



Universidad de San Carlos de Guatemala
Dirección General de Investigación -Digi-



Programa Universitario de Investigación Interdisciplinaria en Salud



Informe final

**Evaluación nefroprotectora de extractos vegetales en modelos *in vivo* de daño renal
inducido por nefrotoxicidad, diabetes y deshidratación**

Equipo de investigación

Dr. Rodrigo Castañeda, Ph.D, Coordinador del proyecto

Lic. Marco Vinicio García, Investigador

Br. Caroline Aldana, Auxiliar de Investigación II

Guatemala, 26 Febrero 2020

Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas

Laboratorio de investigación de farmacología experimental y bioterio, Departamento de
farmacología y fisiología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacia

Dr. Félix Alan Douglas Aguilar Carrera

Director General de Investigación

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar

Coordinador General de Programas

Dra. Hilda Elena Valencia M. de Abril

Coordinadora del Programa Universitario de Investigación Interdisciplinaria en Salud

Dr. Rodrigo Castañeda, Ph.D

Lic. Marco Vinicio García

Br. Caroline Aldana.

Otros colaboradores:

Dra. Sully Cruz

Dr. Cristian Conzalez

Dra. Jazzel Zea

Dra Elena Chang

Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación, 2020. El contenido de este informe de investigación es responsabilidad exclusiva de sus autores.

Esta investigación fue cofinanciada por la Dirección General de Investigación de la Universidad de San Carlos de Guatemala a través del proyecto Código B9-2020, durante el año 2020 en el Programa Universitario de Investigación Interdisciplinaria en Salud.

Índice

1.	Resumen.....	1
3.	Abstract and keywords.....	2
4.	Introducción.....	Error! Bookmark not defined.
5.	Planteamiento del problema.....	Error! Bookmark not defined.
6.	Preguntas de investigación.....	7
7.	Delimitación en tiempo y espacio.....	8
8.	Marco teórico.....	9
9.	Estado del arte.....	12
10.	Objetivo general.....	14
12.	Hipótesis.....	15
13.	Materiales y métodos.....	16
14.	Difusión, difusión y divulgación.....	20
15.	Resultados.....	21
16.	Análisis y discusión de resultados.....	36
17.	Conclusiones.....	41
18.	Impacto esperado.....	42
19.	Referencias.....	43

Índice de figuras

	Página
Figura 1. Evaluación de distintas concentraciones de gentamicina (GM) en ratas macho de 7 semanas	21
Figura 2. Cambios en peso corporal tras administración oral de extractos candidatos después de 8 días de administración intraperitoneal de 100 mg/Kg de gentamicina (GM) en ratas macho de 7 semanas	22
Figura 3. Nitrógeno de urea en sangre (BUN) después de 8 días de administración intraperitoneal de 100 mg/Kg de gentamicina (GM) en ratas macho de 7 semanas tras administración oral de extractos candidatos	23
Figura 4. Nitrógeno de urea en orina después de 8 días de administración intraperitoneal de 100 mg/Kg de gentamicina (GM) en ratas macho de 7 semanas tras administración oral de extractos candidatos	23
Figura 5. Creatinina plasmática después de 8 días de administración intraperitoneal de 100 mg/Kg de gentamicina (GM) en ratas macho de 7 semanas tras administración oral de extractos candidatos	24
Figura 6. Creatinina en orina después de 8 días de administración intraperitoneal de 100 mg/Kg de gentamicina (GM) en ratas macho de 7 semanas tras administración oral de extractos candidatos	24
Figura 7. Evaluación de distintas concentraciones de estreptozocina (STZ) en ratones macho de 7 semanas durante 90 días posterior a su administración intraperitoneal (I.P.)	25
Figura 8. Cambios en peso corporal en modelo de nefropatía diabética inducida por estreptozotocina (STZ) en ratones CD-1	26
Figura 9. Glucosa en sangre en la progresión diabética de 10 semanas en ratones macho durante el periodo de administración de extractos candidatos	27
Figura 10. Creatinina sérica después de 60 días de progresión de diabetes inducida por estreptozotocina (STZ) en ratones macho tras administración oral de extractos candidatos	28
Figura 11. Urea en orina después de 60 días de progresión de diabetes inducida por estreptozotocina (STZ) en ratones macho tras administración oral de extractos candidatos	29
Figura 12. Proteína en orina excretada durante 24h después de 60 días de progresión de diabetes inducida por estreptozotocina (STZ) en ratones macho tras administración oral de extractos candidatos	29

	Página
Figura 13. Glucosa en orina después de 60 días de progresión de diabetes inducida por estreptozotocina (STZ) en ratones macho tras administración oral de extractos candidatos	30
Figura 14. Evaluación de distintos tiempos de exposición por calor en ratas macho de 7 semanas	31
Figura 15. Peso corporal tras exposición por calor con privación de agua 1.5 h diarias 5 días a la semana por 5 semanas en ratas Wistar	32
Figura 16. Urea en orina tras exposición por calor 1.5 h diarias 5 días a la semana por 5 semanas tras administración oral de <i>Tagetes lucida</i>	33
Figura 17. Urea en sangre (BUN) tras exposición por calor 1.5 h diarias 5 días a la semana por 5 semanas tras administración oral de <i>Tagetes lucida</i>	34
Figura 18. Proteína en sangre tras exposición por calor 1.5 h diarias 5 días a la semana por 5 semanas tras administración oral de <i>Tagetes lucida</i>	34
Figura 19. Creatinina en orina tras exposición por calor 1.5 h diarias 5 días a la semana por 5 semanas tras administración oral de <i>Tagetes lucida</i>	35
Figura 20. Creatinina en sangre tras exposición por calor 1.5 h diarias 5 días a la semana por 5 semanas tras administración oral de <i>Tagetes lucida</i>	35

“Evaluación nefroprotectora de extractos vegetales en modelos *in vivo* de daño renal inducido por nefrotoxicidad, diabetes y deshidratación”

1. Resumen

La enfermedad renal crónica (ERC) es una patología terminal severa que afecta principalmente a la población adulta hipertensa y diabética. Existe una epidemia regional en Guatemala de ERC de Etiología Desconocida en personas jóvenes, en trabajadores agrícolas principalmente en la costa sur del país, sin embargo, no se ha explorado extensamente candidatos farmacológicos para modelos *in vivo* para estudiarla. El objetivo de este estudio es establecer candidatos farmacológicos en modelos *in vivo* de daño renal por nefrotoxicidad inducida por gentamicina y nefropatía diabética inducida por estreptozotocina, para seleccionar un candidato a evaluar en deshidratación por calor. Para ello, se indujo nefrotoxicidad en ratas macho, con administración de gentamicina intraperitoneal (I.P., 100 mg/kg) durante 8 días, diabetes inducida por estreptozotocina (110 mg/kg I.P.) con evaluación de 3 meses de progresión diabética, y por deshidratación por calor tras 5 semanas de exposición a 37°C por 1.5 h, con evaluaciones de peso corporal, evaluaciones de glucosa, creatinina, urea y proteína en sangre y en orina. Se evaluaron 4 extractos secos de especies vegetales nativas, *Tagetes lucida*, *Lippia alba*, *Lippia graveolens* y *Solanum nigrescens*. La administración oral de 100 mg/Kg de *T. lucida*, *L. alba*, y *L. graveolens* redujeron significativamente ($P < 0.05$) la elevación de los niveles de creatinina sérica inducida por gentamicina y diabetes. Adicionalmente, el extracto de *T. lucida* redujo significativamente la reducción en peso corporal, la elevación de los niveles de urea en orina y sangre inducida por administración de gentamicina y suprimió significativamente la elevación de glucosa en sangre, nitrógeno de urea en orina, proteína excretada, y excreción de glucosa. Finalmente, el extracto de *T. lucida* fue escogido para ser evaluado por deshidratación por calor, demostrando significativamente un menor valor de los niveles de urea en orina comparado con el grupo control deshidratado por calor privado de agua.

2. **Palabras clave.** Aminoglicósidos; hiperglicemia; deshidratación por calor; creatinina; urea; riñón

3. Abstract and keywords

"Nephroprotective effects of selected extracts against kidney damage induced by Gentamicin, diabetes and heat exposure"

Chronic kidney disease (CKD) is a severe end-stage disease that mainly affects the hypertensive and diabetic adult population. There is a regional epidemic in Guatemala of CKD of Unknown Etiology in young people, in agricultural workers mainly on the southern coast of the country; however, few reports have explored pharmacological candidates *in vivo* to study nephroprotective agents. The aim of this study was to establish pharmacological candidates using *in vivo* models of kidney damage due to gentamicin-induced nephrotoxicity and streptozotocin-induced diabetic nephropathy, to select a candidate to evaluate in a model of heat exposure. For this, nephrotoxicity was induced in male rats with administration of an intraperitoneal (IP) injection of gentamicin (100 mg/Kg) for 8 days, diabetes induced by streptozotocin (110 mg / kg IP) with evaluation of 3 months of diabetic progression, and by heat exposure to 37 ° C for 1.5 h for 5 weeks, with evaluations of body weight, and glucose, creatinine, urea and protein in blood and urine. The experimental drugs consisted in four dried extracts of native plant species, *Tagetes lucida*, *Lippia alba*, *Lippia graveolens* and *Solanum nigrescens*. Oral administration of 100 mg/Kg of *T. lucida*, *L. alba*, and *L. graveolens* significantly reduced ($P < 0.05$) the elevation of serum creatinine levels induced by gentamicin and diabetes. Additionally, *T. lucida* extract significantly reduced the reduction in body weight, the elevation of urea levels in urine and blood induced by the administration of gentamicin and significantly suppressed the elevation of blood glucose, urine urea, excreted protein, and glucose excretion. Finally, the *T. lucida* extract was chosen to be evaluated by heat dehydration, showing a significantly lower value of urea levels in urine compared to the control group dehydrated by heat.

Keywords: Aminoglycosides; hyperglycemia; heat exposure; creatinine; urea; kidney.

4. Introducción

El estudio Global Burden of Disease determinó que la enfermedad renal crónica (ERC) se caracterizó por 1.2 millones de muertes en 2015, con un aumento global del 32% desde 2005 (Luyckx, Tonelli, & Stanifer, 2018). En este reporte, se estima que cada año, alrededor de 1.7 millones de personas mueren a causa de una lesión renal aguda. En general, se estima que entre 5 y 10 millones de personas mueren anualmente por enfermedad renal. La enfermedad renal está asociada con una tremenda carga económica para muchos países, sobre todo en países en vías de desarrollo (Nugent, Fathima, Feigl, & Chyung, 2011). En general, distintos países gastan más del 2–3% de los presupuesto anuales de atención de salud en el tratamiento de la enfermedad renal terminal, aunque los que reciben dicho tratamiento representan menos del 0,03% de la población total. Guatemala tiene una de las tasas más altas observadas en América de ERC y de mortalidad por insuficiencia renal (Laux, Barnoya, Guerrero, & Rothstein, 2015). Adicionalmente, durante las dos últimas décadas, en Centroamérica se han reportado en forma creciente, altos índices de incidencia, prevalencia y mortalidad por ERC de Etiología Desconocida (ERCd) entre las poblaciones menos favorecidas, que afecta a las comunidades agrícolas de la costa sur donde la pobreza y las oportunidades de trabajo son limitadas (Laux et al., 2016). La mayoría de los trabajadores afectados por ERCd son hombres jóvenes entre los 18 y 35 años, trabajadores agrícolas, inmigrantes y trabajadores temporales, concentrados en la costa del Pacífico de Mesoamérica.

Se requiere un modelo *in vivo* confiable que produzca una enfermedad estable dentro de un período de tiempo relativamente corto para las intervenciones relacionadas con la ERC. Se han desarrollado varios modelos animales utilizando numerosos métodos en el área de la ERC para aproximarse a la enfermedad humana (Calvin, Misra, & Pflueger, 2010). Diversos productos naturales han demostrado efectividad como renoprotectores en modelos animales en los cuales se induce la nefrotoxicidad. Compuestos derivados de plantas medicinales como fenoles y flavonoides han sido los más efectivos en dichos ensayos. Dentro de los metabolitos secundarios, sobresalen los ginsenósidos, gingerona, silimarina, proantocianidina, crocina, quercetina, curcumina, compuestos polifenólicos, compuestos organosulfurados (Boozari & Hosseinzadeh,

2017). Es por ello que siendo Guatemala un país que presenta dentro de las principales diez causas de mortalidad la insuficiencia renal crónica, además de poseer una patología de etiología desconocida, es importante buscar nuevos tratamientos que se puedan asociar a prevenir y disminuir el daño renal o sus complicaciones y los productos naturales podrían representar una opción viable para su incorporación en el sistema de salud pública y apoyar a la gran cantidad de trabajadores y población de las comunidades rurales afectadas por esta epidemia.

Es por ello que el objetivo de este estudio fue evaluar distintos extractos vegetales en diferencias fisiopatológicas, farmacológicas y metabólicas usando distintos modelos de daño renal en roedores inducido por nefrotoxicidad, diabetes y deshidratación. Para ello, se indujo nefrotoxicidad en ratas macho, con administración de gentamicina intraperitoneal (I.P., 100 mg/kg) durante 8 días, diabetes inducida por estreptozotocina (110 mg/kg I.P.) con evaluación de 3 meses de progresión diabética, y por deshidratación por calor tras 5 semanas de exposición a 37°C por 1.5 h, con evaluaciones de peso corporal, evaluaciones de glucosa, creatinina, urea y proteína en sangre y en orina. Se evaluaron 4 extractos secos de especies vegetales nativas, *Tagetes lucida*, *Lippia alba*, *Lippia graveolens* y *Solanum nigrescens*, de los cuales *T. lucida* fue seleccionada para su posterior evaluación en deshidratación por calor.

