0.11- 0.28				1.040-1.070	33.55- 39.75
Control Negativo	1	7.346 \pm 0.165	0.069 \pm 0.05	0 \pm 3.509	0.462 \pm 0.699	0	6.538 \pm 13.594	1.037 \pm 0.004	
Control Negativo	2	6.389 \pm 0.198b	0.2 \pm 0.2	56 \pm 4.217 b	0.167 \pm 0.841	0	7.222 \pm 16.338	1.047 \pm 0.004	19.689 \pm 5.255
Control Negativo	3	6.625 \pm 0.210 b	0.187 \pm 0.0719	56 \pm 4.473 b	0.0000 \pm 0.892	0	45.625 \pm 17.329	1.050 \pm 0.005	18.275 \pm 5.574
Control Negativo	4	6.8125 \pm 0.210 b	0.15 \pm 0.0719	46.25 \pm 4.473 b	0.6250 \pm 0.892	0	26.250 \pm 17.329	1.045 \pm 0.005	16.338 \pm 5.574 b
Control Negativo	5	6.188 \pm 0.210 b	0.212 \pm 0.0719	42.375 \pm 4.473 b	2.063 \pm 0.892	0	54.375 \pm 17.329	1.042 \pm 0.005	27.063 \pm 5.574
Control Negativo	6	6.583 \pm 0.242 b	0.216 \pm 0.083	56 \pm 5.165 c	0.625 \pm 1.029	0	120.417 \pm 20.010 b	1.056 \pm 0.005 b	31.675 \pm 6.436
Tratamiento 1 DM-Tb	1	7.750 \pm 0.171	0.125 \pm 0.58	0 \pm 3.652	0.375 \pm 0.728	0	7.083 \pm 14.149	1.037 \pm 0.004	
Tratamiento 1 DM-Tb	2	6.868 \pm 0.210 b	0.398 \pm 0.0719	38.5 \pm 4.473 b	0.0000 \pm 0.892	0	78.125 \pm 17.329	1.040 \pm 0.005	22.752 \pm 5.574
Tratamiento 1 DM-Tb	3	7.078 \pm 0.210	0.136 \pm 0.0719	38.5 \pm 4.473 b	3.5156 \pm 0.892	0	11.172 \pm 17.329	1.045 \pm 0.005	21.633 \pm 5.574
Tratamiento 1 DM-Tb	4	7.602 \pm 0.210	0.503 \pm 0.0719	21.625 \pm 4.473 a	0.0000 \pm 0.892	0	19.141 \pm 17.329	1.040 \pm 0.005	25.313 \pm 5.574
Tratamiento 1 DM-Tb	5	7.063 \pm 0.210	0.056 \pm 0.0719	38.5 \pm 4.473 b	0.0000 \pm 0.892	0	6.875 \pm 17.329	1.031 \pm 0.005	16.219 \pm 5.574 b
Tratamiento 1 DM-Tb	6	6.632 \pm 0.210 b	0.082 \pm 0.0719	26.1875 \pm 4.473 b	4.570 \pm 0.892	0	10.703 \pm 17.329 a	1.030 \pm 0.005 a	14.791 \pm 5.574 b
Tratamiento 2 Sanas-Tb	1	7.900 \pm 0.266	0.2 \pm 0.091	0 \pm 5.658	0.300 \pm 1.128	0	2.000 \pm 21.919	1.045 \pm 0.006	
Tratamiento 2 Sanas-Tb	2	8.1 \pm 0.188 a	0.25 \pm 0.064	0.15 \pm 4.001 a	0.300 \pm 0.797	0	14.500 \pm 15.499	1.037 \pm 0.004	29.710 \pm 4.985
Tratamiento 2 Sanas-Tb	3	8.0 \pm 0.198 a	0.144 \pm 0.067	0.333 \pm 4.217 a	0.333 \pm 0.841	0	45.000 \pm 16.338	1.030 \pm 0.004	37.378 \pm 5.255
Tratamiento 2 Sanas-Tb	4	7.778 \pm 0.198 a	0.122 \pm 0.067	0 \pm 4.217 a	0.000 \pm 0.841	0	17.778 \pm 16.338	1.033 \pm 0.004	48.078 \pm 5.255 a
Tratamiento 2 Sanas-Tb	5	7.778 \pm 0.198 a	0.066 \pm 0.0678	0 \pm 4.217 a	1.667 \pm 0.841	0	38.333 \pm 16.338	1.033 \pm 0.004	47.578 \pm 5.255 a
Tratamiento 2 Sanas-Tb	6	8.0 \pm 0.198 a	0.066 \pm 0.0678	0 \pm 4.217 a	0.917 \pm 0.841	0	29.167 \pm 16.338	1.033 \pm 0.004	44.819 \pm 5.574 a

72

Tabla 8. Comparación de medias de los resultados de urianálisis por tratamientos. Los valores que muestran significancia se encuentran señalados mediante las literales a, b y c.

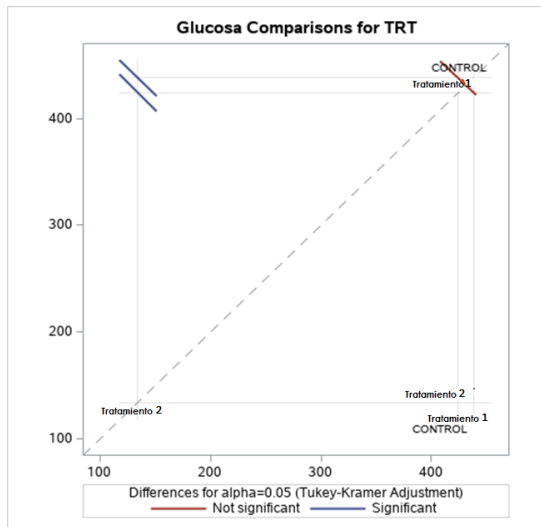
DIFERENCIA ENTRE TRATAMIENTOS EN URIANÁLISIS								
TRT	pH	PT g/L	Glucosa mmol/L	Cetonas mmol/L	Bilirrubina $\mu\text{mol/L}$	SangreHg erit/ μL	Densidad	Creatinina mg/dL
Valores de ref	7.3-8.5	0.019- 0.0278	0.11- 0.28				1.040-1.070	33.55- 39.75
Control negativo	6.657 \pm 0.085 b	0.1726 \pm 0.0289	42.770 \pm 1.801 b	0.657 \pm 0.359	0	43.405 \pm 6.978	1.047 \pm 0.002 b	22.607 \pm 2.547 b
Tratamiento 1	7.165 \pm 0.083 c	0.2167 \pm 0.0285	27.219 \pm 1.775 c	1.410 \pm 0.354	0	22.183 \pm 6.875	1.037 \pm 0.002 a	20.141 \pm 2.493 b
Tratamiento 2	7.926 \pm 0.085 a	0.1416 \pm 0.0292	0.081 \pm 1.819 a	0.586 \pm 0.362	0	24.463 \pm 7.048	1.035 \pm 0.002 a	41.512 \pm 2.356 a

16.4 Curvas de glucosa

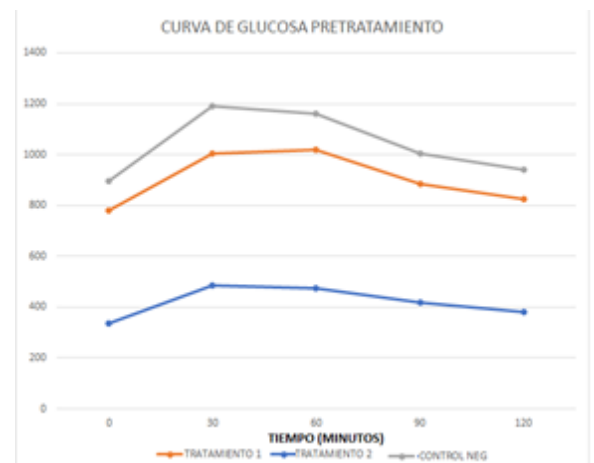
Se realizaron dos curvas de glucosa a los grupos del estudio, la primera previa al comienzo de la suplementación, la segunda una vez terminado el periodo de suplementación.

Durante la primera curva se observó que los valores de glucemia del Grupo Control Negativo y del grupo Tratamiento 1 se comportaron de manera similar, no presentaron significancia estadística, a diferencia del grupo Tratamiento 2 que mostró valores estadísticamente más bajos que los grupos Grupo Control Negativo y Tratamiento 1. La significancia y el comportamiento de los valores se presentan en las siguientes. **Gráfica 2 y 3.**

Gráfica 2. Gráfica de mínimos cuadrados para la curva de glucosa pretratamiento. Evidencia la significancia de los valores de glucosa en los grupos donde el Grupo Control Negativo y el grupo de diabetes no presentan valor estadísticamente significativo, sin embargo si presentan significancia con respecto al grupo tratamiento 2. Tx: Tratamiento



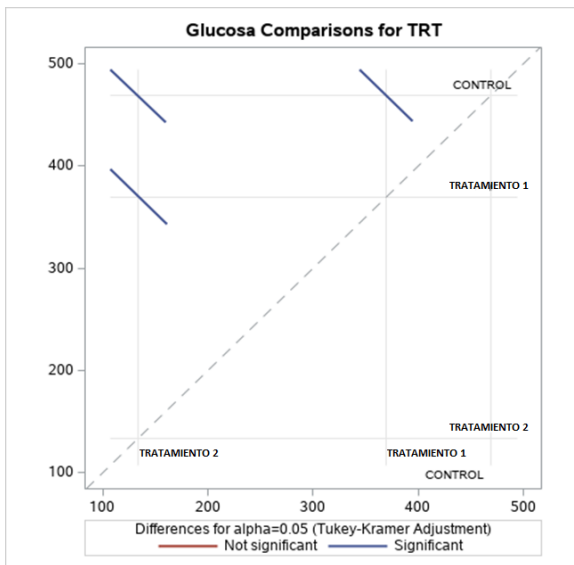
Gráfica 3. Curva de glucosa pretratamiento. Distribución de los valores de glucosa pretratamiento por grupo. Se observó significancia para los valores del grupo Tratamiento 2 con respecto a los valores del grupo tratamiento 1 y control, no así entre los mismos.



