



**Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ciencias Biológicas**

**LA ADMINISTRACIÓN DEL SIMBIÓTICO  
*LACTOBACILLUS BULGARICUS* 6C3, INULINA Y  
FRUCTOOLIGOSACÁRIDO REDUCE LA PROGRESIÓN  
DE LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA EN EL  
MODELO MURINO**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Biológicas de la  
Universidad de Concepción para optar al grado de Magíster en  
Ciencias con Mención Microbiología

Por: ALONSO LEANDRO JEREZ MORALES  
Profesor Guía: APOLINARIA GARCÍA CANCINO

Junio del 2020  
Concepción, Chile,

Esta tesis ha sido realizada en el Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana,  
Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de  
concepción.

Profesor Guía

---

Dr. Apolinaria García Cancino  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:



---

Dr. Jorge Toledo Alonso  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

---

Dr. Liliana Lamperti Fernández  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

---

Dr. Italo Fernández Fonseca  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

Director de Programa

---

Dr. Gerardo González Rocha  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

## TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	2
3.1 Epidemiología de la ERC.....	4
3.2 Terapias para disminuir la progresión de ERC.....	6
3.3 Moléculas de Retención Urémica.....	9
3.4 Efecto de la disbiosis en el riñón.....	12
3.5 Terapias con probióticos para evitar la progresión de ERC.....	16
3.6 Pregunta de investigación.....	18
3.7 Hipótesis.....	18
3.8 Objetivo general.....	19
3.9 Objetivos específicos.....	19
4. MATERIALES Y MÉTODO.....	20
4.1 Cepas bacterianas como tratamiento probiótico.....	20
4.2 Selección del tratamiento a administrar.....	20
4.3 Animales.....	21
4.4 Desarrollo del simbiótico y protocolo de experimentación.....	22
4.5 Análisis hematológico.....	23
4.6 Medición de la concentración de creatinina e IS.....	24
4.7 Análisis histológico.....	24
4.8 Análisis estadístico.....	25

5.	RESULTADOS.....	26
5.1	Efecto del cultivo de ambas cepas en la concentración de IS y pCr..	26
5.2	La administración del simbiótico disminuye creatinina e IS en sangre de las ratas.....	28
5.3	Los análisis histológicos muestran que la administración del simbiótico disminuyo la progresión de ERC.....	31
6.	DISCUSIÓN.....	31
7.	CONCLUSIONES.....	37
8.	FINANCIAMIENTO.....	38
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Tabla 5.1</b> Disminución de IS al inicio del experimento y luego de 48 horas de cultivo por las cepas <i>L. bulgaricus</i> 6c3, <i>L. acidophilus</i> VIIIc2 y el Mix (Cocultivo de ambas cepas)	27
<b>Tabla 5.2</b> Disminución de p-Cresol al inicio del experimento y luego de 48 horas de cultivo por las cepas <i>L. bulgaricus</i> 6c3, <i>L. acidophilus</i> VIIIc2 y el Mix (Cocultivo de ambas cepas)	27
<b>Tabla 5.3</b> (a) Niveles de creatinina en suero de ratas Sprague-Dawley al comienzo y al final de las 16 semanas de administración del simbiótico. (b) Comparación entre grupos	29
<b>Tabla 5.4</b> (a) Niveles de IS en suero de ratas Sprague-Dawley al comienzo y al final de las 16 semanas de administración del simbiótico. (b) comparación entre grupos. Nef: ratas nefrectomizadas que no reciben el simbiótico, Lac: ratas nefrectomizadas que reciben el simbiótico, Control: ratas simuladas nefrectomizadas.	30
<b>Tabla 5.5</b> Valores de hematocrito de ratas Sprague-Dawley al final de las 16 semanas de administración del simbiótico	30
<b>Tabla 5.6</b> Secciones histológicas de riñones de ratas Sprague-Dawley. A, B y C: mancha tricrómica de nefronas de Masson. Las áreas fibróticas se observan en azul (flechas). D, E y F: mismo tejido observado por microscopía de excitación de dos fotones.	32

## 1. RESUMEN

La enfermedad renal crónica (ERC) corresponde a una patología de diversos orígenes que afecta la función renal. Una de las estrategias para evitar la progresión de la ERC es la disminución de las moléculas de retención urémica (MRUs) mediante probióticos, prebióticos y simbióticos. El objetivo de este trabajo fue evaluar si la administración de un simbióticos es capaz de disminuir la progresión de la ERC. Para esto, se evaluó la capacidad de disminuir IS y pCr *in vitro* por las cepas *L. bulgaricus* 6c3, *L. acidophilus* VIIIc2 y el cocultivo de ambas. Luego, se desarrolló un simbiótico el cual fue administrado en ratas Sprague-Dawley nefrectomizadas por 16 semana (Lac), en paralelo se trabajó con un grupo nefrectomizado sin tratamiento (Nef) y un grupo control (C). Se midieron las concentraciones de creatinina, IS y pCr en sangre mediante HPLC-DAD al inicio y final del experimento, además, se extrajo el riñón para análisis histológicos. La cepa *L. bulgaricus* 6c3 fue la que obtuvo mayor capacidad de disminuir IS *in vitro*. La administración del simbiótico no afectó la concentración de creatinina sérica, por el contrario, el grupo Lac disminuyó un 0.8% los valores de IS séricos, en contraste, el grupo Nef aumentó significativamente las concentraciones de IS (38.8%). Las concentraciones de pCr no lograron medirse. El análisis histológico del riñón demostró que el grupo Lac presentó un aumento menor del área fibrótica (12%) en comparación con el grupo Nef (25%). Los resultados obtenidos demuestran que el simbiótico es capaz de disminuir IS en modelo murino y disminuir la progresión de la ERC.