5. Planteamiento del problema

Los mecanismos que median la muerte celular renal inducida por nefrotoxicantes y patologías renales son sorprendentemente similares. Por ejemplo, la enfermedad renal aguda inducida por isquemia implica el agotamiento de ATP, el estrés oxidativo, la muerte celular de los túbulos proximales, la pérdida de la membrana del borde en cepillo, y la polaridad celular (Devarajan, 2006). En comparación, el daño renal inducido por el quimioterapéutico nefrotoxicante cisplatino también implica estrés oxidativo, muerte celular del túbulo proximal y pérdida de la membrana y polaridad del borde en cepillo (Ludwig & Oberleithner, 2004; Miller, Tadagavadi, Ramesh, & Reeves, 2010). Esto es similar a eventos que se observan en la nefropatía inducida por la diabetes (Hakim & Pflueger, 2010). La proteinuria, la fibrosis glomerular y la fibrosis intersticial son eventos clave en la insuficiencia renal inducida por hipertensión e hiperglucemia, que comparte características con alteraciones glomerulares inducidas por otras sustancias nefrotoxicas. En este sentido, los modelos de nefrotoxicidad inducidos por gentamicina han sido consistentes entre diferentes modelos *in vitro* e *in vivo* (Rodríguez Salgueiro & González Nunez, 2016). Por lo que el primer planteamiento que queremos abordar es la ausencia de un modelo de tamizaje farmacológico y la comparación de modelos de daño renal, que sea de uso práctico, robusto y eficiente, validado en el contexto de daño histopatológico renal por diabetes y deshidratación.

Los roedores siguen siendo el pilar de los estudios *in vivo* de nefrotoxicidad (Rodríguez Salgueiro & González Nunez, 2016). Sin embargo, las ratas y los ratones tienen importantes diferencias cuando se trata de evaluar la nefrotoxicidad. Uno de ellos es la expresión de la microglobulina- α_2u , la cual es dependiente de la especie y el género, siendo significativamente mayor en ratas que en ratones y siendo mayor en machos (Swenberg, 1993). Se cree que estas diferencias explican la mayor toxicidad de varios nefrotóxicos en ratas en comparación con los otros modelos, especialmente después de exposiciones a largo plazo, lo que la han hecho la especie de roedores de elección por sensibilidad en daño renal. Recientemente, se ha propuesto un modelo en ratones a partir de una severa deshidratación por exposición a calor y con rehidratación retardada, evidenciando daño renal, aumento en la creatinina sérica, lesiones en el túbulo proximal con infiltración de macrófagos y fibrosis renal temprana (C. A. Roncal-Jimenez et al.,

2017). Sin embargo, estudios usando este modelo son escasos, y los parámetros de daño limitan su comparación, debido a diferencias en especie.

Finalmente, en este terreno común de mecanismos fisiopatológicos existen similitudes en los mecanismos moleculares que median la muerte de las células renales. Diferentes estudios han demostrado que tales enfoques son necesarios para abordar principales estrategias de diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la insuficiencia renal aguda y crónica (Bao, Yuan, Chen, & Lin, 2018). Sin embargo, no se han explorado propuestas terapéuticas en daño renal producido por deshidratación por calor, ni una comparación otras causas que permitan un modelo de tamizaje.

6. Preguntas de investigación

Preguntas generales

¿Producirán distintos factores etiológicos características histopatológicas, metabólicas y farmacológicas comunes en modelos *in vivo*?

Preguntas específicas

¿Tendrán los productos naturales a evaluar una actividad protectora en la función renal?

¿Será el daño renal producido por gentamicina un modelo de tamizaje (predicción) para modelos de deshidratación y diabetes?

¿Se mantendrá el potencial de actividad nefroprotectora en distintos modelos de daño renal?

7. Delimitación en tiempo y espacio

Este estudio estuvo dividido por 4 fases:

Primera fase: Validación preliminar de todos los modelos animales en 3 condiciones de diseño fisiopatológico para asegurar la medición de las variables estimadas.

Segunda fase: Evaluación de los candidatos farmacológicos (extractos vegetales) con sus respectivos controles en nefrotoxicidad inducida por gentamicina en ratas Wistar macho.

Tercera fase: Evaluación de los candidatos farmacológicos (extractos vegetales) con sus respectivos controles en nefropatía diabética inducida por estreptozotocina en ratones macho CD-1.

Cuarta fase: Selección de un candidato a ser evaluado en deshidratación por calor en ratas Wistar macho.

Los experimentos se realizaron en la universidad de San Carlos de Guatemala en dos áreas, bioterio y Lipronat de la facultad de Farmacia.

8. Marco teórico

Diversos estímulos nocivos producen una pérdida de células renales que pueden inducir daño renal e insuficiencia renal (Devarajan, 2006). La causa de la insuficiencia renal puede ser intrínseca o extrínseca. Entre las causas extrínsecas incluyen enfermedad cardiovascular, obesidad, diabetes, sepsis e insuficiencia pulmonar y hepática. Las causas intrínsecas incluyen nefritis glomerular, enfermedad renal poliquística, fibrosis renal, muerte de células tubulares y cálculos. El riñón desempeña un papel destacado en la mediación de la toxicidad de numerosos fármacos, contaminantes ambientales y sustancias naturales. Los fármacos que se sabe que son nefrotóxicos incluyen varias terapias contra el cáncer, fármacos contra el abuso, antibióticos y agentes de radiocontraste. Existen características comunes entre los mecanismos de insuficiencia renal inducidos por nefrotoxicantes y causas extrínsecas. Estos principios se han aplicado en la construcción de distintos modelos animales, clasificados según el factor nocivo de la función renal, principalmente en modelos con drogas ototoxicas, nefropatía diabética e hipertensa, nefrectomía y con modelos genéticamente modificados (Bao et al., 2018). En las últimas décadas, se ha demostrado *in vivo* que la deshidratación debida al sudor y al calor activa la liberación de vasopresina (Torres, 2009). A su vez, recientemente se ha reconocido que la vasopresina tiene un papel potencial como mediador de la enfermedad renal crónica (C. A. Roncal-Jimenez et al., 2017). Aunque la función de la vasopresina en el aumento de la tasa de progresión en la enfermedad renal crónica se ha demostrado en animales, su papel en la lesión renal aguda asociada con la deshidratación permanece en gran parte sin explorar.

La deshidratación se ha asociado comúnmente con un tipo de lesión renal aguda "pre-renal", ya que la condición se ha visto como completamente reversible y no asociada con daño renal permanente. Sin embargo, recientemente ha habido un creciente número de reportes donde la deshidratación recurrente, especialmente cuando se relaciona con el estrés por calor, puede conducir a una enfermedad renal crónica (ERC) (Johnson et al., 2017). Este hecho ha sido una preocupación especial en Centroamérica, donde ha surgido una epidemia de ERC entre los trabajadores manuales en los campos de caña de azúcar y otras ocupaciones externas (denominada nefropatía mesoamericana) en las que el principal factor de riesgo es la

deshidratación recurrente y el estrés por calor (Johnson & Sanchez-Lozada, 2013; Weiner, McClean, Kaufman, & Brooks, 2013; Wesseling et al., 2014). De hecho, recientemente se han reconocido epidemias de ERC con características similares en otras áreas del mundo, como India y Sri Lanka, lo que lleva a la sugerencia de que la "nefropatía por estrés por calor" podría representar una de las principales causas de la ERC en todo el mundo (Glaser et al., 2016).

En los últimos años, se han explorado un poco el mecanismo de daño renal *in vivo* producido por deshidratación. Recientemente, se desarrolló un modelo animal de ERC exponiendo a los ratones a estrés por calor y deshidratación recurrentes (Roncal Jimenez et al., 2013). Al igual que las epidemias descritas en la literatura, el hallazgo histológico primario es fibrosis en el túbulo intersticial, aunque también se ha observado isquemia glomerular. Los mecanismos fisiopatológicos incluían la activación la vía de poliol (aldosa reductasa-sorbitol deshidrogenasa) inducida por la deshidratación térmica. A su vez, la fructosa generada a partir de la vía de poliol puede ser metabolizada por la fructoquinasa que está presente en el túbulo proximal, lo que lleva a agotamiento local de trifosfato de adenosina (ATP), estrés oxidativo, liberación de quimioquinas y generación de ácido úrico (Cirillo et al., 2009). En el modelo de deshidratación asociada a la ERC en ratones, se ha demostrado que la fructosa producida de manera endógena en la corteza renal, es responsable de lesión tubular proximal, que no se observó en ratones con deficiencia de fructoquinasa. Estos estudios han sugerido de que la activación de la vía de poliol-fructoquinasa es probablemente uno de los sistemas mediadores conducen el estrés por calor, en la ERC asociada a la deshidratación. A su vez, la deshidratación también es un potente estímulo para la liberación de vasopresina, que a su vez ayuda a la concentración urinaria (Bouby & Fernandes, 2003). Mientras que la vasopresina ha sido propuesta inicialmente como una hormona estrictamente beneficiosa para ayudar a prevenir la pérdida de agua, también se ha implicado como un mediador de la lesión renal y aguda. Se han reportado efectos que incluyen hiperfiltración glomerular y albuminuria (Bardoux et al., 2003; Bardoux et al., 1999). De hecho, también hay evidencia de que la supresión de la vasopresina puede retardar la progresión de la ERC en modelos *in vivo* (Bouby, Bachmann, Bichet, & Bankir, 1990), lo que lleva al reconocimiento de que la vasopresina también puede ser un mediador importante para el estrés por calor.

Existe literatura emergente que vincula el metabolismo de la fructosa con la vasopresina (Johnson et al., 2016). Por ejemplo, se sabe que la infusión de fructosa hipertónica estimula la liberación de vasopresina en humanos, mientras que esto no se observa con la glucosa equimolar (Wolf, Nguyen, Dumoulin, & Berthelay, 1992). Recientemente, se ha demostrado que el estrés por calor induce la activación de la vía de aldosa reductasa-fructoquinasa en el hipotálamo y que el bloqueo del metabolismo de la fructosa puede reducir el aumento de la vasopresina al estrés por calor (Song et al., 2017). De hecho, la fructosa puede estimular directamente la síntesis de vasopresina en los explantes hipotalámicos, pero esto no es observado si el metabolismo de la fructosa está bloqueado. Además, una bebida azucarada que contiene fructosa exacerba notablemente el daño renal inducido por la leve deshidratación por calor en ratas (Garcia-Arroyo et al., 2016).

9. Estado del arte

Diferentes modelos de roedores se han utilizado para evaluar el impacto de la deshidratación en el daño renal crónico, con una intervención a partir de privación de agua y exposición a calor. Un estudio en ratones C57BL/6 J evaluó el efecto de deshidratación por calor, proponiendo un modelo con intervalos de deshidratación por calor durante 30 min/h durante 7 horas en 5 días por semana, comparando hidratación durante los 30 minutos de descanso entre periodos de deshidratación contra la privación de agua en este periodo (Roncal Jimenez et al., 2013). Este estudio demostró en ratones sin hidratación durante los 30 minutos de descanso, una mayor pérdida de peso por deshidratación y un significativo aumento en los niveles de creatinina sérica, presión arterial, y activación de la vía del polirol (sorbitol en corteza renal, fructuosa en corteza renal, ácido úrico en corteza renal), comparado con los ratones que fueron hidratados durante las horas de deshidratación por calor. Esto sugiere que en la construcción del modelo, el daño renal es más pronunciado al privar a los animales de hidratación. En otros estudios, este modelo, elaborado con intervalos de deshidratación por calor durante 30 min/h durante 7-8 horas (con privación de agua en periodos de descanso) en 5 días por semana, ha evidenciado aumento en la creatinina sérica, lesiones en el túbulo proximal (con pérdida de células en el borde en cepillo) e infiltración de macrófagos y fibrosis renal temprana tanto en la corteza renal como en la médula externa (Milagres et al., 2018; Roncal-Jimenez et al., 2017). Estos modelos con deshidratación aguda relativamente severa, resultan aproximadamente en un 14% de pérdida de peso diaria al final de cada período de deshidratación por calor, con un impacto en su reducción de peso a las 5 semanas de aproximadamente 4% comparadas con control. Esto está acompañado de un marcado aumento de la osmolalidad sérica en asociación con un aumento de la coceptina sérica y un aumento de la osmolalidad urinaria y creatinina urinaria, consistente con la concentración urinaria.

Estudios en ratas Wistar expuestas a deshidratación por calor 1 hora diaria con inmediata rehidratación posterior, han confirmado daño renal después de 4 semanas, al evidenciar aumento en los niveles de coceptina, aumento en la expresión de receptores de vasopresina, expresión de Lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL) (Garcia-Arroyo et al., 2019; Garcia-Arroyo et al., 2017; Sanchez-Lozada et al., 2018). Similarmente, este daño ha confirmado la

activación de la vía de poliol observada en ratones, al presentar niveles más altos de fructosa, sorbitol, ácido úrico en corteza renal, peroxidación lipídica y proteica, junto a un aumento en expresión de aldosterona reductasa, sorbitol deshidrogenasa, fosfoquinasa y xantina oxidasa.

A pesar de que se comienzan a conocer recientemente los mecanismos fisiopatológicos, donde se conocen algunos productos naturales que podrían ser propuestos por su afinidad en bloquear mecanismos en común de enfermedad renal producida por deshidratación, no existen reportes donde exploren la protección de células renales (Wyatt & Reeves, 2017). A su vez, los modelos de nefrotoxicidad inducidos por gentamicina han sido consistentes entre diferentes modelos *in vitro* e *in vivo* para correlacionar el daño por nefropatía diabética (Rodríguez Salgueiro & Gonzalez Nunez, 2016). Por lo que uno de los planteamientos que se abordaron es la ausencia de un modelo de tamizaje farmacológico y la comparación de modelos de daño renal, que sea de uso práctico, robusto y eficiente, validado en el contexto de daño renal por diabetes y deshidratación. Además, los productos naturales que muestren nefroprotección brindarán una significativa contribución en innovación en el descubrimiento de productos naturales beneficiosos para la salud en una patología emergente.

10. Objetivo general

Evaluar las propiedades renoprotectoras de extractos vegetales mediante tamizaje farmacológico en modelos *in vivo* para explorar su potencial en Enfermedad Renal Crónica (ERC).

11. Objetivos específicos

Determinar las características metabólicas y farmacológicas de daño renal de los modelos *in vivo*, inducido por nefrotoxicidad y diabetes.

Determinar las características metabólicas de los modelos *in vivo* de daño renal inducido por gentamicina empleando marcadores metabólicos para determinar su potencial como modelo de tamizaje.

Determinar el efecto protector de los extractos vegetales, mediante la evaluación metabólica de daño renal de los modelos *in vitro* inducidos por nefrotoxicidad, diabetes y deshidratación

Evaluar a un candidato de los extractos vegetales como nefroprotectores para la enfermedad renal crónica de etiología desconocida y nefropatía diabética.