La segunda curva de glucosa se realizó bajo las mismas condiciones de la primera, pero esta se realizó al finalizar el experimento.

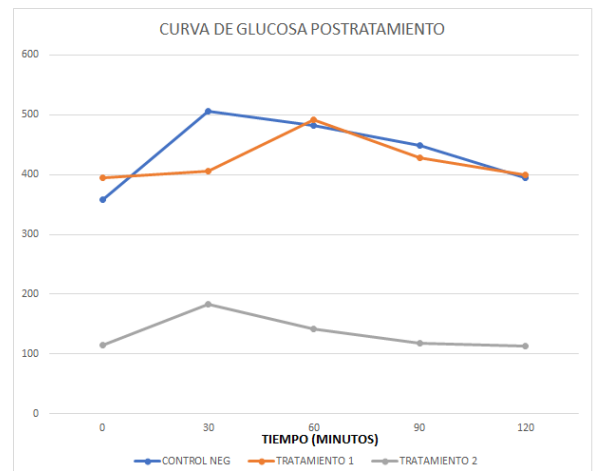
Los valores que se observaron reflejan significancia entre la media de cada grupo, los valores de glucosa más altos los presentó el Grupo Control Negativo, seguido por el grupo Tratamiento 1 y el grupo Tratamiento 2 mantuvo niveles dentro de rangos. En las siguientes gráficas podemos observar la significancia por grupo y el comportamiento de los valores durante la curva, además se puede observar que el grupo Tratamiento 1 presenta el pico más alto de glucosa desfasado con respecto al Grupo Control Negativo y del grupo Tratamiento 2. **Gráfica 4 y 5.**

Gráfica 4. Gráfica de mínimos cuadrados para la curva de glucosa postratamiento. Muestra la significancia de los valores de glucosa obtenidos, se puede observar estadística significativa para los valores de cada grupo.



Grafica 5. Curva de glucosa postratamiento.

Los resultados mostraron una prolongación del tiempo en la presentación del pico de glucosa, además de niveles de glucosa más bajos en comparación con los niveles mostrados por el grupo control. También permite observar el comportamiento de los niveles de glucosa del grupo Tratamiento 2/Tb, significativamente más bajos.



17. DISCUSIÓN

17.1 Caracterización del modelo de estudio

A partir de la observación y análisis de los resultados obtenidos en los estudios sanguíneos y urinarios se puede concluir que se logró el objetivo de caracterizar un modelo útil para esta investigación, ya que replicó los cambios provocados en individuos con diabetes: hiperglucemia, alteración de analitos hepáticos, glucosuria, signos clínicos como poliuria/polidipsia, polifagia, pérdida de peso; además de mostrar algunos signos de función renal alterada como aumento de los compuestos nitrogenados de eliminación renal, alteración de los niveles de albumina sérica, y alteraciones en urianálisis como presencia de glucosa en los grupos diabéticos, disminución de los valores de creatinina, lo que puede indicar una disfunción en la concentración de este analito por parte del riñón, además se observó que el Grupo Control Negativo presento una orina más ácida en comparación con los grupos Tratamiento 1 y grupo Tratamiento 2, en cuanto a proteína no pudo ser corroborada al urianálisis, ya que la medición de este analito se realizó por tira reactiva que detecta g/dL. Estos cambios coinciden con los observados en la patología de DM.

En cuanto a la función renal se mantuvo constante, sin embargo, los cambios observados en parámetros séricos y urinarios reflejan insuficiencia renal incipiente. Estos resultados coinciden con los reportados por Montano A A. y col., 2017; Nogueira y col. 2017 quienes buscaron establecer un modelo animal apropiado para investigar sobre la patogénesis y el desarrollo de la nefropatía diabética que permitiera el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

El análisis estadístico permitió establecer diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio. Con la ayuda del análisis del modelo ajustado por medias mínimo cuadrática se pudo determinar qué analitos presentaron diferencias estadísticas entre grupos.

17.2 Hematocrito

Los resultados del análisis por tratamiento por grupo permitieron observar que los valores de eritrocitos, VGM, CGMH, leucocitos, neutrófilos, linfocitos y eosinófilos no presentaron significancia estadística por tratamiento. El análisis mostró los resultados más relevantes en

los valores de hematocrito y hemoglobina que fueron significativamente más bajos en el grupo Tratamiento 2 en comparación con el grupo Tratamiento 1 y Grupo Control Negativo, esto podría atribuirse a deshidratación por poliuria que es un signo clásico de diabetes y enfermedad renal, además se observó que las plaquetas son significativamente más bajas en el grupo Tratamiento 1 en comparación con los grupos Control Negativo y Tratamiento 2.

17.3 Bioquímica sanguínea

La glucosa es el primer analito a observar para la corroborar la presencia de diabetes en las ratas, con ello se confirma la presencia de diabetes, además de que la diferencia estadística es significativa entre los grupos diabéticos con respecto al grupo Tratamiento 2, se pudieron observar diferencias estadísticamente significativas por periodo entre los grupos del estudio a partir del segundo muestreo, correspondiente al inicio de la suplementación, esto nos lleva a deducir que la suplementación con tributirina tuvo un efecto positivo en el metabolismo de la glucosa en las ratas que recibieron la suplementación con tributirina. Este resultado coincide con estudios previos que reportan una mejora en los niveles glucémicos de ratas Wistar diabéticas tratadas con butirato de sodio (NaB) administrado por vía intraperitoneal, e inclusive por vía oral reportados previamente por González A. y col., 2018; Khan,S y col. 2014.

La urea se produce en hígado, y en condiciones de disbiosis se puede producir en intestino grueso por fermentación bacteriana y pasar a circulación sistémica por translocación, es eliminada por excreción renal. La concentración de compuestos nitrogenados permite analizar el estado fisiológico renal, además de estar relacionado con la salud intestinal, valores altos de este analito pueden reflejar un aumento en la síntesis y la translocación de lumen intestinal a circulación sistémica, así como una incapacidad del riñón para eliminarlos, para confirmar la insuficiencia renal incipiente es necesario observar otros analitos como creatinina, sin embargo, los valores estadísticos nos permiten inferir que la suplementación con tributirina no provee beneficios sobre los valores de urea en sangre. Mismo resultado para BUN.

Creatinina es un analito con relevancia para la determinación de la función renal, ya que es eliminada exclusivamente por excreción renal, la elevación por fuera de rangos de referencia de este analito es un indicativo de insuficiencia renal, deben correlacionarse estos valores con los niveles de urea. A pesar de que en este estudio el Grupo Control Negativo presenta valores de urea dentro de rangos pero en el límite más alto, los valores de creatinina se presentan por encima de los rangos, con esto se puede llegar a dos conclusiones, las ratas del Grupo Control Negativo presentaron insuficiencia renal, mientras que las ratas diabéticas valores de urea eran más altos que el Grupo Control Negativo, sin embargo, presentaron valores de creatinina dentro del rango con lo que se puede deducir que la suplementación por vía oral con tributirina retrasa la progresión de la enfermedad renal en ratas con diabetes.

Individuos con diabetes presentan alteración de analitos de función y estructura hepática, todo esto consecuencia de mecanismos de regulación de la glucemia, los valores de triglicéridos no mostraron efecto positivo o negativo en las ratas del grupo de Tratamiento 1 en comparación con el Grupo Control Negativo con la dosis y el tiempo de tratamiento utilizado, esto contrasta lo reportado por Miyoshi M. y col. 2011 que aseguran que niveles altos de butirato en lumen intestinal presentan efectos benéficos en el control de lípidos, sin embargo ALT mantuvo valores significativamente menores en comparación con el Grupo Control Negativo. FA es una proteína de la cual el aumento en los valores puede indicar colestasis, para aseverar la causa de dicho aumento tendría que analizarse en conjunto con otras enzimas hepáticas como ALT, AST y bilirrubina, no obstante correlacionando sus valores podemos relacionar su aumento a una disfunción hepática, que se presenta más severa en el Grupo Control Negativo en comparación con el grupo Tratamiento 1. Esto nos permite inducir que la suplementación con tributirina ayuda a proteger la integridad hepática, y muestra un efecto benéfico sobre la función de los hepatocitos. Este resultado coincide con lo reportado por Miyoshi M y col, acerca de los efectos hepatoprotectores de la suplementación con derivados del butirato.

La disminución en los valores de PT puede reflejar deficiencia en su síntesis por desnutrición, secuestro por inflamación o pérdida por filtración capilar, esto se confirmaría analizando el comportamiento de albúmina y globulina. Albumina presentó un comportamiento similar a

PT, lo cual indica que fue la causa de la diferencia en este analito, la albumina es una proteína muy pequeña que puede sufrir pérdidas por capilaridad a causa de inflamación o pérdida a nivel de filtración renal, esto exclusivamente cuando hay algún grado de lesión renal. No se observaron efectos benéficos con respecto a estos analitos en las ratas suplementadas con tributirina en la dosis y el tiempo de estudiados para este tratamiento. (Núñez O L y col. 2007).