12. Hipótesis

Los productos naturales a evaluar en el modelo de nefrotoxicidad inducida por gentamicina tienen una actividad nefroprotectora significativa mayor al control con gentamicina + vehículo).

Los productos naturales a evaluar en el modelo de nefropatía diabética tienen una actividad nefroprotectora significativa mayor al grupo control diabético (vehículo).

El extracto seleccionado a partir del tamizaje a evaluar en el modelo de deshidratación por calor tiene una actividad nefroprotectora significativa mayor al control deshidratado por calor + vehículo.

Los productos naturales con actividad en el modelo de nefrotoxicidad inducida por gentamicina presentan una actividad nefroprotectora en los modelos de diabetes y deshidratación por calor.

Distintos factores nefrotóxicos *in vivo* presentan características metabólicas en común que pueden asociarse con renoprotectores provenientes de extractos vegetales.

13. Materiales y métodos

13.1 Enfoque y tipo de investigación

13.1.1 Investigación cuantitativa: Esto se realizó a partir de evaluaciones cuantitativas de daño y recuperación (actividad), por ejemplo proteína en orina, creatinina sérica, urea en orina y plasma (BUN), etc. Las asignaciones de grupos fueron realizadas al azar a partir de un método de balanceo de parámetros entre grupos. Todas las comparaciones se realizaron con un grupo control con vehículo, control con daño, y control positivo con droga de referencia.

13.1.2 Tipo de la investigación: Exploratoria y aplicada. Se dividió el enfoque nefroprotector en diversos pequeños estudios que exploraban distintos factores etiológicos de daño renal para proponer un candidato que se logrará aproximar a un modelo que asemeja a lo que sucede en el campo en la enfermedad renal crónica de etiología desconocida. Se realizaron aproximaciones a comparaciones entre modelos, tanto a nivel fisiopatológico como farmacológico. Se sabe, que la enfermedad renal crónica de etiología desconocida excluye a diabetes, sin embargo se incluyó en el estudio con el fin de aproximar más el potencial nefroprotector de los extractos vegetales a evaluar. Sin embargo, debido al número limitado de extractos a evaluar no se realizó una correlación pertinente de los modelos de tamizaje, para determinar el poder de predicción del modelo de tamizaje. Para ello, seguiremos abordando en próximos estudios diversos extractos y correlacionarlos entre modelos.

13.2 Método

13.2.1. Drogas vegetales

Se evaluaron extractos previamente realizados por el laboratorio de extracción de productos naturales (LIPRONAT), facultad de farmacia (USAC). Los extractos seleccionados fueron extracto etanólico al 70% de hojas de *Tagetes lucida*, extracto etanólico al 30% de hojas de *Lippia alba*, extracto etanólico al 50% de hojas de *Lippia graveolens* y extracto metanólico de hojas de *Solanum nigrescens*)

13.2.2. Drogas de referencia o inducción

Para los modelos de nefrotoxicidad se utilizó solución de gentamicina 100 mg/mL (Gentex, Queretaro, México). Para los modelos de diabetes se utilizó estreptozotocina (MP biochemicals, LLC, Illkirch, Francia) preparada inmediatamente en buffer de citratos. Los extractos secos fueron diluidos en dimetilsulfoxido (Merck, Darmstadt, Alemania). Ketamina (100 mg/mL Dutchfarm. Mederhost den Berg, Holanda) y xilazina (20 mg/mL Dutchfarm. Mederhost den Berg, Holanda) fueron utilizados para inducir anestesia. Glibenclamida (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) fue utilizada como control positivo en diabetes y N-acetilcisteína (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) como control positivo en nefrotoxicidad.

13.2.3. Evaluación in vivo

Todos los protocolos y procedimientos *in vivo* se realizaron de acorde a las guías del National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) y fueron aprobados por el comité de ética institucional de la facultad de ciencias químicas y farmacia, USAC (CICUALCCQQF-01-2020). En el inicio de cada experimento se utilizaron animales de la misma fecha de nacimiento con una variación máxima de ± 3 días y se balancearon los grupos en función del peso y otros parámetros propios del modelo. Las ratas Wistar macho de 7 semanas de edad de generación 1 y los ratones de 7 semanas de edad CD-1 generación 4, fueron obtenidas y almacenadas del Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia (obtenidas de Charles River Laboratories, Massachussets, USA). Nefrotoxicidad en ratas se realizó tras la administración de una solución de gentamicina intraperitoneal (i.p.) durante 8 días (Sun et al., 2018). Posteriormente en las drogas vegetales activas se evaluó daño renal producido por diabetes inducida por estreptozotocina tras 8 semanas de daño diabético en ratones CD-1 (Calvin et al., 2010); y deshidratación tras un modelo de 5 semanas de exposición de ratas Wistar a 1-2 h diarias a 37°C en incubadora para roedores (Ugo Basile, Geromio, Varase, Italia) (C. Roncal-Jimenez, Lanaspá, Jensen, Sanchez-

Lozada, & Johnson, 2015; C. A. Roncal-Jimenez et al., 2017; Roncal Jimenez et al., 2013). La administración oral y registro de pesos se realizó a diario en todos los experimentos, excepto en deshidratación por calor, en donde se realizaba 5 veces por semana.

13.2.4. Marcadores renales y metabólicos

La colección de orina se realizó en cajas metabólicas y los volúmenes de orina colectada de cada animal fueron medidos volumetricamente. La colección de sangre fue obtenida vía punción cardíaca y centrifugada en frío a 5000 rpm por 10 minutos. El plasma y la orina obtenidas fueron analizadas usando un método colorimétrico (Espectrofotómetro microlab 300) siguiendo los protocolos de los kits de prueba (DiaSys, Holzheim, Alemania). Se midieron Creatinina en plasma y orina, concentración de proteína en plasma y orina, urea en plasma y orina, glucosa excretada en orina. Para las evaluaciones de creatinina y urea en orina se realizaron diluciones 1:50. Las evaluaciones de glucosa en sangre se realizaron en punción de cola con medidor one-touch

13.2.5. Recolección de información

- Entre los mismos grupos de un cluster de experimentación se realizaron evaluaciones iniciales de factores metabólicos y de peso para la división de sujetos por grupo. Todos los animales que se encontraron en valores y comportamientos anormales fueron excluidos del estudio. Todos los parámetros de colección de la muestra vegetal fueron registrados y todos los extractos tienen número de espécimen de herbario (BIGU1127, BIGU1121, Bigu1132, Farmaya1111.). Los extractos fueron realizados en el laboratorio de productos naturales (LIPRONAT) de la Universidad de San Carlos. Todas las evaluaciones biológicas fueron realizadas en el bioterio de la facultad de Farmacia de la Universidad de San Carlos en los laboratorios de investigación de farmacología experimental.

13.2.6. Análisis estadístico

Los datos se analizaron utilizando el software estadístico Prism 6 (GraphPad, San Diego, CA, EE. UU.). Todos los datos se expresaron como la media \pm error estándar de la media (S.E.M.). Las comparaciones estadísticas de las pruebas metabólicas, análisis de plasma y orina se realizarán utilizando ANOVA con comparación múltiple posterior a la prueba de Dunnett. Las comparaciones estadísticas en pesos y glucosa en diferentes días (o sus diferenciales con valores basales al inicio del experimento) se realizaron a partir de ANOVA de dos vías entre los grupos tratados con vehículo y los tratados con el daño experimental y tratamientos farmacológicos, seguido de la prueba de comparación de Bonferroni. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

14. Difusión, difusión y divulgación

Se publicó un artículo de revisión en la revista Ciencia, tecnología y Salud de DIGI, con los fundamentos teóricos principales que fundamentan el estudio: **Castañeda, et al (2020). Biomarcadores traslacionales de modelos in vitro e in vivo de daño renal: Una perspectiva para abordar nefrotoxicidad desde múltiples factores etiológicos.**
<https://digi.usac.edu.gt/ojsrevistas/index.php/cytes/article/view/893>

15. Resultados

15.1. Nefrotoxicidad inducida por gentamicina

Preliminarmente se realizó una validación de distintas dosis de administración intraperitoneal (I.P.) de gentamicina (80, 100 y 120 mg/Kg) en una pequeña muestra de ratas Wistar macho de 7 semanas (n=3) por 8 días consecutivos con el fin de establecer los valores esperados, evaluar los reactivos y aparatos utilizados (**Figura 1**). Se estableció una concentración de 100 mg/Kg de gentamicina para los futuros experimentos de nefrotoxicidad inducida por gentamicina.

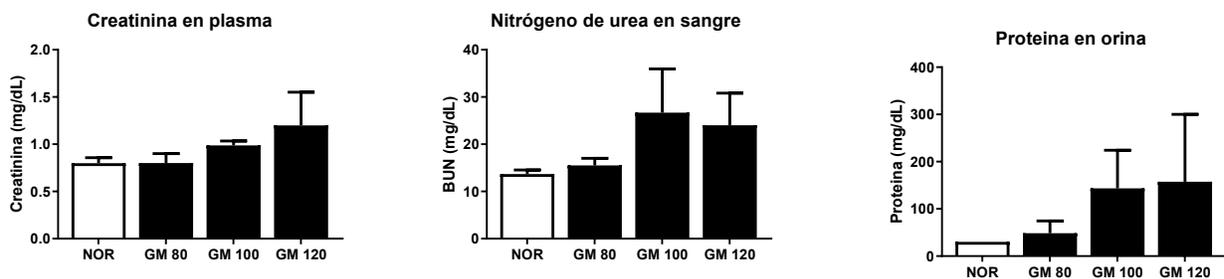


Figura 1. Evaluación de distintas concentraciones de gentamicina (GM) en ratas macho de 7 semanas (n=3). Se evaluaron los valores de creatinina y urea en plasma y proteína en orina en 3 concentraciones de administración de gentamicina intraperitoneal (80, 100 y 120 mg/Kg).

Posteriormente, se procedió a evaluar la actividad nefroprotectora de 4 especies vegetales (extracto etanólico al 70% de hojas de *Tagetes lucida*, extracto etanólico al 30% de hojas de *Lippia alba*, extracto etanolico al 50% de hojas de *Lippia graveolens* y extracto metanólico de hojas de *Solanum nigrescens*) en ratas (n=8) en el modelo de nefrotoxicidad inducida por gentamicina comparado con N-acetilcisteína (NAC) como control positivo. La evaluación preliminar de pesos corporales demostró una significativa reducción de pesos corporales en el grupo control administrado con gentamicina durante 8 días ($P < 0.05$) comparado con el grupo control con salino (**Figura 2**). La administración oral de NAC y *T. lucida* protegió significativamente ($P < 0.05$) la reducción de pesos inducidas por gentamicina. La evaluación de creatinina plasmática, y de nitrógeno de urea en sangre (BUN) y orina, demostró que *T. lucida* protegió significativamente la elevación éstos valores comparado con el grupo control

administrado con gentamicina (**Figuras 3-5**). A su vez los extractos de *S. nigrescens*, *L. alba* y *L. graveolens* protegieron ante la elevación de BUN y creatinina en plasma inducida por gentamicina comparables con el grupo administrado con NAC. Los valores de creatinina en orina fueron mayores en el grupo administrado con NAC comparado con el control gentamicina, mientras que los valores en los extractos fueron ligeramente mayores (Figura 6).

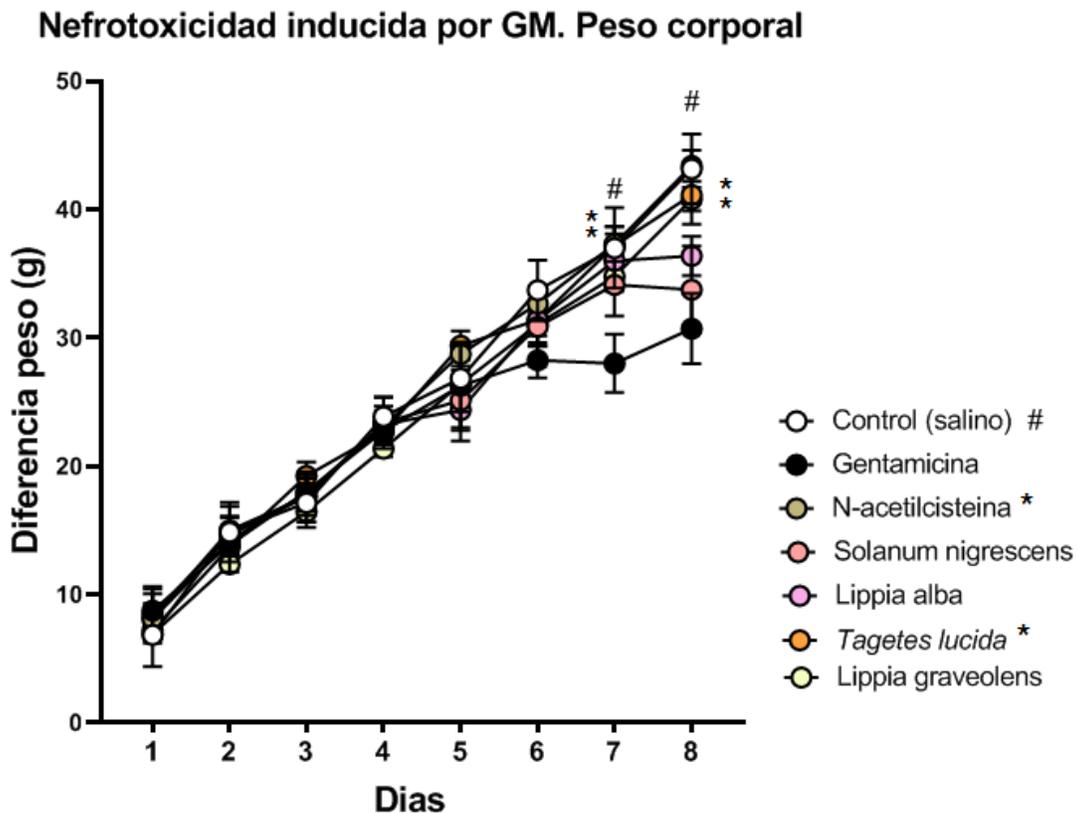


Figura 2. Cambios en peso corporal tras administración oral de extractos candidatos después de 8 días de administración intraperitoneal de 100 mg/Kg de gentamicina (GM) en ratas macho de 7 semanas (n=8). La administración oral de N-acetilcisteina y de *Tagetes lucida* protege significativamente la pérdida de peso inducida por GM. Los datos fueron expresados como media \pm error estándar de la media. Los valores de # $P < 0.05$ fueron considerados significativos comparados con el grupo control salino. Los valores de * $P < 0.05$ fueron considerados significativos comparados con el grupo control gentamicina.

Nefrototoxicidad inducida por GM. Urea en sangre

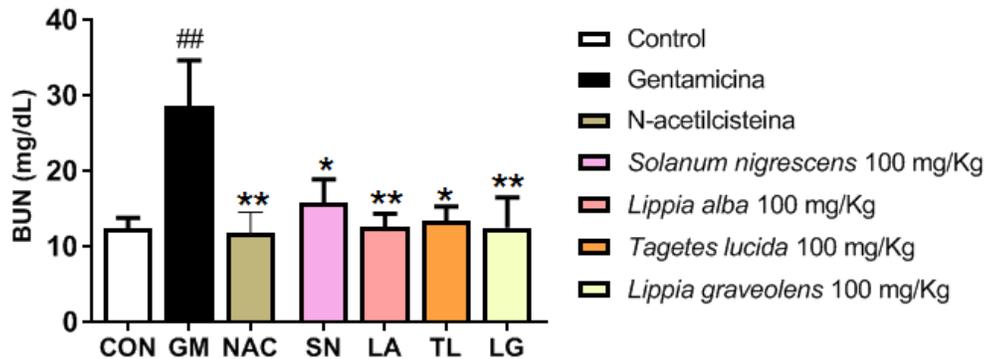


Figura 3. Nitrógeno de urea en sangre (BUN) después de 8 días de administración intraperitoneal de 100 mg/Kg de gentamicina (GM) en ratas macho de 7 semanas tras administración oral de extractos candidatos (n=8). La administración oral de N-acetilcisteina, y todos los extractos redujo significativamente la elevación de los niveles de urea inducida por GM. Los datos fueron expresados como media \pm error estándar de la media. Los valores de $##P < 0.01$ fueron considerados significativos comparados con el grupo control salino. Los valores de $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ fueron considerados significativos comparados con el grupo control GM.

Nefrototoxicidad inducida por GM. Urea en orina

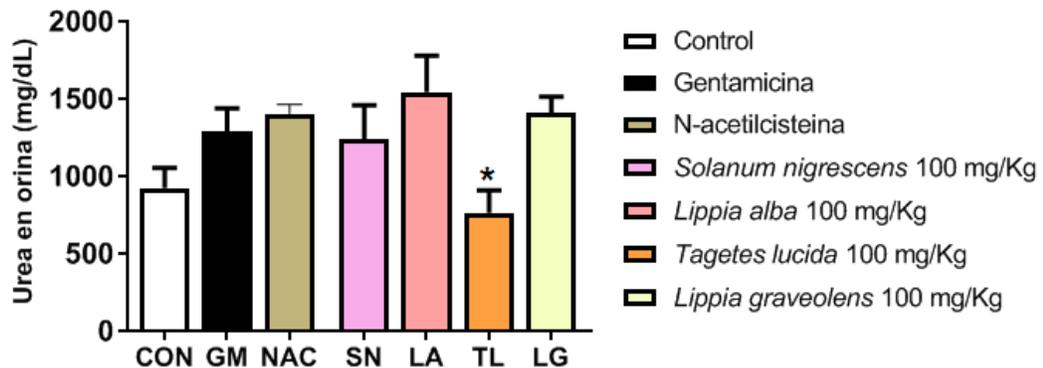


Figura 4. Nitrógeno de urea en orina después de 8 días de administración intraperitoneal de 100 mg/Kg de gentamicina (GM) en ratas macho de 7 semanas tras administración oral de extractos candidatos (n=8). La administración oral de *Tagetes lucida* redujo significativamente la elevación de los niveles de urea en orina inducida por administración de GM. Los datos fueron expresados como media \pm error estándar de la media. Los valores de $*P < 0.05$ fueron considerados significativos comparados con el grupo control GM.

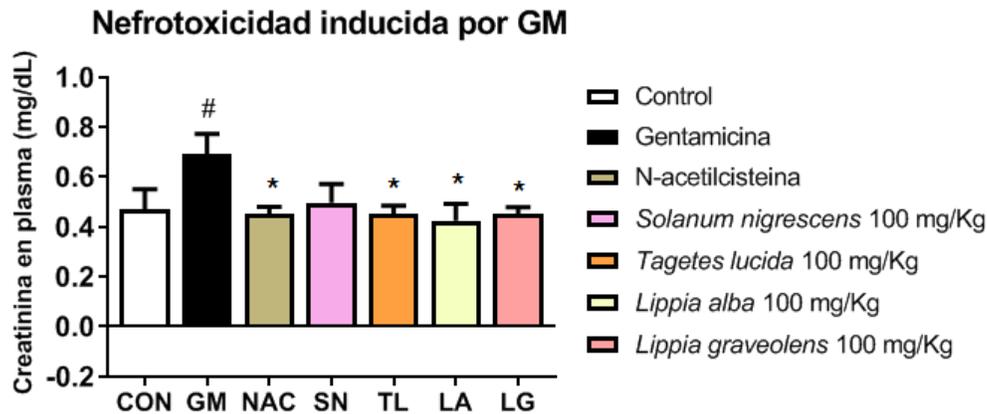


Figura 5. Creatinina plasmática después de 8 días de administración intraperitoneal de 100 mg/Kg de gentamicina (GM) en ratas macho de 7 semanas tras administración oral de extractos candidatos (n=8). La administración oral de N-acetilcisteina, de *Tagetes lucida*, de *Lippia alba* y *Lippia graveolens* protege significativamente la elevación de los niveles de creatinina en plasma inducida por GM. Los datos fueron expresados como media \pm error estándar de la media. Los valores de $\#P < 0.05$ fueron considerados significativos comparados con el grupo control salino. Los valores de $*P < 0.05$ fueron considerados significativos comparados con grupo control GM.

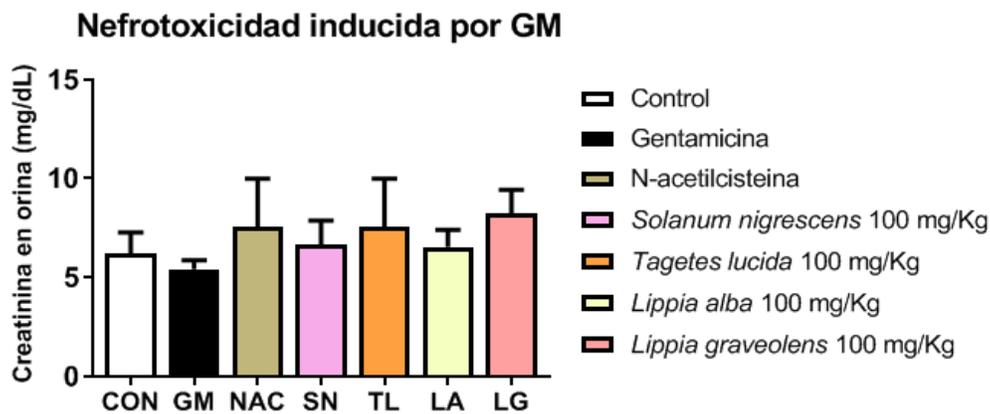


Figura 6. Creatinina en orina después de 8 días de administración intraperitoneal de 100 mg/Kg de gentamicina (GM) en ratas macho de 7 semanas tras administración oral de extractos candidatos (n=8). La administración oral de N-acetilcisteina, y de los extractos evaluados presento valores menores a los niveles de creatinina en orina inducida por la administración de GM. Los datos fueron expresados como media \pm error estándar de la media.

15.2. Nefropatía diabética inducida por estreptozotocina

Preliminarmente se realizó una validación de distintas dosis de administración intraperitoneal (I.P.) de dos dosis de estreptozotocina (STZ, 55, 60 y 65 mg/Kg) en ratones CD-1 macho de 7 semanas (n=8) por 2 días consecutivos con ayuno de 18 horas con el fin de establecer los valores esperados, evaluar los reactivos e instrumentos utilizados (**Figura 7**). Se estableció una concentración de 55 mg/Kg de STZ en dos dosis (110 mg/Kg) para los futuros experimentos de nefropatía diabética debido a que se produce un control ideal de los niveles de glucosa elevados y ausencia de mortalidad durante el periodo a evaluar (datos no mostrados).

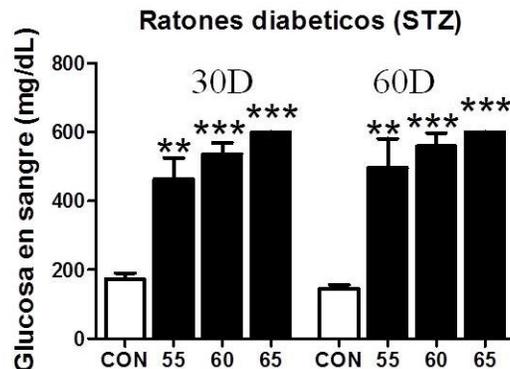


Figura 7. Evaluación de distintas concentraciones de estreptozocina (STZ) en ratones macho de 7 semanas durante 90 días posterior a su administración intraperitoneal (I.P.) (n=8). Dos dosis de administración I.P de STZ aumento significativamente los niveles de glucosa en sangre después de 60 días de evaluación, posterior al periodo de inducción de 4 semanas. Los datos fueron expresados como media \pm error estándar de la media. Los valores de $***P < 0.001$ fueron considerados significativos comparados con el grupo control normal (no diabético).

Posteriormente, se evaluó la actividad nefroprotectora de las 4 especies vegetales descritas previamente en ratones (n=8) en el modelo de nefropatía diabética inducida por STZ 110 mg/Kg comparado con Glibenclamida como control positivo. La evaluación de pesos corporales reveló una significativa reducción producida por diabetes en el grupo control STZ comparada con el grupo normal desde el día 22 de inducción de STZ y durante las 10 semanas posteriores (**Figura 8**). El grupo administrado con glibenclamida presentó valores promedio mayores al grupo control

STZ. La administración oral diaria de los extractos no mostró una protección a la pérdida de peso producida por diabetes inducida por STZ tras 10 semanas de evaluación.

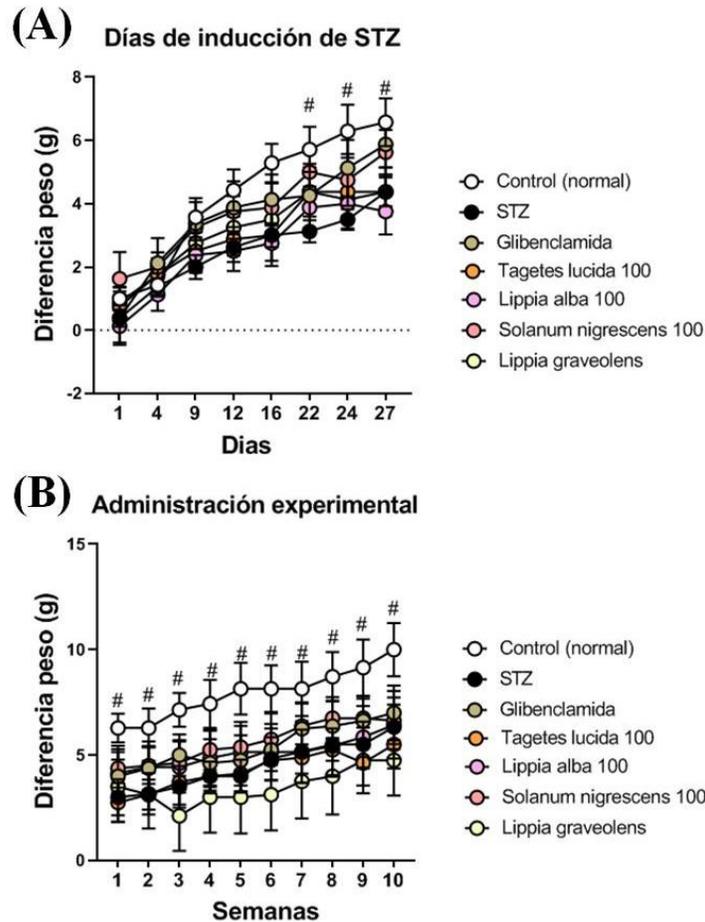


Figura 8. Cambios en peso corporal en modelo de nefropatía diabética inducida por estreptozotocina (STZ) en ratones CD-1 (n=8). Cambios en peso corporal tras inducción de 4 semanas (A) y progresión diabética de 10 semanas ratones macho tras administración de extractos candidatos (B) revelaron que la administración intraperitoneal de STZ produjo una disminución significativa en el peso corporal desde el día 22 de inducción, manteniéndose hasta la semana 10 de la fase de administración. Los datos fueron expresados como media \pm error estándar de la media. Los valores de $\#P < 0.05$ fueron considerados significativos comparados con el grupo control no diabético (normal).

La evaluación de los valores de glucosa en sangre obtenidos de cola se realizó a las 4 semanas de inducción de STZ (día 0, correspondiendo al inicio de administración de tratamiento), a los 30 y a los 60 días de administración de los tratamientos. En el día 0, los grupos fueron asignados al azar según al valor promedio de pesos y niveles de glucosa comparable en cada grupo para que fuesen homogéneos. Después de 30 y 60 días de progresión diabética los valores de glucosa en sangre fueron aumentando significativamente en el grupo STZ control, comparado con el grupo control normal (Figura 9(A)). Después de 30 y 60 días de administración de tratamientos, glibenclamida, *L. alba* y *T. lucida* redujeron significativamente los aumentos en los niveles de glucosa comparados con los valores basales (Figura 9(B)).