17.4 Urianálisis

Los resultados de pH permitieron corroborar lo ya citado por Montano, A.Á y col. 2017, un pH más ácido refleja en descontrol metabólico de individuos diabéticos, el Grupo Control Negativo presentó una orina más alcalina con respecto a los grupos Tratamiento 1 y Tratamiento 2, sin embargo, el grupo Tratamiento 2 presentó la orina más básica, con esto se puede concluir que la suplementación ayudo a mejorar el control metabólico del grupo Tratamiento 1.

PT en orina no fue detectada ya que la detección se realizó por tira reactiva, y los valores de proteína al inicio de la enfermedad renal suelen ser imperceptibles por este método.

Los valores de glucosa en orina reiteran el éxito en la caracterización en el modelo para este estudio, este analito muestra significancia para los tres grupos, se observan los niveles más bajos de glucosa en el grupo Tratamiento 2, y el grupo Tratamiento 1 presenta niveles estadísticamente más bajos que el Grupo Control Negativo, estos resultados muestran que la suplementación con tributirina ayuda a disminuir los niveles de glucosa en orina con lo que se deduce que esta suplementación ayuda a mantener la función renal y el metabolismo de la glucosa.

La suplementación con tributirina ayuda a mantener la densidad urinaria, en individuos con hiperglucemia crónica se puede observar un aumento de la DU causado por las altas concentraciones de glucosa en la orina, el Grupo Control Negativo presentó valores más altos de densidad por este motivo, y el grupo Tratamiento 1 mantuvo una densidad urinaria dentro de rangos, se puede inferir que la suplementación con tributirina ayuda a mantener la densidad urinaria en ratas con diabetes y enfermedad renal.

Los valores de creatinina observados en los grupos Grupo Control Negativo y Tratamiento 1 se puede relacionar a la incapacidad del riñón por filtrar este producto de excreción. Este resultado sugiere que la suplementación con tributirina no mejora los niveles de creatinina en orina con la dosis y el tiempo de tratamiento utilizados en los grupos experimentales.

17.5 Curvas de glucosa

Los resultados de las curvas de glucosa permiten observar que la suplementación con tributirina ayuda a mejorar los niveles de glucemia en ratas diabéticas suplementadas con tributirina por vía oral, lo que se puede observar en las curvas de glucosa en los primeros 30 minutos, este resultado coincidió con los hallazgos reportados en la suplementación con NaB a ratas, realizados por Montano AA y col, 2018 y González y col., 2018.

18. CONCLUSIONES

El protocolo utilizado en este estudio permitió determinar que el método de diabetización mediante la administración de STZ vía endovenosa permite replicar la nefropatía diabética, para realizar estudios que permitan nuevos abordajes terapéuticos.

La suplementación con tributirina por vía oral en ratas con nefropatía diabética ayuda a mejorar el metabolismo de la glucosa, además, ayuda a proteger la integridad y la función hepática. A nivel renal, esta suplementación mostró retrasar el daño renal permitiendo mantener mejores niveles de creatinina, ayudando a tener valores de pH urinario dentro de rangos y menor concentración de glucosa en orina, y por consiguiente una densidad urinaria adecuada. Sin embargo, no muestra efectos positivos con respecto al metabolismo de lípidos, ni en la concentración de urea y BUN en sangre, además los valores de proteína y albúmina, así como tampoco tuvo efecto positivo en los niveles de creatinina en orina. Por lo tanto, la suplementación con tributirina a ratas con diabetes y nefropatía diabética ayuda al control metabólico de la enfermedad retrasando su progresión y consecuentemente sus complicaciones. Además, se debe considerar que la tributirina es un suplemento alimenticio

que, junto con un correcto control de dieta y un esquema paliativo como lo es la administración de insulina, puede lograr un mejor efecto.

19. PERSPECTIVAS

Se requiere más estudios que ayuden a enriquecer los resultados: aumentar la n en el estudio y el tiempo de suplementación con tributirina.

Para corroborar cambios a nivel de tejidos sería ideal el análisis histopatológico de los tejidos de las ratas del estudio. Esto permitiría correlacionar los resultados sanguíneos con las observaciones a nivel celular.

Otra opción al análisis de glucosa podría ser la medición de hemoglobina glucosilada en las ratas, lo que permite observar la dinámica de las glucemias durante los tres últimos meses. Además, se sugiere complementar el estudio, para estadificar el grado de lesión renal serían necesarios estudios complementarios, como el índice de filtración glomerular. Otra sugerencia incluye el abordaje molecular, mediante la observación de citocinas proinflamatorias como $TNF\alpha$ y $NF-\kappa B$.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar EC, Leonel AJ, Teixeira LG, Silva AR, Silva JF, Pelaez JM, Capettini LS, Lemos VS, Santos RA, Alvarez-Leite JI. "Butyrate impairs atherogenesis by reducing plaque inflammation and vulnerability and decreasing NFκB activation". *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2014; 01.
2. Aguilar, E S, Pelaez J, Leonel JJ, Alda, Gonçalves L, Menezes G L, Zelia, Matos F, Capettini, L, Teixeira G, Soares L L, Alvarez-Leite J, "Sodium butyrate modulates adipocyte expansion, adipogenesis, and insulin receptor signaling by upregulation of PPAR-γ in obese Apo E knockout mice", *Nutrition* 2017, 10.1016/j.nut.2017.10.007.
3. Alvarez L J I, Caetano F A M, Efeitos e mecanismos de ação da Tributirina na proteção da colite ulcerativa induzida por sulfato de sódio Dextrano, Teses de doutorado, UFMG, 2012. <http://hdl.handle.net/1843/BUOS-8UKLF2>
4. Álvarez MA, Béquer ML, Gómez HT, Molina MJL, Lavastida PM, Clapés HS. "Kidney damage associated to mild hyperglycemia in an animal model of diabetes." *Medicentro* 21.1 (2017): 46-56.
5. Boehm, O., Zur, B., Koch, A., Tran, N., Freyenhagen, R., Hartmann, M., & Zacharowski, K. pathological chemistry reference database for Wistar rats and C57/BL6 mice. *Biological chemistry*, 388(5), 2007. 547–554. <https://doi.org/10.1515/BC.2007.061>
6. Bugaut M. Occurrence, absorption and metabolism of short chain fatty acids in the digestive tract of mammals. *Comp Biochem Physiol* 1987, 86B:439–472.
7. Calvo-Vázquez I, Sánchez-Luna O, Yáñez-Sosa AL. Prevalencia de enfermedad renal crónica no diagnosticada en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 en atención primaria a la salud. *Med Int Méx* 2015; 31: 41-49
8. Cigarran G S, González P E y Cases A A. "Microbiota intestinal en la enfermedad renal crónica". *Nefrologia* 2017;37(1):9-19.
9. Donohoe, D. R., Collins, L. B., Wali, A., Bigler, R., Sun, W., & Bultman, S. J. The Warburg effect dictates the mechanism of butyrate-mediated histone acetylation and cell proliferation. *Molecular cell*, 2012, 48(4), 612–626. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.08.033>

10. Donohoe, D. R., Garge, N., Zhang, X., Sun, W., O'Connell, T. M., Bunger, M. K., & Bultman, S. J. The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell metabolism* (2011)., 13(5), 517–526. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.02.018>
11. Le Poul, E., Loison, C., Struyf, S., Springael, J. Y., Lannoy, V., Decobecq, M. E., Brezillon, S., Dupriez, V., Vassart, G., Van Damme, J., Parmentier, M., & Detheux, M. “Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation”. *The Journal of biological chemistry*, 2003. 278(28), 25481–25489. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301403200>
12. Figueroa M C, Perez HI, Mejia R. “Caracterización de un modelo de diabetes tipo 2 en ratas Wistar hembra”, *Rev.MVZ Córdoba* 18(Supl):3699-3707, 2013.
13. Figueroa-García MC, Rivera-Valencia M, Sosa-Durán EE, Saavedra-Molina FA, Mejía-Zepeda R “Perfil glicémico durante el ayuno en ratas macho-Wistar con diabetes tipo 2”. *Rev Hosp Jua Mex* 2016; 8.
14. Gonzalez, A. Krieg, R. Massey, H. Sodium butyrate ameliorates insulin resistance and renal failure in CKD rats by modulating intestinal permeability and mucin expression. *NephrolDial Transplant*, 2018. 1-12.
15. Hernández-Ávila M, Gutiérrez J P, Reynoso-Noverón N. Diabetes mellitus en México: El estado de la epidemia. *Salud pública Méx* [revista en la Internet]. 2013; 55 (Suppl 2): s129-s136.
16. Huang, W; Zhou, L; Guo, H; Xu, Y; Xu, Y. The role of short-chain fatty acids in kidney injury induced by gut-derived inflammatory response. 2017. *Metabolism: clinical and experimental*, ISSN: 1532-8600. Vol: 68, Page: 20-30. PUBMED-NCBI. ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28183450
17. Ichimura, A., Hasegawa, S., Kasubuchi, M., & Kimura, I. (2014). Free fatty acid receptors as therapeutic targets for the treatment of diabetes. *Frontiers in pharmacology*, 5, 236. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00236>
18. Jia L, Li D, Feng N, Shamoon M, Sun Z, Ding L. Zhang H, Chen W, Sun J, Chen YQ. “Antidiabetic effects of *Clostridium butyricum* CGMCC03131 through

promoting the growth of gut butyrate producing bacteria in type 2 Diabetic mice”.
Sci Rep, 2017:08.