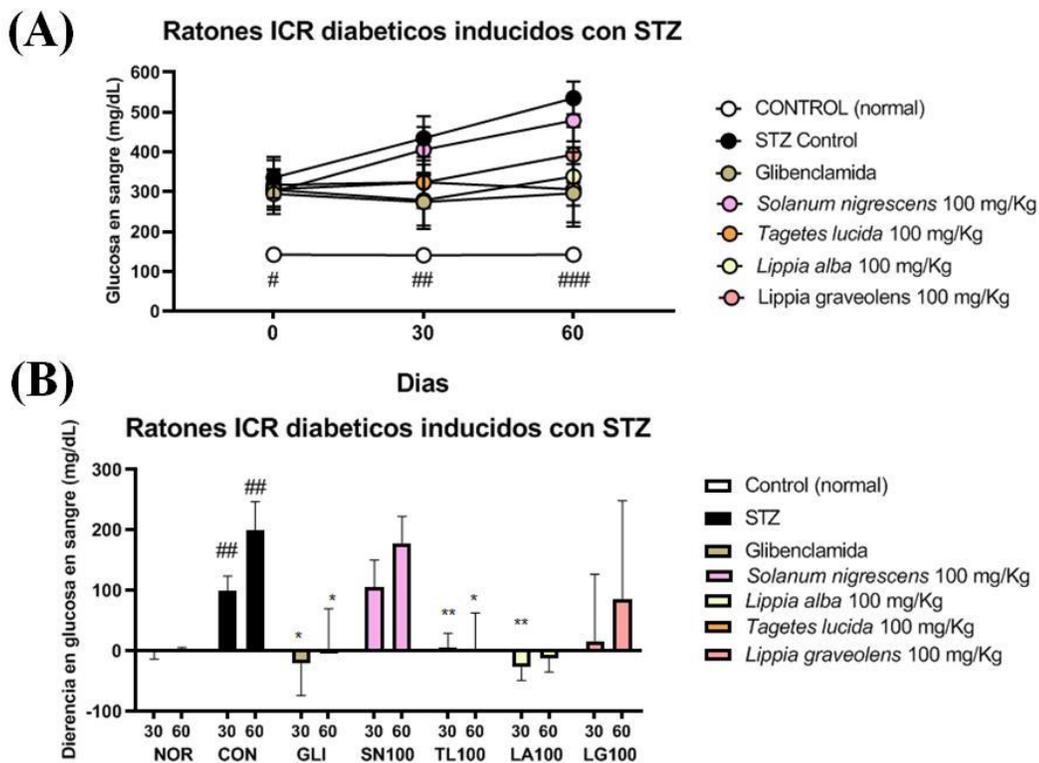


Figura 9. Glucosa en sangre en la progresión diabética de 10 semanas en ratones macho durante el periodo de administración de extractos candidatos (n=8). (A) Valores de glucosa en sangre posterior a la inducción de 4 semanas con estreptozotocina tras 60 días de administración de tratamientos. (B) Diferenciales de glucosa comparados con los valores iniciales (día 0). La administración oral de glibenclamida, *T. lucida* y *L. alba* redujeron significativamente el aumento

en la progresión de glucosa en diabetes. Los datos fueron expresados como media \pm error estándar de la media. Los valores de $##P < 0.01$ fueron considerados significativos comparados con el grupo control no diabético (normal). Los valores de $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ fueron considerados significativos comparados con el grupo control STZ.

La evaluación en creatinina sérica, orina de nitrógeno de urea, proteína excretada, y excreción de glucosa, demostró que *T. lucida* protegió significativamente la elevación éstos valores comparado con el grupo control diabético de forma similar al control positivo hipoglicemiante glibenclamida (**Figuras 11-13**). A su vez los extractos de *S. nigrescens* y *L. graveolens* protegieron significativamente ante la elevación de urea en orina, y *L. alba* ante la elevación de proteína en orina comparado con el grupo control diabético.

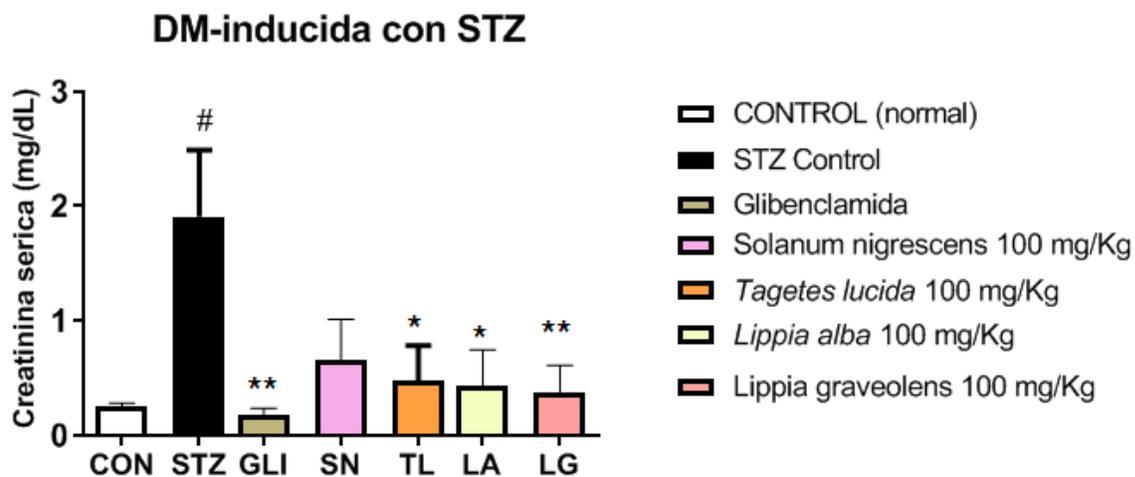


Figura 10. Creatinina sérica después de 60 días de progresión de diabetes inducida por estreptozotocina (STZ) en ratones macho tras administración oral de extractos candidatos (n=8). Valores de creatinina sérica posterior a la inducción de 4 semanas con estreptozotocina y posterior a los 60 días de administración de tratamientos. Los datos fueron expresados como media \pm error estándar de la media. Los valores de $#P < 0.05$ fueron considerados significativos comparados con el grupo control no diabético (normal). Los valores de $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ fueron considerados significativos comparados con el grupo control STZ.

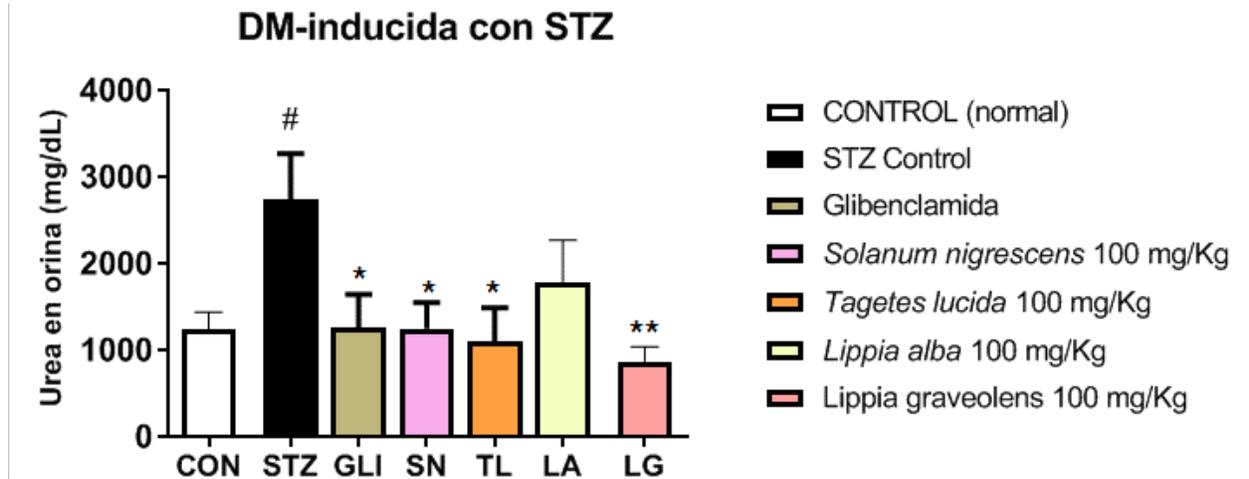


Figura 11. Urea en orina después de 60 días de progresión de diabetes inducida por estreptozotocina (STZ) en ratones macho tras administración oral de extractos candidatos (n=8). Valores de urea en orina posterior a la inducción de 4 semanas con estreptozotocina y posterior a los 60 días de administración de tratamientos. Los datos fueron expresados como media \pm error estándar de la media. Los valores de # $P < 0.05$ fueron considerados significativos comparados con el grupo control no diabético (normal). Los valores de * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ fueron considerados significativos comparados con el grupo control STZ.

DM-inducida con STZ. Proteína en orina

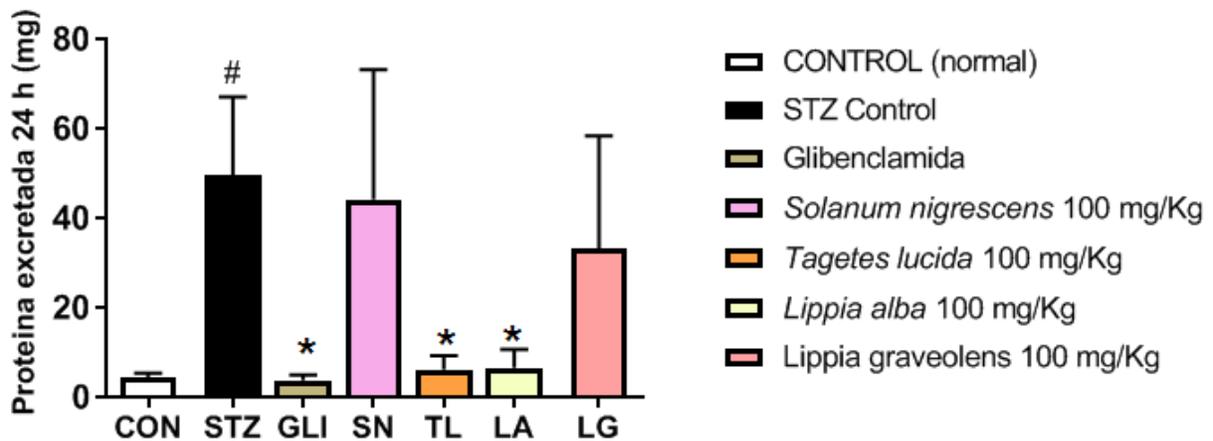


Figura 12. Proteína en orina excretada durante 24h después de 60 días de progresión de diabetes inducida por estreptozotocina (STZ) en ratones macho tras administración oral de extractos candidatos (n=8). Valores de proteína en orina posterior a la inducción de 4 semanas con STZ y

posterior a los 60 días de administración de tratamientos. Los datos fueron expresados como media \pm error estándar de la media. Los valores de $\#P < 0.05$ fueron considerados significativos comparados con el grupo control no diabético (normal). Los valores de $*P < 0.05$ fueron considerados significativos comparados con el grupo control STZ.

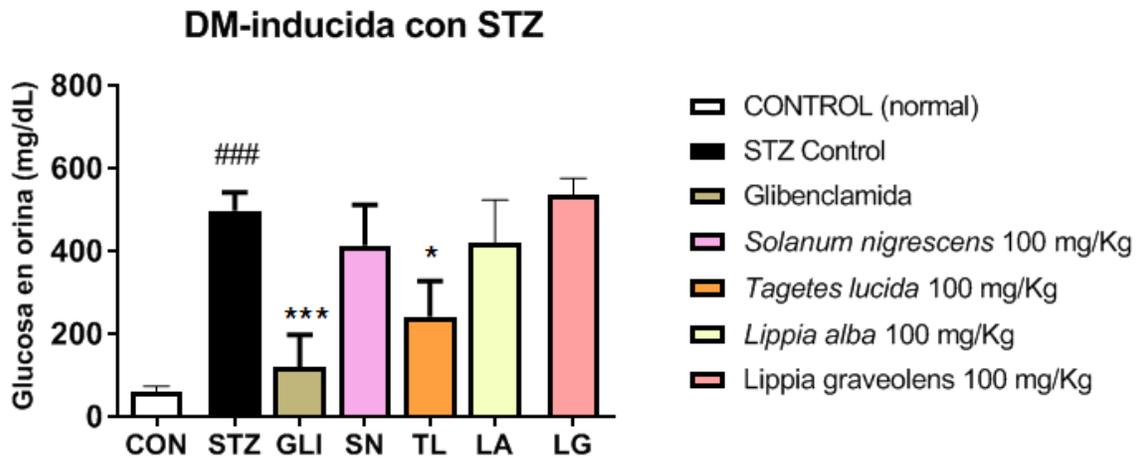


Figura 13. Glucosa en orina después de 60 días de progresión de diabetes inducida por estreptozotocina (STZ) en ratones macho tras administración oral de extractos candidatos (n=8). Valores de glucosa en orina posterior a la inducción de 4 semanas con estreptozotocina y posterior a los 60 días de administración de tratamientos. Los datos fueron expresados como media \pm error estándar de la media. Los valores de $\#P < 0.05$ fueron considerados significativos comparados con el grupo control no diabético (normal). Los valores de $*P < 0.05$, $***P < 0.001$ fueron considerados significativos comparados con el grupo control STZ.

15.3. Daño renal inducido por deshidratación por calor

Preliminarmente se realizó una validación de distintas exposiciones a calor de 37°C con privación de agua en incubadora en ratas Wistar macho de 7 semanas (n=3) por 5 días consecutivos durante 5 semanas con el fin de establecer los valores esperados, evaluar los reactivos e instrumentos utilizados (**Figura 14**). Se estableció un tiempo de exposición de 1.5 horas de deshidratación por calor para los futuros experimentos debido a que se produce una alteración de parámetros creatinina y urea en orina y ausencia de efectos nocivos producidos a tiempos más prolongados (2h) comparado con control no expuesto a calor privado de agua (datos no mostrados).

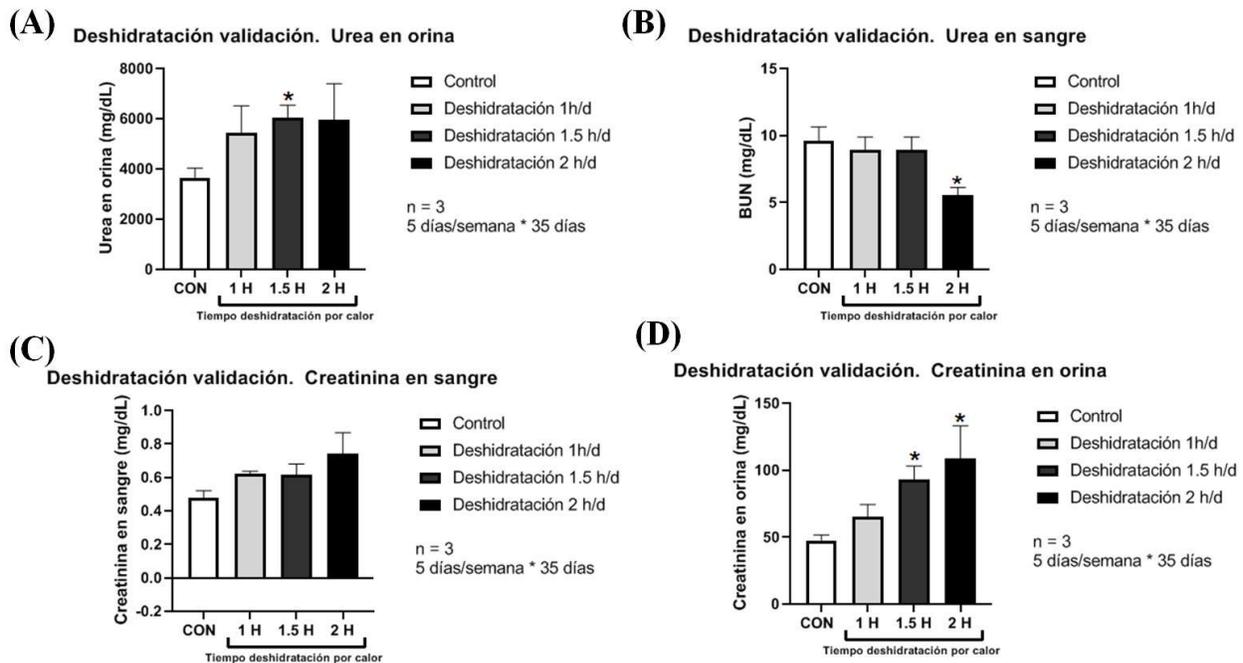


Figura 14. Evaluación de distintos tiempos de exposición por calor en ratas macho de 7 semanas (n=3). Exposición a calor durante 1h, 1.5h y 2h durante 5 días por semana en un periodo de 5 semanas produjo alteración en los valores de urea en orina (A), urea en sangre (B), creatinina en sangre (C) y creatinina en orina (D). Los datos fueron expresados como media ± error estándar de la media.

Posteriormente, se procedió a evaluar la actividad nefroprotectora del extracto candidato seleccionado para este modelo, *T. lucida*, en ratas macho de 7 semanas (n=8) en el modelo de deshidratación por calor. La evaluación de pesos corporales reveló una reducción de los valores promedio producida por deshidratación por calor desde el día 19, la cual fue ligeramente mayor en el grupo administrado con *T. lucida* (**Figura 15**).

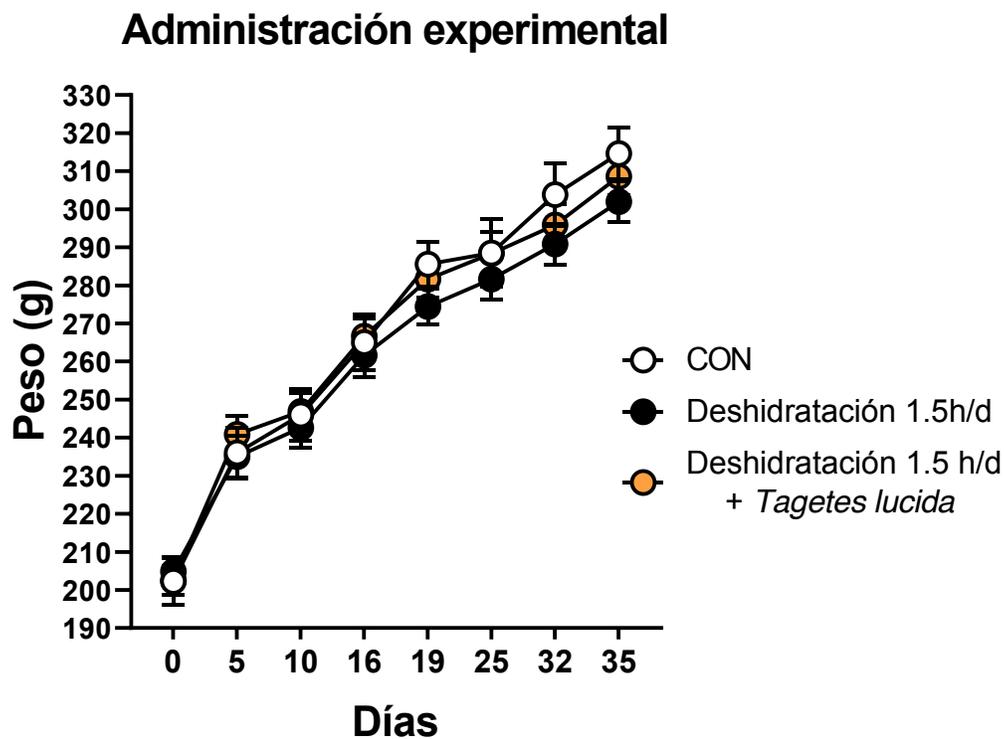


Figura 15. Peso corporal tras exposición por calor con privación de agua 1.5 h diarias 5 días a la semana por 5 semanas en ratas Wistar (n=3). Cambios en peso corporal durante 5 semanas de deshidratación por calor a 37 °C tras administración oral de *Tagetes lucida* comparada con grupo control (vehículo) y grupo sin hidratación pero sin exposición calor. Los datos fueron expresados como media \pm error estándar de la media.

La evaluación en orina de nitrógeno de urea demostró que *T. lucida* protegió significativamente la elevación éstos valores comparado con el grupo control deshidratado por calor privado de agua (**Figura 16**). Sin embargo, no se observaron alteraciones en los valores de nitrógeno de urea en sangre y proteína en sangre (**Figuras 17-18**). Administración de *T. lucida* mostró menores valores en creatinina en plasma y orina comparados con el grupo control deshidratado con calor comparable a los valores medios del grupo control normal (**Figuras 19-20**).

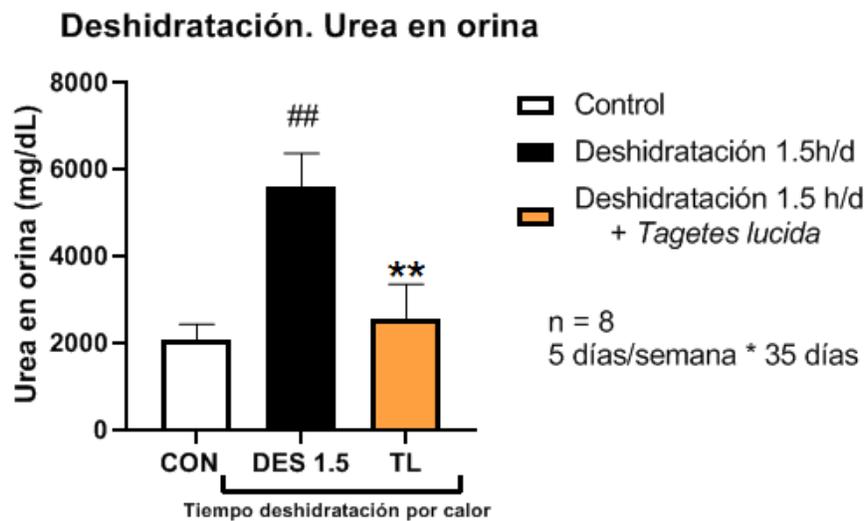


Figura 16. Urea en orina tras exposición por calor 1.5 h diarias 5 días a la semana por 5 semanas tras administración oral de *Tagetes lucida* (n=8). Deshidratación por calor con privación de agua incremento significativamente la urea en orina comparado con privación de agua sin calor. El extracto de *T. lucida* suprimió significativamente la elevación de urea en orina. Los datos fueron expresados como media \pm error estándar de la media. Los valores de $\#P < 0.05$ fueron considerados significativos comparados con el grupo control privado de agua pero no expuesto a calor (normal). Los valores de $**P < 0.001$ fueron considerados significativos comparados con el grupo deshidratado por calor y privado de agua.

Deshidratación. Urea en sangre

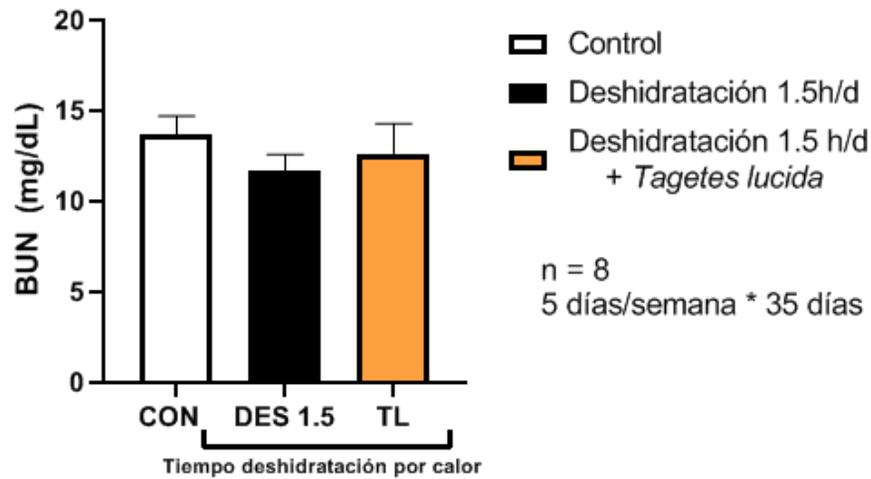


Figura 17. Urea en sangre (BUN) tras exposición por calor 1.5 h diarias 5 días a la semana por 5 semanas tras administración oral de *Tagetes lucida* (n=8). Deshidratación por calor no tuvo cambios significativos en nitrógeno de urea en sangre. Los datos fueron expresados como media \pm error estándar de la media.

Deshidratación proteína en sangre

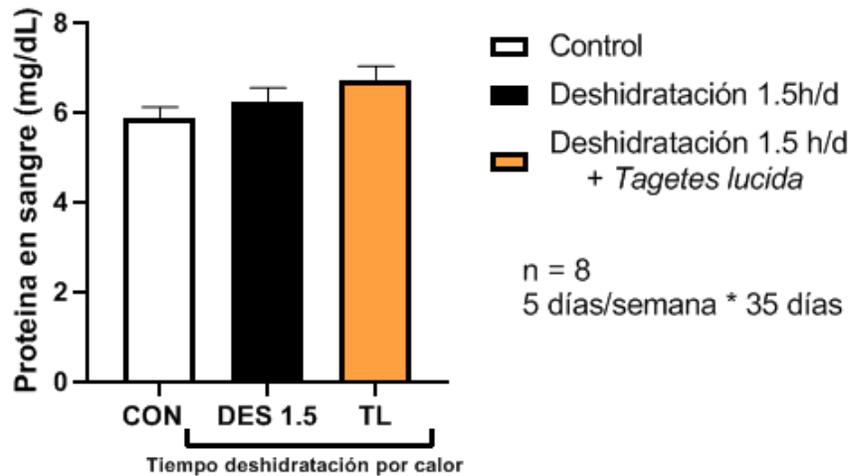


Figura 18. Proteína en sangre tras exposición por calor 1.5 h diarias 5 días a la semana por 5 semanas tras administración oral de *Tagetes lucida* (n=8). Deshidratación por calor no tuvo cambios significativos en proteína en sangre. Los datos fueron expresados como media \pm error estándar de la media.

Deshidratación. Creatinina en orina

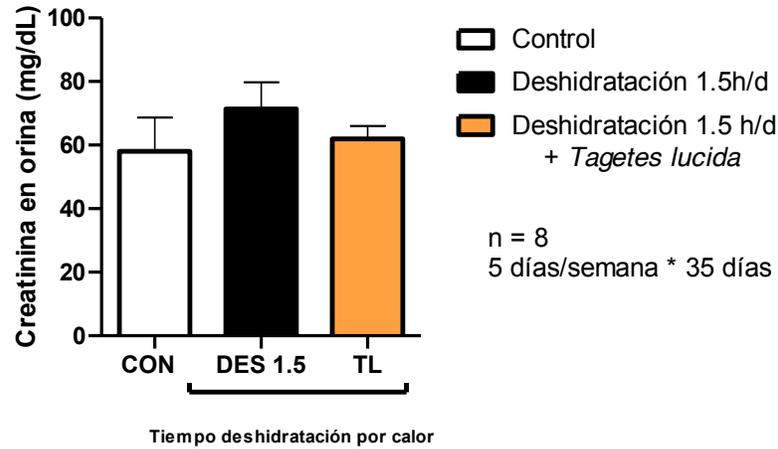


Figura 19. Creatinina en orina tras exposición por calor 1.5 h diarias 5 días a la semana por 5 semanas tras administración oral de *Tagetes lucida* (n=8). Deshidratación por calor no tuvo cambios significativos en creatinina en orina. Los datos fueron expresados como media \pm error estándar de la media.