19. Johnson, A. R., Milner, J. J., & Makowski, L., “The inflammation highway: metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity”. *Immunological reviews*, 249(1), 218–238. 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01151.x>
20. Kanika, G., Khan, S., & Jena, G. Sodium Butyrate Ameliorates L-Arginine-Induced Pancreatitis and Associated Fibrosis in Wistar Rat: Role of Inflammation and Nitrosative Stress. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 2015, 29(8), 349–359. <https://doi.org/10.1002/jbt.21698>
21. Khan, S., & Jena, G. B. Protective role of sodium butyrate, a HDAC inhibitor on beta-cell proliferation, function and glucose homeostasis through modulation of p38/ERK MAPK and apoptotic pathways: study in juvenile diabetic rat. *Chemico-biological interactions*, 2014. 213, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.02.001>
22. Khan, S., & Jena, G. Sodium butyrate, a HDAC inhibitor ameliorates eNOS, iNOS and TGF- β 1-induced fibrogenesis, apoptosis and DNA damage in the kidney of juvenile diabetic rats. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, (2014). 73, 127–139. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.08.010>
23. Khan, S., & Jena, G. B. Protective role of sodium butyrate, a HDAC inhibitor on beta-cell proliferation, function and glucose homeostasis through modulation of p38/ERK MAPK and apoptotic pathways: study in juvenile diabetic rat. *Chemico-biological interactions*, (2014). 213, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.02.001>
24. Khan, S., & Jena, G. Sodium butyrate, a HDAC inhibitor ameliorates eNOS, iNOS and TGF- β 1-induced fibrogenesis, apoptosis and DNA damage in the kidney of juvenile diabetic rats. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 73, 127–139. (2014). <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.08.010>
25. Kelly, C. J., Zheng, L., Campbell, E. L., Saedi, B., Scholz, C. C., Bayless, A. J., Wilson, K. E., Glover, L. E., Kominsky, D. J., Magnuson, A., Weir, T. L., Ehrentraut, S. F., Pickel, C., Kuhn, K. A., Lanis, J. M., Nguyen, V., Taylor, C. T., & Colgan, S.

- P. Crosstalk between Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids and Intestinal Epithelial HIF Augments Tissue Barrier Function. *Cell host & microbe*, 17(5), 2015, 662–671. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.03.005>
26. Kim, S., Hooker, J., Otto, N., Win, K., Muench, L., Shea, C., Carter, P., King, P., Reid, A., Volkow, N., & Fowler, J. Whole-body pharmacokinetics of HDAC inhibitor drugs, butyric acid, valproic acid and 4-phenylbutyric acid measured with carbon-11 labeled analogs by PET. *Nuclear medicine and biology*, 40(7), 912–918. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2013.06.007>
27. Koh A., De Vadder F., Kovachteva-Datchary P., Backhed Ara Koh, Filipe De Vadder, Petia Kovatcheva-Datchary, Fredrik Bäckhed, “From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites”, *Cell*, Volume 165, Issue 6, 2016, Pages 1332-1345, ISSN 0092-8674, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.041>.
28. Kumar, C., Rachappaji, K., Nandini, C., Sambaiah, K., & Salimath, P. Modulatory effect of butyric acid-a product of dietary fiber fermentation in experimentally induced diabetic rats. *The Journal of nutritional biochemistry*, 13(9), 522. (2002). [https://doi.org/10.1016/s0955-2863\(02\)00180-8](https://doi.org/10.1016/s0955-2863(02)00180-8)
29. Lau, W. L., Kalantar-Zadeh, K., & Vaziri, N. D. The Gut as a Source of Inflammation in Chronic Kidney Disease. *Nephron*, 130(2), 92–98. 2015. <https://doi.org/10.1159/000381990>
30. León-Regal M, González-Otero L, González-Otero Z, de-Armas-García J, Urquiza-Hurtado A, Rodríguez-Caña G. Etiopatogenia de la microangiopatía diabética. Consideraciones bioquímicas y moleculares. *Revista Finlay [revista en Internet]*. 2013 [citado 2020 Jul 6]; 3(4):[aprox. 13 p.]. Disponible en: <http://www.revfinlay.sld.cu/index.php/finlay/article/view/242>
31. Li M, van Esch BCAM, Wagenaar GTM, Garssen J, Folkerts G, Henricks PAJ. Pro- and anti-inflammatory effects of short chain fatty acids on immune and endothelial cells. *Eur J Pharmacol*. 2018 Jul 15;831:52-59. doi: 10.1016/j.ejphar.2018.05.003. Epub 2018 May 9. PMID: 29750914.

32. Machado, R. A., Constantino, L., Tomasi, C. D., Rojas, H. A., Vuolo, F. S., Vitto, M. F., Cesconetto, P. A., de Souza, C. T., Ritter, C., & Dal-Pizzol, F. Sodium butyrate decreases the activation of NF- κ B reducing inflammation and oxidative damage in the kidney of rats subjected to contrast-induced nephropathy. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 27(8), (2012). 3136–3140. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfr807>
33. Mayer-Davis, E.J.; Kahkoska, A.R.; Jefferies, C.; Dabelea, D.; Balde, N.; Gong, C.X.; Aschner, P.; Craig, M.E. *Pediatric Diabetes*, October 2018.
34. Mezzano A. S, Aros E. C, “Enfermedad renal crónica: clasificación, mecanismos de progresión y estrategias de renoprotección” *Rev. Med. Chile.*, Santiago, V.133 n.3 p 338’348, marzo 2005. <https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872005000300011>
35. Miyoshi M, Sakaki H, Usami M, Lizuka N, Shuno K, Ayama M, Usami Y. “Oral administration of tributyrin increases concentration of butyrate in the portal vein and prevent lipopolisacharide induced liver injury in rats”. *Clin Nutr*, 2011:04.
36. Montano, A.Á., Mendoza, L.B., Hernández, T.G., Martínez, J.L., Pérez, M.L., & Hernández, S.C. Daño renal por hiperglucemias moderadas en un modelo animal de diabetes.) (2017). Artículo cubano de nefropatía diabética.
37. Morales C, *Rat-Handling-and-Techniques*, UNC Chapel Hill, 2018
38. Nogueira A, Pires M J, Oliveira P A. “Pathophysiological Mechanisms of renal Fibrosis: A Review of Animal Models and Therapeutic Strategies”. 2017.
39. Noh, H., Oh, E. Y., Seo, J. Y., Yu, M. R., Kim, Y. O., Ha, H., & Lee, H. B. Histone deacetylase-2 is a key regulator of diabetes- and transforming growth factor-beta1-induced renal injury. *American journal of physiology. Renal physiology*, 2009. 297(3), F729–F739. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00086.2009>
40. Núñez OL, Bouda, J et al. *Patología Clínica Veterinaria*. 2007. Ciudad de México. FMVZ-UNAM.
41. Ocker M, Schneider-Stock, “Histone deacetylase inhibitors: signalling towards p21cip1/waf1”. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2007:08, Vol 39. Iss 7-8.

42. Pahl. V. “The chronic kidney disease- colon axis”. 2015.
43. Razola L P. “Impacto del microbioma intestinal humano en la diabetes”. Facultad de Farmacia. Universidad complutense. 2016:06.
44. Palop, O G; Caixàs, A, “Péptido YY: una nueva estrategia para el tratamiento de la obesidad” *Endocrinología y nutrición: organo de la Sociedad Espanola de Endocrinología y Nutricion*. 2009.
45. Pang M, Ma L, Liu N, Ponnusamy M, Zhao TC, Yan H, Zhuang S. “Histone deacetylase 1/2 mediates proliferation of renal interstitial fibroblasts and expression of cell cycle proteins” *J Cell Biochem*. 2011, 08. 112(8):2138-48.
46. Riser BL, Najmabadi F, Perbal B, Rambow JA, Riser ML, Sukowski E, Yeger H, Riser SC, Peterson DR. “CCN3/CCN2 regulation and the fibrosis of diabetic renal disease” *J Cell Commun Signal*, 2010:03.
47. Rossi M, Johnson D, Campbell K, The Kidney–Gut Axis: Implications for Nutrition Care, *Journal of Renal Nutrition*, Volume 25, Issue 5, 2015, Pages 399-403, ISSN 1051-2276, <https://doi.org/10.1053/j.jrn.2015.01.017>.
48. Rossi, C., Marzano, V., Consalvo, A. y otros. *Acta Diabetol*, 2018. 55: 121.
49. Sharma B. Singh N. “Attenuation of vascular dementia by sodium butyrate in streptozotocin diabetic rats” *Psychopharmacology (Berl)*, 2011, 06.
50. Sun Q, Jia Q, Song L, Duan L. “Alterations in fecal short-chain fatty acids in patients with irritable bowel syndrome: A systematic review and meta-analysis”, *Medicine (Baltimore)*, 2019: 02.
51. Gaschott, T., Steinhilber, D., Milovic, V., & Stein, J. Tributyrin, a stable and rapidly absorbed prodrug of butyric acid, enhances antiproliferative effects of dihydroxycholecalciferol in human colon cancer cells. *The Journal of nutrition*, 131(6), 1839–1843. 2011. <https://doi.org/10.1093/jn/131.6.1839>
52. Tazoe H, Otomo Y, Kaji I, Tanaka R, Karaki SI, Kuwahara A “Roles of short-chain fatty acids receptors, GPR41 and GPR43 on colonic functions”. *J Physiol Pharmacol*. 2008 Aug;59 Suppl 2:251-62.
53. Thorburn AN, Macia L, Mackay CR. “Diet, metabolites, and “western-lifestyle” inflammatory diseases”. *Immunity*, 2014 Jun 19; 40(6): 833-42.