Deshidratación. Creatinina en plasma

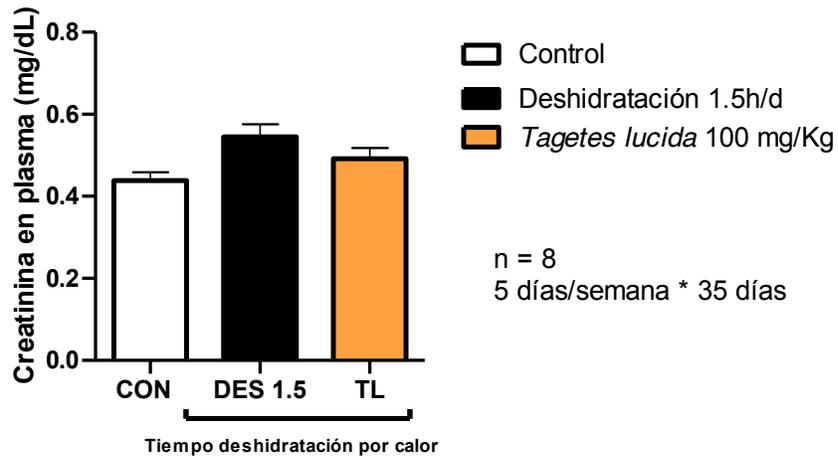


Figura 20. Creatinina en sangre tras exposición por calor 1.5 h diarias 5 días a la semana por 5 semanas tras administración oral de *Tagetes lucida* (n=8). Deshidratación por calor no tuvo cambios significativos en creatinina en sangre. Los datos fueron expresados como media \pm error estándar de la media

16. Análisis y discusión de resultados

Mundialmente la nefropatía es la complicación más frecuente producida por diabetes, con 27.8% de incidencia, seguida de pie diabético con 22.9%, y seguida de problemas visuales con 18.9% (Deshpande, Harris-Hayes, & Schootman, 2008). Esto lo hace una complicación relevante a nivel mundial, sobre todo en países donde el índice de Diabetes tiende a aumentar, como lo es en Guatemala (Bream et al., 2018). Existe una epidemia regional en Guatemala de ERC de Etiología Desconocida en personas jóvenes, en trabajadores agrícolas principalmente en la costa sur del país, donde no existe un modelo *in vivo* lo suficientemente explorado para estudiarla. Es por ello de suma importancia establecer un modelo de daño renal con estas características, de utilidad práctica en tamizaje farmacológico, que posea validez con un mecanismo fisiopatológico de deshidratación. Es por ello que siendo Guatemala un país que presenta dentro de las principales diez causas de mortalidad la insuficiencia renal crónica, además de poseer una patología de etiología desconocida, es importante buscar nuevos tratamientos que se puedan asociar a prevenir y disminuir el daño renal o sus complicaciones y los productos naturales podrían representar una opción viable para su incorporación en el sistema de salud pública y apoyar a la gran cantidad de trabajadores y población de las comunidades rurales afectadas por esta epidemia. Se requiere un modelo *in vivo* confiable que produzca una enfermedad estable dentro de un período de tiempo relativamente corto para las intervenciones relacionadas con la ERC.

Inicialmente en este estudio se abordó un modelo daño renal agudo por gentamicina que logrará brindar información preliminar del potencial farmacológico de extractos vegetales. La gentamicina (GM) es un antibiótico aminoglucósido comúnmente utilizado para abordar infecciones bacteriana gramnegativas. Debido al alto flujo sanguíneo relativo, el riñón es propenso al daño inducido por fármacos. GM es una de las principales causas de nefrotoxicidad inducida por fármacos, ya que es todavía es ampliamente utilizada en clínica y muy eficiente en el tratamiento de infecciones. Estos efectos adversos han permitido el establecimiento de modelos animales basados en daño renal. Dosis de GM en roedores de 40 a 200 mg/Kg administradas vía intraperitoneal durante 4 a 10 días pueden inducir insuficiencia renal aguda (Abdel-Azeem, Hegazy, Zeidan, Ibrahim, & El-Sayed, 2017; Arjinajarn et al., 2016; Bae et al., 2013; El-Kashef,

El-Kenawi, Suddek, & Salem, 2015; Guo et al., 2013; P. Liu et al., 2014; Mahmoud, 2017; Morales et al., 2010; Pedraza-Chaverri et al., 2004; 2018). Este modelo agudo se caracteriza por niveles elevados de urea y creatinina séricas, disminución de la tasa de filtración glomerular, lesiones tubulares y fibrosis (Al-Shabanah et al., 2009; Romero, Perez, Chavez, Parra, & Durante, 2009). En este estudio, se corroboró con datos experimentales algunos de estas alteraciones metabólicas, como aumento de creatinina sérica, aumento de urea sérica y urinaria. Esto se debe a que al comienzo del proceso de daño por GM, cuando no hay una obstrucción tubular significativa, se pueden detectar un aumento en los niveles séricos de urea y creatinina, lo que apunta a una reducción en la filtración glomerular. En ausencia de una obstrucción marcada de la nefrona, el aumento observado en el nivel de creatinina en plasma solo puede explicarse por la reducción en la filtración glomerular.

En este estudio se reporta por vez primera el potencial nefroprotector de las 4 especies vegetales evaluadas, siendo *Tagetes lucida* quien presentó mayor evidencia en distintos de los parámetros evaluados. Esta especie ha sido poco explorada farmacológicamente, sin embargo se ha sugerido su actividad antiinflamatoria que podría ser relevante en el proceso fisiopatológico producido por GM. Cabe resaltar que en el estudio de exploración, se evaluaron más extractos (datos no reportados), y se seleccionaron estos candidatos para ser presentados. Sin embargo, a pesar de que *T. lucida* es el candidato con mayor evidencia, *L. alba* y *L. graveolens* muestran potencial para seguir siendo estudiados en daño renal.

Entre los modelos animales diabéticos más utilizados se encuentran por inducción a partir de administración intraperitoneal de estreptozotocina (STZ) como modelo de DMT1, al ser tóxica para las células β pancreáticas produciendo deficiencia de insulina (Wilson & Leiter, 1990). En ratones, la administración intraperitoneal de STZ es a partir de una dosis alta, preferentemente en ayuno y acompañada de suplementación oral de glucosa en los primeros días, o múltiples dosis a menor dosis para disminuir el índice de mortalidad en la inducción diabética. Esto fue realizado experimentalmente de acuerdo a protocolos previamente validados de complicaciones de

diabetes. Diferentes cepas de roedores se usan a partir de inducción con STZ para producir daño renal, con significativas diferencias en la lesión renal, albuminuria y cambios histológicos en diferentes cepas. Los ratones C57BL/6 son una de las cepas más utilizada en la investigación preclínica, sin embargo, esta cepa es relativamente resistente al desarrollo de daño renal en modelos experimentales de enfermedades renales, incluida la nefropatía diabética (Breyer et al., 2005). Los ratones CD1 inducidos por STZ desarrollan después de 6 meses albuminuria, daño renal crónico asociado con fibrosis tubulointersticial y disminución de la función renal, presentado valores aumentados de creatinina sérica y urea en sangre y orina, al igual que proteinuria (Sugimoto, Grahovac, Zeisberg, & Kalluri, 2007). Las ratas diabéticas inducidas por STZ también se han utilizado para estudiar la nefropatía diabética. Ratas macho Sprague-Dawley o Wistar mediante una sola inyección intravenosa de STZ (50-70 mg/Kg) ha demostrado albuminuria aumentada a las 24 semanas después de la inducción de DM, sin embargo, no se ha observado acumulación grave de matriz mesangial, lesiones nodulares en los glomérulos, daño severo de las células tubulares o fibrosis tubulointersticial (Hayashi et al., 2001; Kitada et al., 2003). Es por ello que cambios morfológicos inducidos por hiperglucemia en los riñones de roedores han sido sugeridos al ratón como un mejor modelo, siendo los ratones CD1 diabéticos inducidos por STZ el que presenta patologías asociadas con la nefropatía diabética humana avanzada. Es por ello, que ésta cepa fue utilizada experimentalmente.

Diferentes modelos de roedores se han utilizado para evaluar el impacto de la deshidratación en el daño renal crónico, con una intervención a partir de privación de agua y exposición a calor. Un estudio en ratones C57BL/6 J evaluó el efecto de deshidratación por calor, proponiendo un modelo con intervalos de deshidratación por calor durante 30 min/h durante 7 horas en 5 días por semana, comparando hidratación durante los 30 minutos de descanso entre periodos de deshidratación contra la privación de agua en este periodo (Roncal Jimenez et al., 2013). Este estudio demostró en ratones sin hidratación durante los 30 minutos de descanso, una mayor pérdida de peso por deshidratación y un significativo aumento en los niveles de creatinina sérica, presión arterial, y activación de la vía del polirol (sorbitol en corteza renal, fructuosa en corteza renal, ácido úrico en corteza renal), comparado con los ratones que fueron hidratados durante las

horas de deshidratación por calor. Esto sugiere que en la construcción del modelo, el daño renal es más pronunciado al privar a los animales de hidratación. En otros estudios, este modelo, elaborado con intervalos de deshidratación por calor durante 30 min/h durante 7-8 horas (con privación de agua en periodos de descanso) en 5 días por semana, ha evidenciado aumento en la creatinina sérica, lesiones en el túbulo proximal (con pérdida de células en el borde en cepillo) e infiltración de macrófagos y fibrosis renal temprana tanto en la corteza renal como en la médula externa (Milagres et al., 2018; Roncal-Jimenez et al., 2017). También se han observado cambios glomerulares. Estos modelos con deshidratación aguda relativamente severa, resultan aproximadamente en un 14% de pérdida de peso diaria al final de cada período de deshidratación por calor, con un impacto en su reducción de peso a las 5 semanas de aproximadamente 4% comparadas con control. Esto está acompañado de un marcado aumento de la osmolalidad sérica en asociación con un aumento de la coceptina sérica y un aumento de la osmolalidad urinaria y creatinina urinaria, consistente con la concentración urinaria. Esto se encuentra en concordancia a lo observado en este estudio en la fase de validación y en la fase de experimentación, donde sorprendentemente se observan niveles elevados de creatinina urinaria, lo cual fue contrario a lo observado experimentalmente en los modelos de nefrotoxicidad y nefropatía diabética, donde la creatinina urinaria se encuentra generalmente disminuida. Sin embargo, la administración de *T. lucida* mostró una tendencia en reducir los valores promedio comparados con el grupo control. Estudios en ratas Wistar expuestas a deshidratación por calor 1 hora diaria con inmediata rehidratación posterior, han confirmado daño renal después de 4 semanas, al evidenciar aumento en los niveles de coceptina, aumento en la expresión de receptores de vasopresina, expresión de Lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL) (Garcia-Arroyo et al., 2019; Garcia-Arroyo et al., 2017; Sanchez-Lozada et al., 2018). Similarmente, este daño ha confirmado la activación de la vía de poliol observada en ratones, al presentar niveles más altos de fructosa, sorbitol, ácido úrico en corteza renal, peroxidación lipídica y proteica, junto a un aumento en expresión de aldosterona reductasa, sorbitol deshidrogenasa, fosfoquinasa y xantina oxidasa. En este estudio se brinda un aporte a los valores parámetros metabólicos observados en deshidratación por calor.

Al integrar todos los resultados obtenidos en los distintos modelos, este estudio preliminar sugiere que la utilización de modelos alternativos de tamizaje de evaluación de daño renal le complementa soporte a la búsqueda de candidatos en deshidratación por calor. Este estudio se planteó una plataforma de búsqueda de candidatos evaluando su actividad en nefrotoxicidad inducida por gentamicina y nefropatía diabética inducida por estreptozotocina, que propuso al candidato con mayor evidencia, *T. lucida*, el cual presentó ligera evidencia de protección en deshidratación por calor. Es necesario seguir haciendo investigación en la capacidad de predicción de nefroprotección, ya que candidatos reportados en la literatura para proteger el riñón *in vivo* podrían ser evaluados en este modelo de deshidratación por calor. Debido a condiciones excepcionales en la ejecución de este proyecto (COVID-19), no se pudo evaluar la histopatología de los riñones aislados. Sin embargo, en un futuro próximo se analizarán para darle soporte a la evidencia encontrada, así mismo como la evaluación de diferentes dosis de *T. lucida* para corroborar resultados.

17. Conclusiones

1. Se obtuvieron 3 extractos con potencial protección en riñón mediante tamizaje farmacológico en modelos in vivo de daño renal agudo (nefrotoxicidad) y crónico (diabetes), *Tagetes lucida*, *Lippia graveolens* y *Lippia alba*.
2. Se establecieron como características sensibles para evaluar daño renal en modelos animales las siguientes: 100 mg/Kg I.P. de gentamicina por 8 días de administración en ratas Wistar macho, 110 mg/kg I.P de estreptozotocina (en dos dosis) durante 90 días después de la inducción de progresión diabética en ratones macho CD-1, y 1.5 h de deshidratación por calor durante 5 días a la semana por 5 semanas en ratas Wistar macho.
3. La administración oral de 100 mg/Kg de *T. lucida* redujo significativamente la elevación de los niveles de creatinina sérica, urea en orina y sangre inducida por administración de GM.
4. La administración oral de 100 mg/Kg de *L. alba* y *L. graveolens* redujeron significativamente la elevación de los niveles de creatinina y urea en plasma, inducida por GM.
5. Después de 30 y 60 días de administración oral de *L. alba* y *T. lucida* se observó una reducción significativa de los aumentos en los niveles de glucosa en sangre comparados con los valores basales en ratones diabéticos.
6. La administración oral de 100 mg/Kg de *T. lucida* suprimió significativamente la elevación de creatinina en plasma, nitrógeno de urea en orina, proteína excretada, y excreción de glucosa.
7. Una exposición de 1.5-2 horas 5 veces por semana durante 5 semanas de deshidratación por calor produce una alteración de parámetros creatinina y urea en orina y plasma.
8. La administración oral de 100 mg/Kg de *T. lucida* posterior a cada deshidratación por calor suprimió significativamente la elevación de nitrógeno de urea en orina comparado con el grupo control deshidratado por calor privado de agua.

18. Impacto esperado

La enfermedad renal está asociada con una tremenda carga económica para Guatemala, debido a que el costo invertido para asistir a un paciente con enfermedad renal crónica es sumamente elevado. Inicialmente, el grupo de la sociedad que se beneficiaría de desarrollar un producto con actividad nefroprotectora producida por deshidratación por calor, serían los trabajadores agrícolas, principalmente en la costa sur del país, donde la epidemia regional de ERC de etiología desconocida es alta. Esto impactaría a nivel de prevención de futuros enfermos renales crónicos, además de proteger a un grupo joven de trabajadores de una enfermedad con índices de mortalidad sumamente altos. Sin embargo, debido a que las predicciones de cambio climático tienden a proyectar a elevar la temperatura en distintos sectores del país, el impacto podría proyectarse a la prevención de deshidratación por calor en un futuro próximo en distintas regiones del país. Así mismo, posteriormente tras la confirmación en distintos modelos se podría continuar el estudio en nefropatía diabética, que afecta a un elevado número de pacientes con ERC.

Estos estudios preliminares pretenden también atraer la inversión del sector empresarial involucrado en trabajo agrícola y de industria farmacéutica en el financiamiento de futuras investigaciones a nivel *in vitro* e *in vivo* para la búsqueda de alternativas enfocadas a la nefroprotección. Es necesario explorar distintas concentraciones, cambios histológicos, moleculares, diseño de formulación y la búsqueda de más candidatos, por lo que se espera que este estudio exploratorio atraiga inversión para promover la investigación de productos naturales nativos que puedan ser accesibles a la población.

19. Referencias

- Bao, Y.W., Yuan, Y., Chen, J.H., & Lin, W.Q. (2018). Kidney disease models: tools to identify mechanisms and potential therapeutic targets. *Zool Res*, 39(2), 72-86. doi: 10.24272/j.issn.2095-8137.2017.055
- Bardoux, P., Bichet, D.G., Martin, H., Gallois, Y., Marre, M., Arthus, M.F. (2003). Vasopressin increases urinary albumin excretion in rats and humans: involvement of V2 receptors and the renin-angiotensin system. *Nephrol Dial Transplant*, 18(3), 497-506. doi: 10.1093/ndt/18.3.497
- Bardoux, P., Martin, H., Ahloulay, M., Schmitt, F., Bouby, N., Trinh-Trang-Tan, M.M. (1999). Vasopressin contributes to hyperfiltration, albuminuria, and renal hypertrophy in diabetes mellitus: study in vasopressin-deficient Brattleboro rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(18), 10397-10402. doi: 10.1073/pnas.96.18.10397
- Barnett, L.M.A., & Cummings, B.S. (2018). Nephrotoxicity and Renal Pathophysiology: A Contemporary Perspective. *Toxicol Sci*, 164(2), 379-390. doi: 10.1093/toxsci/kfy159
- Boozari, M., & Hosseinzadeh, H. (2017). Natural medicines for acute renal failure: A review. *Phytother Res*, 31(12), 1824-1835. doi: 10.1002/ptr.5943
- Bouby, N., Bachmann, S., Bichet, D., & Bankir, L. (1990). Effect of water intake on the progression of chronic renal failure in the 5/6 nephrectomized rat. *Am J Physiol*, 258(4 Pt 2), F973-979. doi: 10.1152/ajprenal.1990.258.4.F973
- Bouby, N., & Fernandes, S. (2003). Mild dehydration, vasopressin and the kidney: animal and human studies. *Eur J Clin Nutr*, 57 Suppl 2, S39-46. doi: 10.1038/sj.ejcn.1601900
- Bream, K.D.W., Breyre, A., Garcia, K., Calgua, E., Chuc, J.M., & Taylor, L. (2018). Diabetes prevalence in rural Indigenous Guatemala: A geographic-randomized cross-sectional analysis of risk. *PLoS One*, 13(8), e0200434. doi: 10.1371/journal.pone.0200434
- Calvin, A.D., Misra, S., & Pflueger, A. (2010). Contrast-induced acute kidney injury and diabetic nephropathy. *Nat Rev Nephrol*, 6(11), 679-688. doi: 10.1038/nrneph.2010.116

- Cirillo, P., Gersch, M.S., Mu, W., Scherer, P.M., Kim, K.M., Gesualdo, L. (2009). Ketohexokinase-dependent metabolism of fructose induces proinflammatory mediators in proximal tubular cells. *J Am Soc Nephrol*, 20(3), 545-553. doi: 10.1681/ASN.2008060576
- De Silva, P.M., Mohammed Abdul, K.S., Eakanayake, E.M., Jayasinghe, S.S., Jayasumana, C., Asanthi, H.B. (2016). Urinary Biomarkers KIM-1 and NGAL for Detection of Chronic Kidney Disease of Uncertain Etiology (CKDu) among Agricultural Communities in Sri Lanka. *PLoS Negl Trop Dis*, 10(9), e0004979. doi: 10.1371/journal.pntd.0004979
- Deshpande, A.D., Harris-Hayes, M., & Schootman, M. (2008). Epidemiology of diabetes and diabetes-related complications. *Phys Ther*, 88(11), 1254-1264. doi: 10.2522/ptj.20080020
- Devarajan, P. (2006). Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol*, 17(6), 1503-1520. doi: 10.1681/ASN.2006010017
- Garcia-Arroyo, F.E., Cristobal, M., Arellano-Buendia, A.S., Osorio, H., Tapia, E., Soto, V. (2016). Rehydration with soft drink-like beverages exacerbates dehydration and worsens dehydration-associated renal injury. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 311(1), R57-65. doi: 10.1152/ajpregu.00354.2015
- Glaser, J., Lemery, J., Rajagopalan, B., Diaz, H.F., Garcia-Trabanino, R., Taduri, G. (2016). Climate Change and the Emergent Epidemic of CKD from Heat Stress in Rural Communities: The Case for Heat Stress Nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*, 11(8), 1472-1483. doi: 10.2215/CJN.13841215
- Hakim, F.A., & Pflueger, A. (2010). Role of oxidative stress in diabetic kidney disease. *Med Sci Monit*, 16(2), RA37-48.
- Johnson, R.J., Rodriguez-Iturbe, B., Roncal-Jimenez, C., Lanaspa, M.A., Ishimoto, T., Nakagawa, T. (2017). Hyperosmolarity drives hypertension and CKD--water and salt revisited. *Nat Rev Nephrol*, 10(7), 415-420. doi: 10.1038/nrneph.2014.76

- Johnson, R.J., & Sanchez-Lozada, L.G. (2013). Chronic kidney disease: Mesoamerican nephropathy--new clues to the cause. *Nat Rev Nephrol*, 9(10), 560-561. doi: 10.1038/nrneph.2013.174
- Johnson, R.J., Stenvinkel, P., Jensen, T., Lanaspa, M.A., Roncal, C., Song, Z. (2016). Metabolic and Kidney Diseases in the Setting of Climate Change, Water Shortage, and Survival Factors. *J Am Soc Nephrol*, 27(8), 2247-2256. doi: 10.1681/ASN.2015121314
- Laux, T.S., Barnoya, J., Cipriano, E., Herrera, E., Lopez, N., Polo, V.S. (2016). Prevalence of chronic kidney disease of non-traditional causes in patients on hemodialysis in southwest Guatemala. *Rev Panam Salud Publica*, 39(4), 186-193.
- Laux, T.S., Barnoya, J., Guerrero, D.R., & Rothstein, M. (2015). Dialysis enrollment patterns in Guatemala: evidence of the chronic kidney disease of non-traditional causes epidemic in Mesoamerica. *BMC Nephrol*, 16, 54. doi: 10.1186/s12882-015-0049-x
- Li, Q.M., Chena, H.R., Zha, X.Q., Lu, C.Q., Pan, L.H., & Luo, J.P. (2017). Renoprotective effect of Chinese chive polysaccharides in adenine-induced chronic renal failure. *Int J Biol Macromol*, 106, 988-993. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.08.101
- Ludwig, T., & Oberleithner, H. (2004). Platinum complex toxicity in cultured renal epithelia. *Cell Physiol Biochem*, 14(4-6), 431-440. doi: 10.1159/000080359
- Luyckx, V.A., Tonelli, M., & Stanifer, J.W. (2018). The global burden of kidney disease and the sustainable development goals. *Bull World Health Organ*, 96(6), 414-422D. doi: 10.2471/BLT.17.206441
- Milagres, T., Garcia-Arroyo, F.E., Lanaspa, M.A., Garcia, G., Ishimoto, T., Andres-Hernando, A. (2018). Rehydration with fructose worsens dehydration-induced renal damage. *BMC Nephrol*, 19(1), 180. doi: 10.1186/s12882-018-0963-9
- Miller, R.P., Tadagavadi, R.K., Ramesh, G., & Reeves, W.B. (2010). Mechanisms of Cisplatin nephrotoxicity. *Toxins (Basel)*, 2(11), 2490-2518. doi: 10.3390/toxins2112490

- Nugent, R.A., Fathima, S.F., Feigl, A.B., & Chyung, D. (2011). The burden of chronic kidney disease on developing nations: a 21st century challenge in global health. *Nephron Clin Pract*, 118(3), c269-277. doi: 10.1159/000321382
- Rodriguez Salgueiro, S., & Gonzalez Nunez, L. (2016). Animal models mimicking aminoglycoside-induced renal damage. *J Nephroarmacol*, 5(1), 1-3.
- Roncal-Jimenez, C., Lanaspá, M.A., Jensen, T., Sanchez-Lozada, L.G., & Johnson, R.J. (2015). Mechanisms by Which Dehydration May Lead to Chronic Kidney Disease. *Ann Nutr Metab*, 66 Suppl 3, 10-13. doi: 10.1159/000381239
- Roncal-Jimenez, C.A., Milagres, T., Andres-Hernando, A., Kuwabara, M., Jensen, T., Song, Z. (2017). Effects of exogenous desmopressin on a model of heat stress nephropathy in mice. *Am J Physiol Renal Physiol*, 312(3), F418-F426. doi: 10.1152/ajprenal.00495.2016
- Roncal Jimenez, C.A., Ishimoto, T., Lanaspá, M.A., Rivard, C.J., Nakagawa, T., Ejaz, A.A. (2013). Fructokinase activity mediates dehydration-induced renal injury. *Kidney Int*, 86(2), 294-302. doi: 10.1038/ki.2013.492
- Song, Z., Roncal-Jimenez, C.A., Lanaspá-García, M.A., Oppelt, S.A., Kuwabara, M., Jensen, T. (2017). Role of fructose and fructokinase in acute dehydration-induced vasopressin gene expression and secretion in mice. *J Neurophysiol*, 117(2), 646-654. doi: 10.1152/jn.00781.2016
- Sun, H., Yang, H., Ruan, H., Li, W., He, X., Wang, L. (2018). The Protective Effect of Sika Deer Antler Protein on Gentamicin-Induced Nephrotoxicity in Vitro and in Vivo. *Cell Physiol Biochem*, 50(3), 841-850. doi: 10.1159/000494471
- Swenberg, J.A. (1993). Alpha 2u-globulin nephropathy: review of the cellular and molecular mechanisms involved and their implications for human risk assessment. *Environ Health Perspect*, 101 Suppl 6, 39-44. doi: 10.1289/ehp.93101s639
- Torres, V.E. (2009). Vasopressin in chronic kidney disease: an elephant in the room? *Kidney Int*, 76(9), 925-928. doi: 10.1038/ki.2009.325

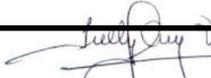
- Weiner, D.E., McClean, M.D., Kaufman, J.S., & Brooks, D.R. (2013). The Central American epidemic of CKD. *Clin J Am Soc Nephrol*, 8(3), 504-511. doi: 10.2215/CJN.05050512
- Wesseling, C., Crowe, J., Hogstedt, C., Jakobsson, K., Lucas, R., & Wegman, D.H. (2014). Resolving the enigma of the mesoamerican nephropathy: a research workshop summary. *Am J Kidney Dis*, 63(3), 396-404. doi: 10.1053/j.ajkd.2013.08.014
- Wolf, J.P., Nguyen, N.U., Dumoulin, G., & Berthelay, S. (1992). Influence of hypertonic monosaccharide infusions on the release of plasma arginine vasopressin in normal humans. *Horm Metab Res*, 24(8), 379-383. doi: 10.1055/s-2007-1003340
- Wyatt, C.M., & Reeves, W.B. (2017). The sweetest thing: blocking fructose metabolism to prevent acute kidney injury? *Kidney Int*, 91(5), 998-1000. doi: 10.1016/j.kint.2017.03.004

Listado de los integrantes del equipo de investigación (en una sola hoja)

Contratados por contraparte y colaboradores

Listado de los integrantes del equipo de investigación (en una sola hoja)

Contratados por contraparte y colaboradores

Nombre	Firma
Dra. Sully Cruz	
Dr. Cristian González	
Dra. Jazzel Zea	
Dra. Elena Chang	

Contratados por la Dirección General de Investigación

Nombre	Categoría	Registro de Personal	Pago		Firma
			SI	NO	
Rodrigo Castañeda	Coordinador/ Investigador	20091173	X		
Lic. Vinicio García	Investigador	20060301		X	
Br. Caroline Aldana	Auxiliar II	20200570		X	

Guatemala 26 de febrero de 2021.



Rodrigo Castañeda, PhD
Coordinador del Proyecto de Investigación



Dra. Hilda Elena Valencia M. de Abril
Coordinadora
Programa Universitario de Investigación
Interdisciplinaria en Salud

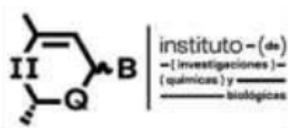


Ing. MARN (Julio Rufino) Salazar Pérez
Coordinador General de Programas
Digi USAC

Ing. Agr. Julio Rufino Salazar
Coordinador General de Programas



USAC
TRICENTENARIA
Universidad de San Carlos de Guatemala



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS Y BIOLÓGICAS

REF.IIQB.81.02.2021

Guatemala, 26 de febrero del 2021

Señor Director
Dr. Félix Alan Douglas Aguilar Carrera
Director General de Investigación
Universidad de San Carlos de Guatemala

Señor Director:

Con un cordial saludo me dirijo a usted para adjuntar el informe final del proyecto: **“Evaluación nefroprotectora de extractos vegetales en modelos in vivo de daño renal inducido por nefrotoxicidad, diabetes y deshidratación”** con código B9-2020, coordinado por el **Dr. Rodrigo Castañeda Molina** y avalado por el Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Este informe final fue elaborado con base en la guía de presentación de la Dirección General de Investigación, el cual fue revisado su contenido en función del protocolo aprobado, por lo que esta unidad de investigación da la aprobación y aval correspondiente.

Asimismo, el coordinador del proyecto, se compromete a dar seguimiento y cumplir con el proceso de revisión y edición establecido por DIGI del informe final y del manuscrito científico. El manuscrito científico debe enviarse, por el coordinador del proyecto, para publicación, al menos, en una revista de acceso abierto (Open Access) indexada y arbitrada por expertos en el tema investigado.

Sin otro particular, suscribo atentamente.

Dr. Rodrigo Castañeda Molina
Coordinador del Proyecto

“Id y enseñad a todos”



Dra. María Eunice Enriquez Cottón
Directora

Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia



c.c. archivo

MEEC/tvch.