54. Upadhyaya, S., & Banerjee, G. Type 2 diabetes and gut microbiome: at the intersection of known and unknown. *Gut microbes*, 6(2), 85–92, 2015. <https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1024918>
55. Urzúa G. Z. Efectos crónicos de la cafeína sobre el nivel de tolerancia a la glucosa en ratas sanas y con diabetes mellitus experimental. Tesis de Maestría, Col. Universidad de Colima, 2011.
56. Wolford, S. T., Schroer, R. A., Gohs, F. X., Gallo, P. P., Brodeck, M., Falk, H. B., & Ruhren, R. Reference range data base for serum chemistry and hematology values in laboratory animals. *Journal of toxicology and environmental health*, 18(2), 161–188. 1986. <https://doi.org/10.1080/15287398609530859>
57. Wang, X., Wei, X., Pang, Q., & Yi, F. Histone deacetylases and their inhibitors: molecular mechanisms and therapeutic implications in diabetes mellitus. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. vol.2. 2012:08. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2012.06.005>.
58. <http://web.jhu.edu/animalcare/procedures/rat.html>

ANEXOS



**Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias
de la Producción y de la Salud Animal**
*Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
Instituto de Investigaciones Biomédicas*

**SICUAE - SUBCOMITÉ INSTITUCIONAL PARA EL CUIDADO Y USO DE
ANIMALES EXPERIMENTALES**

Protocolo Número: MC-2018/2-1

**Título del Proyecto: "Efectos de la suplementación con tributirina en ratas con DMT1,
DMT2 y daño renal agudo. Estudio experimental."**

Investigador Responsable: DINORAH VARGAS ESTRADA

Tesista: SANDRA ALEYDA BARRIGA GUTIÉRREZ

Después de haber revisado el proyecto de investigación el día 5 de octubre del presente, el SICUAE consideró que reúne los requisitos que marcan las normas para el cuidado y uso de animales en experimentación, por lo cual, no tiene objeción en que se realicen los procedimientos planteados tal y como fueron descritos en el protocolo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria D.F. a 18 de febrero del 2019

EL COORDINADOR


DR. JOSÉ IVÁN SÁNCHEZ BETANCOURT

- Unidad de Posgrado, Edificio B, Primer Piso, B107. Circuito del Posgrado. Ciudad Universitaria, Def. Coyoacán, CDMX, C.P. 04510. Tels.: 01 (55) 5623-7005 y 01 (55) 5623-0222 ext.: #80023, #80005, #80024.
- Edificio 4 Posgrado, Planta alta, Fac. de Med Vet y Zoot. Circuito Escolar S/N, Ciudad Universitaria, Del Coyoacán, CDMX, C.P. 04510. Tels.: 01 (55) 5622-5854 al 57, Fax: 01 (55) 5616-7197 y 5616-2342.
- Secretaría Técnica de Producción y Salud Animal, FES-Cuautitlán: Unidad de Investigación Multidisciplinaria, Campo 4, Km. 2.5 Carretera Cuautitlán Teoyuacan, Col. San Sebastián Xhala, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, C.P. 54714, Tel.: 5623-1939 ext.: 39405.
- Edificio A, planta baja de la Secretaría de Enseñanza del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Nueva Sede, Circuito Maestro Mario de la Cueva (pasando el Jardín Botánico) Ciudad Universitaria, Def. Coyoacán, CDMX, C.P. 04510, Tel.: 01 (55) 5622-8908 ext.: 47985.

21.2 Análisis garantizado de la tributirina.

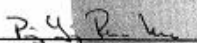


INFORME DE RESULTADOS

Fecha de recepción: 11-MAY-2017	Fecha de análisis: 15-MAY-2017	No.: 0906/17254/HPLC02	Pág. 1 de 1
Solicitado por: BIOQUIFA S. de R.L. de C.V.			
Producto a analizar: 3 Butirina		Fecha de Emisión del Informe de Resultados: 12-JUN-2017	
Lote No. 001/17			
Muestra 1 Bolsa con 250g aproximadamente de muestra			

Determinaciones	Resultados
Descripción	Granulado fino de color blanco con olor característico.
Identificación: Ácido Butírico	El cromatograma de la preparación de la muestra, obtenido en la valoración de Ácido Butírico exhibe el pico y el tiempo de retención correspondiente con el obtenido en la preparación de referencia.
Valoración: Ácido Butírico	58.5569%


Referencia: Técnica analítica del cliente/TA-236.V1 Técnica Analítica de Hendelc Analytical Services S. de R.L. de C.V.
Anexos: Cromatogramas y hojas de cálculo.


Q.F.B. Rosa Ma. Pérez G.
Jefe de Laboratorio

FPO-03/ACE-003.V3

Este certificado no deberá reproducirse excepto en su totalidad.
Los resultados se relacionan únicamente a los elementos ensayados.

H E N D E L C
ANALYTICAL SERVICES S. DE R.L. DE C.V.

PRUEBA:	VALORACION DE ÁCIDO BUTIRICO		PRODUCTO:	3 BUTIRINA
F. DE ANALISIS:	09-JUN-2017		LOTE:	001/17
ESPECIFICACIONES:	60 % min		RESULTADOS:	58.5569 %
ANALIZO:	A. Hernández	FIRMA: 	TECNICA:	HPLC

Estándar: Tributirina

Lote:	HDLSTD3/17
W STD :	601.1 mg
Conc Final:	1.3849 mg/mL
Pureza:	60.00 % Ácido Butírico
Humedad:	4.00 %

Muestra 1
W MTA : 601.3 mg

Muestra 2
W MTA : 601.3 mg

Estándar	AREA
1	4576.1
2	4588.1
3	4591.4

x =	4585.20
DESVEST =	8.052
C.V =	0.176

Fórmula :

$$\% \text{ Ácido Butírico} = \left(\frac{\text{AREA MTA}}{\text{AREA STD}} \right) \left(\frac{\text{CONC STD}}{\text{W MTA}} \right) \left(\text{F.D} \right) \left(100 \right)$$

Donde:

AREA MTA= Area de la muestra

AREA STD= Area promedio del estándar

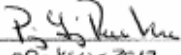
CONC STD= Concentración del estándar en mg/mL

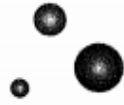
W MTA= Peso de la muestra en mg

F.D= Factor de dilución de la muestra= 250

Muestra	W Mta (mg)	AREA	% Ácido Butírico
1	601.3	4669.4	58.6376
2	601.3	4656.5	58.4762

x =	4662.9	58.5569
DESVEST =	9.086	0.1141
C.V =	0.195	0.1949

REVISO: 
FECHA: 09-JUN-2017



H E N D E L C

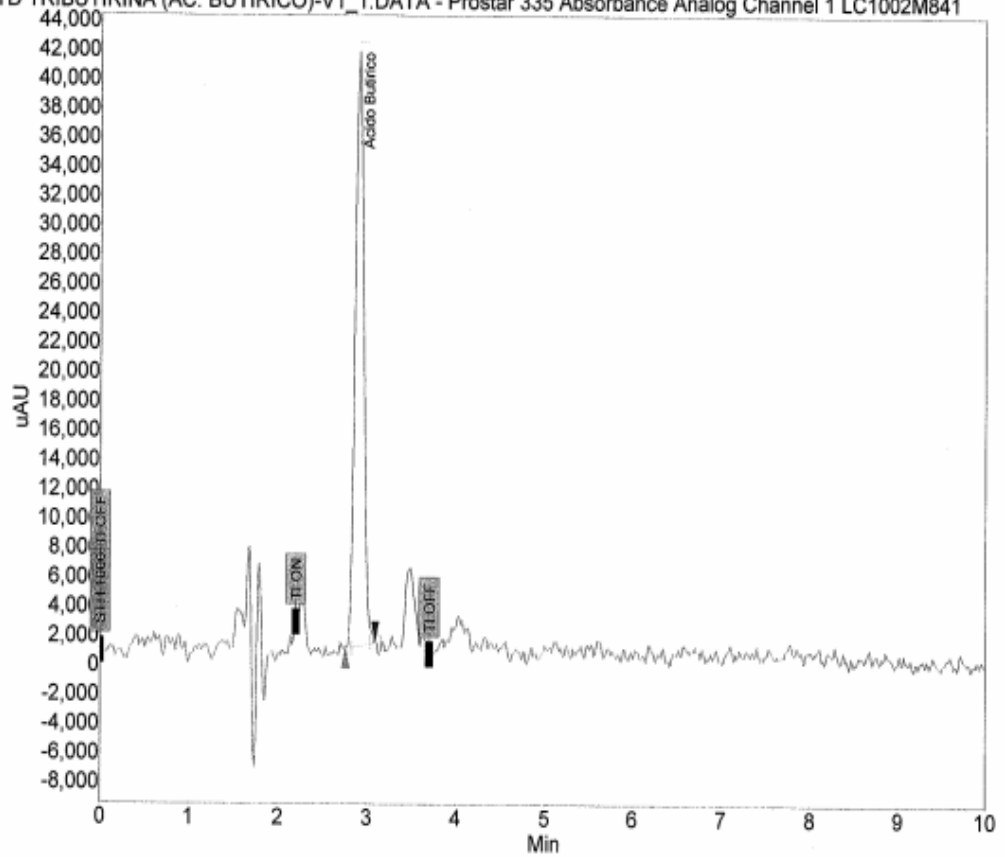
ANALYTICAL SERVICES S. DE R. L. DE C. V.

Estándar_1 Tributirina (Ácido Butírico)

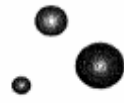
SISTEMA : HPLC-002
METODO : TRIBUTIRINA
ANALISTA : A Hernandez

FECHA DE INYECCIÓN: 09/06/2017 05:02:00 p.m.
LOTE: HDLSTD3/17
VIAL: 1 VOL: 10.000

STD TRIBUTIRINA (AC. BUTIRICO)-V1_1.DATA - Prostar 335 Absorbance Analog Channel 1 LC1002M841



Index	Name	Time (Min)	Quantity (% Area)	Height (uAU)	Area (uAU Min)	Area % (%)	As. USP (%)	NTP USP
1	Acido Butirico	2.91	100.00	40603.6	4576.1	100.000	1.06	3854.71
Total			100.00	40603.6	4576.1	100.000		



H E N D E L C

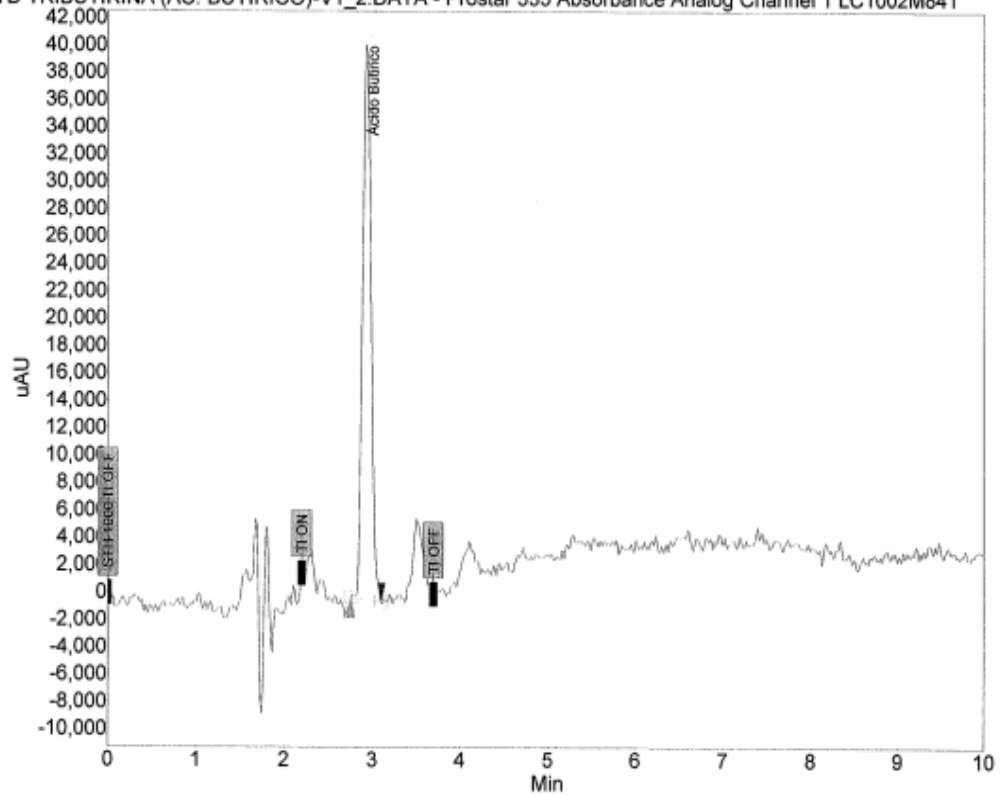
ANALYTICAL SERVICES S. DE R.L. DE C.V.

Estándar_2 Tributirina (Ácido Butírico)

SISTEMA : HPLC-002
METODO : TRIBUTIRINA
ANALISTA : A Hernandez

FECHA DE INYECCIÓN: 09/06/2017 05:13:46 p.m.
LOTE: HDLSTD3/17
VIAL: 1 VOL: 10.000

STD TRIBUTIRINA (AC. BUTIRICO)-V1_2.DATA - Prostar 335 Absorbance Analog Channel 1 LC1002M841



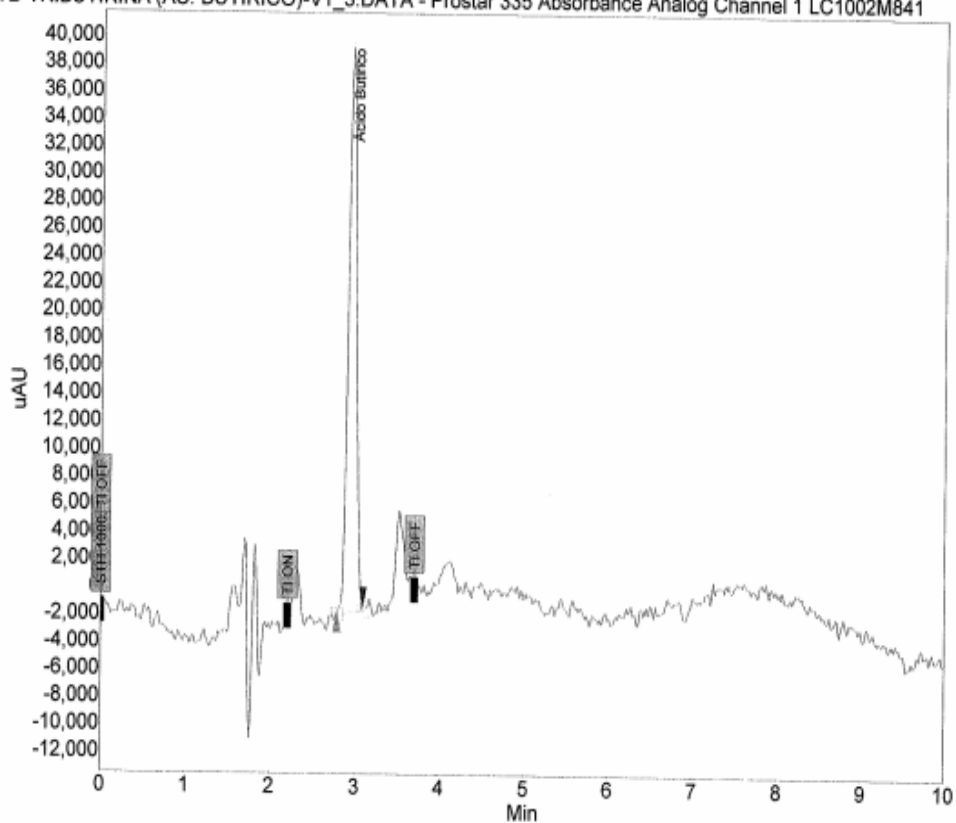
Index	Name	Time (Min)	Quantity (% Area)	Height (uAU)	Area (uAU Min)	Area % (%)	As USP	NTP USP
1	Acido Butirico	2.93	100.00	40588.6	4588.1	100.000	1.13	3982.12
Total			100.00	40588.6	4588.1	100.000		

Estándar_3 Tributirina (Ácido Butírico)

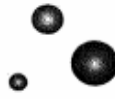
SISTEMA : HPLC-002
 METODO : TRIBUTIRINA
 ANALISTA : A Hernandez

FECHA DE INYECCIÓN: 09/06/2017 05:25:31 p.m.
 LOTE: HDLSTD3/17
 VIAL: 1 VOL: 10.000

STD TRIBUTIRINA (AC. BUTIRICO)-V1_3.DATA - Prostar 335 Absorbance Analog Channel 1 LC1002M841



Index	Name	Time (Min)	Quantity (% Area)	Height (uAU)	Area (uAU Min)	Area % (%)	As. USP	NTP USP
1	Acido Butirico	2.96	100.00	41040.6	4591.4	100.000	1.08	3953.84
Total			100.00	41040.6	4591.4	100.000		



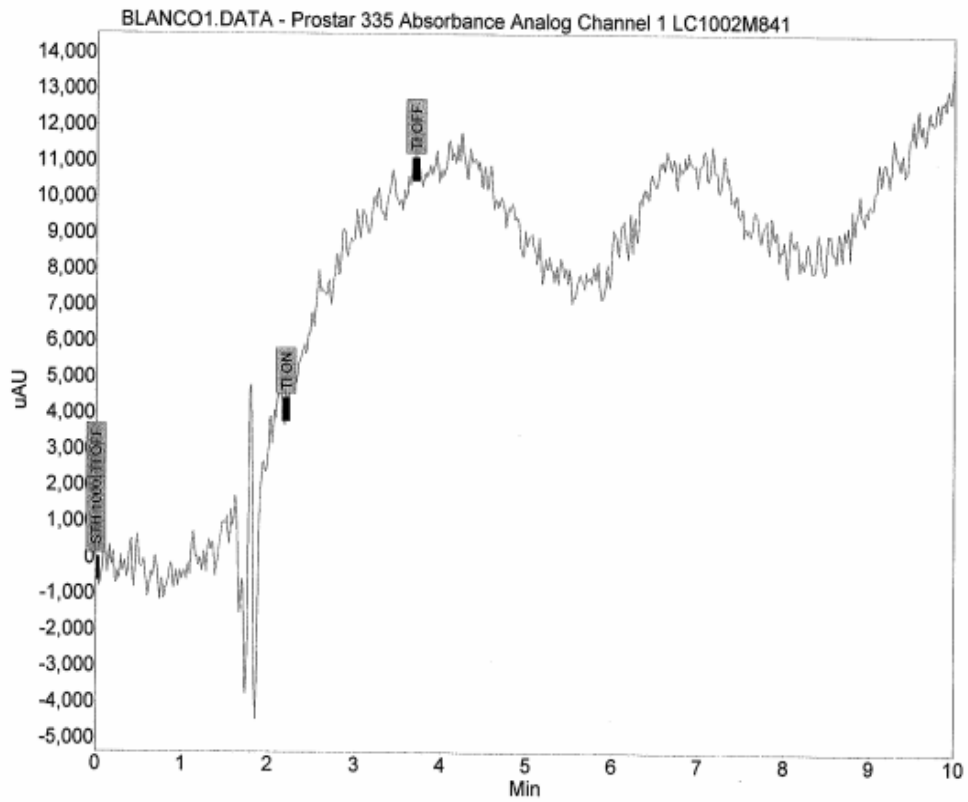
H E N D E L C

ANALYTICAL SERVICES S. DE R. L. DE C. V.

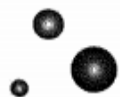
Blanco

SISTEMA : HPLC-002
METODO : TRIBUTIRINA
ANALISTA : A Hernandez

FECHA DE INYECCIÓN: 09/06/2017 06:12:44 p.m.
LOTE: S/L
VIAL: 3 VOL: 10.000



Index	Name	Time (Min)	Quantity (% Area)	Height (uAU)	Area (uAU.Min)	Area % (%)	As. USP	NTP USP
Total			0.00	0.0	0.0	0.000		



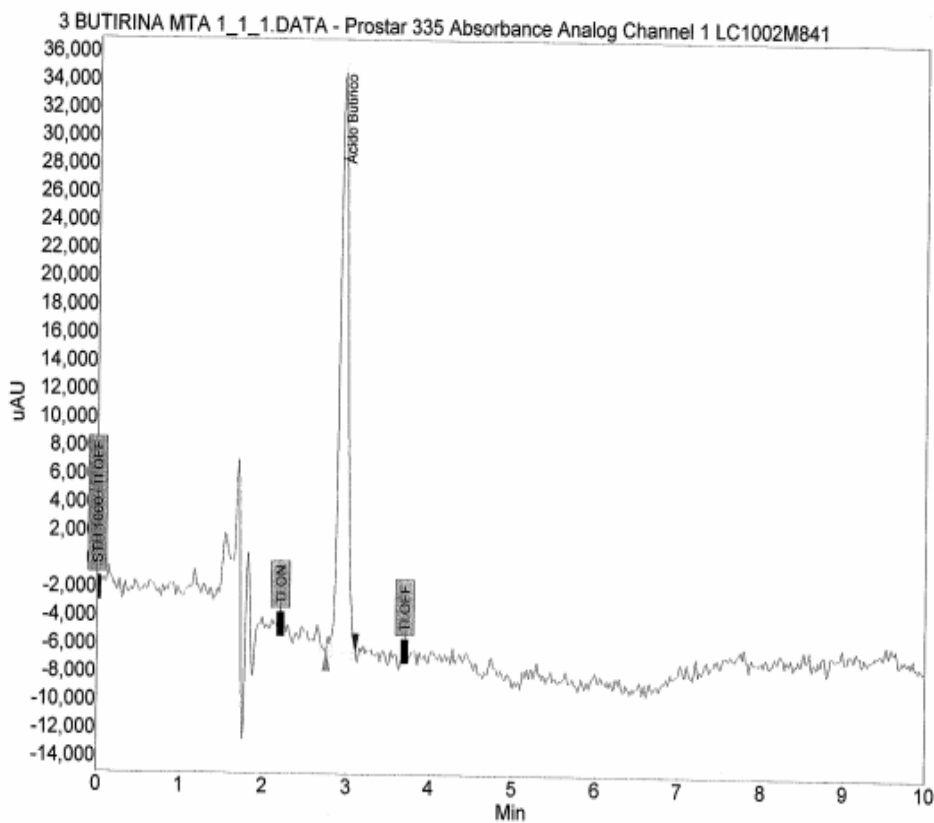
H E N D E L C

ANALYTICAL SERVICES S. DE R.L. DE C.V.

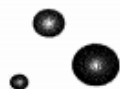
Muestra1_1 3 Butirina

SISTEMA : HPLC-002
METODO : TRIBUTIRINA
ANALISTA : A Hernandez

FECHA DE INYECCIÓN: 09/06/2017 06:24:34 p.m.
LOTE: 001/17
VIAL: 4 VOL: 10.000



Index	Name	Time (Min)	Quantity (% Area)	Height (uAU)	Area (uAU.Min)	Area % (%)	As. USP	NTP USP
1	Acido Butirico	2.95	100.00	41095.9	4695.8	100.000	1.00	4136.24
Total			100.00	41095.9	4695.8	100.000		



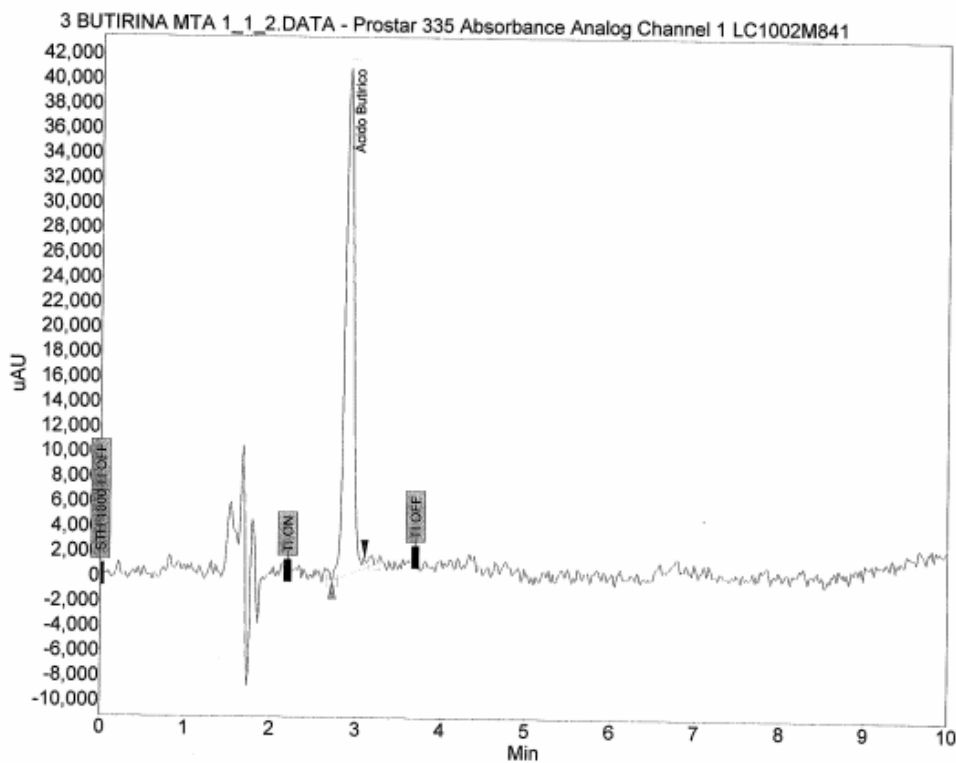
H E N D E L C

ANALYTICAL SERVICES S. DE R. L. DE C. V.

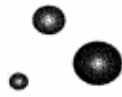
Muestra1_2 3 Butirina

SISTEMA : HPLC-UJZ
METODO : TRIBUTIRINA
ANALISTA : A Hernandez

FECHA DE INYECCION: 09/06/2017 06:36:20 p.m.
LOTE: 001/17
VIAL: 4 VOL: 10.000



Index	Name	Time (Min)	Quantity (% Area)	Height (uAU)	Area (uAU.Min)	Area % (%)	As. USP	NTP USP
1	Acido Butirico	2.91	100.00	40696.1	4642.8	100.000	1.03	4017.81
Total			100.00	40696.1	4642.8	100.000		



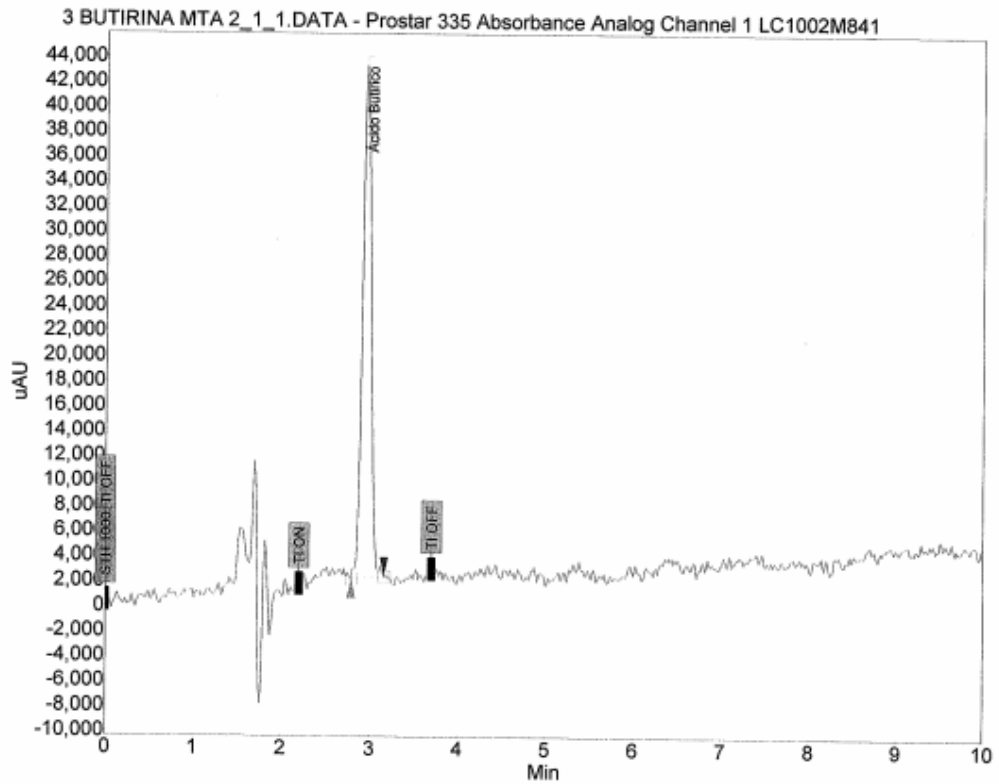
H E N D E L C

ANALYTICAL SERVICES S. DE R.L. DE C.V.

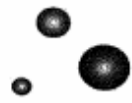
Muestra2_1 3 Butirina

SISTEMA : HPLC-002
METODO : TRIBUTIRINA
ANALISTA : A Hernandez

FECHA DE INYECCIÓN: 09/06/2017 06:48:08 p.m.
LOTE: 001/17
VIAL: 5 VOL: 10.000



Index	Name	Time (Min)	Quantity (% Area)	Height (uAU)	Area (uAU Min)	Area % (%)	As. USP	NTP USP
1	Acido Butirico	2.95	100.00	41035.4	4854.7	100.000	1.05	4188.35
Total			100.00	41035.4	4854.7	100.000		



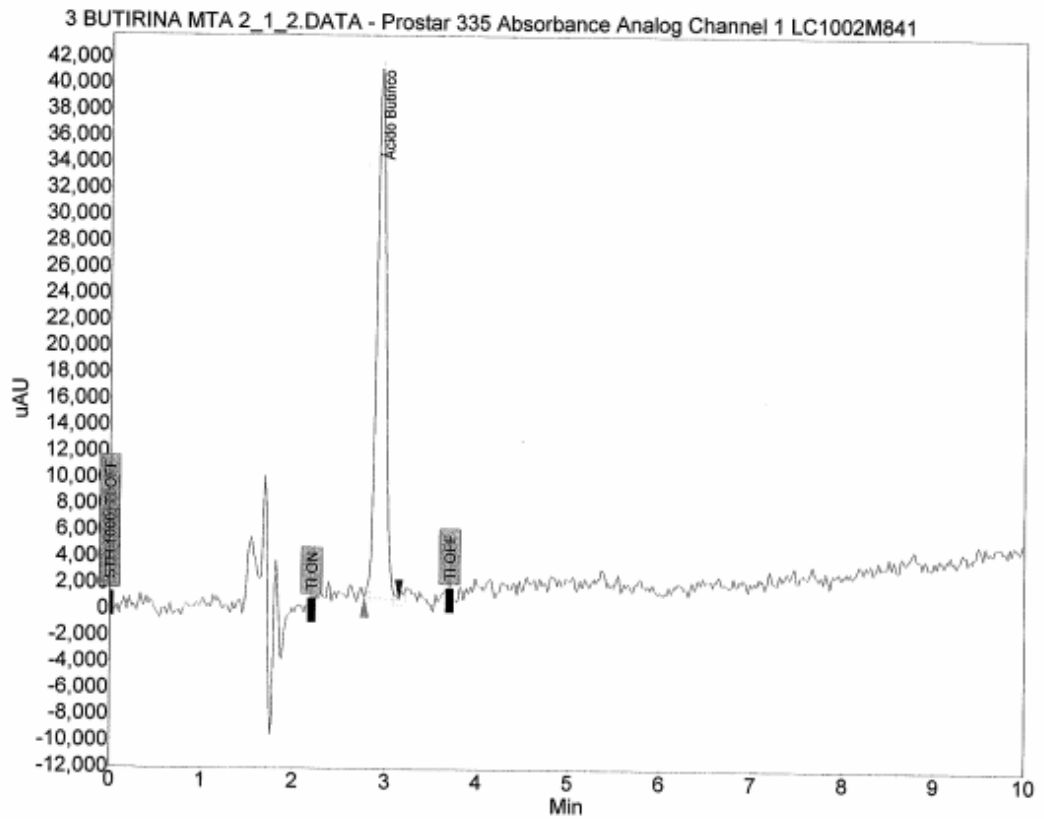
H E N D E L C

ANALYTICAL SERVICES S. DE R. L. DE C. V.

Muestra2_2 3 Butirina

SISTEMA : HPLC-002
 METODO : TRIBUTIRINA
 ANALISTA : A Hernandez

FECHA DE INYECCIÓN: 09/06/2017 06:59:51 p.m.
 LOTE: 001/17
 VIAL: 5 VOL: 10.000



Index	Name	Time (Min)	Quantity (% Area)	Height (uAU)	Area (uAU Min)	Area % (%)	As USP	NTP USP
1	Acido Butirico	2.95	100.00	40302.2	4658.3	100.000	0.86	4048.78
Total			100.00	40302.2	4658.3	100.000		

21.3 Ficha técnica del alimento para rata

BDL-7100

Nutrición animal especializada



La dieta de **BDL-7100** Alimento balanceado para **roedores** de laboratorio e investigación (**ratas, ratones y hámster**) en fase de mantenimiento.

Embalaje

- Pallet de 5/8 de diámetro x 1" de largo.
- Sacos de 20 kg. Netos al envasar

Análisis garantizado:

- **Proteína:** 23.0% mín.
- **Grasa:** 4.5% mín.
- **Fibra:** 6.0% máx.
- **Cenizas:** 8.0% máx.
- **Humedad:** 12.0% máx.
- **E.L.N.:** 46.5%

Ingredientes: Maíz, sorgo, trigo, gluten de maíz, salvados de maíz, trigo, arroz y salvadillo, harinas de alfalfa deshidratada molida, soya, cártamo, ajonjolí, carne y pescado, melaza de caña, sal, carbonatos de calcio y ferroso, ortofosfato de calcio, aceite vegetal, DL-metionina, L-lisina, óxidos de magnesio, manganeso y zinc, cloruros de potasio y cobalto, sulfatos ferroso y de cobre, selenito de sodio, iodato de calcio, vitaminas A, D3, E, K, B1, B2, B6, B12, cloruro de colina, pantotenato de calcio, niacina, ácido fólico y biotina.

Uso, dosificación y recomendaciones: Alimento a libre acceso a las roedores, excepto cuando tenga un programa de control de peso. Almacene el producto sobre tarimas, protegiéndolo de los rayos del sol, de la humedad y del ataque de plagas. Ofrezca agua limpia a libre acceso.



ABENE^{MR}

21.4 Dosificación de solución glucosada al 30% para las curvas de glucosa.

ID	Peso g	Gluc/ml/C1	Peso g	Gluc/ml/C2
C1, 1	262	1.74	243	1.6
C1,2	292	1.94	————	————
C2,1	287	1.91	300	2
C2,2	245	1.63	258	1.72
C3,1	296	1.97	296	1.63
C3,2	343	2.29	447	2.98
C3,3	275	1.83	294	1.95
C4,1	265	1.69	————	————
C4,2	265	1.76	277	1.86
C4,3	324	2.16	358	2.36
C5,1	354	2.36	408	2.72
C5,2	334	2.22	360	2.36
C6,1	343	2.28	386	2.57
C6,2	349	2.32	————	————
C7,1	249	1.66	239	1.59
C7,2	270	1.8	264	1.76
C7,3	374	2.31	260	1.73
C8,1	286	1.9	264	1.76
C8,2	312	2.08	325	2.16
C8,3	309	2.06	320	2.13
C9,1	306	2.04	329	2.19
C9,2	302	2.01	————	————
C10,1	339	2.26	368	2.45
C10,2	329	2.18	355	2.36
C11,1	403	2.7	423	2.82
C11,2	365	2.43	406	2.7
C11,3	348	2.33	————	————
C12,1	338	2.25	394	2.62
C12,2	301	2	330	2.2
C12,3	300	2	322	2.14
C13,1	303	2.02	313	2.08
C13,2	294	1.96	364	2.42
C14,1	291	1.94	308	2.05
C14,2	302	2.01	362	2.41
C14,3	271	1.8	305	2.03

21.5 Dosificación de estreptozotocina para las ratas diabéticas.

Identificación	Peso Kg	DOSIS STZ	vol total+ residuo catéter/ml
C1, 1	0.262	0.2358	0.2658
C1,2	0.292	0.2628	0.2928
C2,1	0.287	0.2583	0.2883
C2,2	0.245	0.2205	0.2505
C3,1	0.296	0.2664	0.2964
C3,2	0.343	0.3087	0.3387
C3,3	0.275	0.2475	0.2775
C4,1	0.265	0.2385	0.2685
C4,2	0.265	0.2385	0.2685
C4,3	0.324	0.2916	0.3216
C5,1	0.354	0.3186	0.3486
C5,2	0.334	0.3006	0.3306
C6,1	0.343	0.3087	0.3387
C6,2	0.349	0.3141	0.3441
C7,1	0.249	0.2241	0.2541
C7,2	0.270	0.243	0.273
C7,3	0.374	0.3366	0.3666
C8,1	0.286	0.2574	0.2874
C8,2	0.312	0.2808	0.3108
C8,3	0.309	0.2781	0.3081
C9,1	0.306	0.2754	0.3054
C9,2	0.302	0.2718	0.3018
C12,1	0.338	0.3042	0.3342
C12,2	0.301	0.2709	0.3009
C12,3	0.300	0.27	0.3