## 2. ABSTRACT

Chronic kidney disease (CKD) is a pathology of various origins affecting the kidney function. One strategies to prevent the progression of CKD is the decrease of uremic retention molecules (URMs) through probiotics, prebiotics and symbiotics. The aim of this work was to evaluate if the administration of a symbiotics are capable to reduce the progression of CKD. For this, *L. bulgaricus* 6c3, *L. acidophilus* VIIIc2 were evaluated to test their ability to decrease IS and pCr *in vitro*. Then, a symbiotic was developed which was administered in nephrectomized Sprague-Dawley rats for 16 weeks (Lac), in parallel we worked with a nephrectomized group without treatment (Nef) and a control group (C). Blood creatinine, IS and pCr concentrations were measured by HPLC-DAD in the beginning and at the end, in addition, the kidney was removed for histological analysis. *L. bulgaricus* 6c3 was the one with the highest ability to decrease IS *in vitro*. The administration of the symbiotic did not affect the serum creatinine concentration, on the other hand, the Lac group decreased serum IS values by 0.8%, in contrast, the Nef group significantly increased IS concentrations (38.8%). pCr concentrations could not be measured. Histological analysis of the kidney showed that the Lac group had a minor increase in fibrotic area (12%) compared to the Nef group (25%). The results obtained demonstrate that the symbiotic can decrease the progression of CKD.

### 3. INTRODUCCIÓN

La enfermedad renal crónica (ERC) es un término utilizado para trastornos de origen heterogéneos que afectan a la estructura y función del riñón. Se considera como un desorden común de gravedad variable que no sólo merece atención por internistas generales, sino que también necesita un enfoque concertado de salud pública para la prevención, detección temprana y manejo (Levey & Coresh, 2012). La definición se basa en el decrecimiento de la función renal y la disminución de la tasa de filtración glomerular (TFG) (<60 mL/min por 1.73 m<sup>2</sup>) por 3 meses o más. En base a la TFG, la enfermedad se puede clasificar en 5 estados: más de 90 mL/min por 1.73 m<sup>2</sup> (Etapa 1), 60-89 mL/min por 1.73 m<sup>2</sup> (Etapa 2), 30-59 mL/min por 1.73 m<sup>2</sup> (Etapa 3), 15-29 mL/min por 1.73 m<sup>2</sup> (Etapa 4) y menos de 15 mL/min por 1.73 m<sup>2</sup> (Etapa 5), en esta última el tratamiento consiste en diálisis o trasplante renal (Schiffrin *et al.*, 2007).

En países desarrollados la ERC se asocia generalmente con la vejez, la diabetes, la hipertensión, la obesidad y las enfermedades cardiovasculares, con la glomeruloesclerosis diabética y la nefroesclerosis hipertensiva como las entidades patológicas más comunes; sin embargo, el diagnóstico exacto de ERC es a menudo difícil (Levey & Coresh, 2012). De todas estas patologías, la más relevante es la enfermedad cardiovascular debido a que es la principal causa de muerte de pacientes que poseen ERC, de hecho, la mayoría de los



pacientes en etapa 3 o 4 mueren de enfermedad cardiovascular antes de llegar a la Insuficiencia Renal Terminal (IRT) (Gansevoort *et al.*, 2013).

### **3.1 Epidemiología de la ERC**

Los indicadores de salud pública a nivel mundial y nacional muestran un alarmante y progresivo aumento de pacientes con ERC, de acuerdo con la Global Burden Disease (GBD), la ERC se ubicaba en el puesto número 27 de causas de muertes mundiales para el año 1990, pero ésta llegó al puesto número 18 para el año 2010 (Jha *et al.*, 2013). Varios países poseen programas de vigilancia para monitorear las fallas renales tratadas con diálisis y trasplante. La incidencia es de 200 casos por millón de personas al año en varios países. En USA, Taiwán y México llega a 400 casos por millón de personas. La prevalencia en USA es cercana a los 1800 casos por millón de personas, siendo la diabetes la principal causa del fallo renal en la mayoría de los países (40% de los pacientes) (Levey & Coresh, 2012). La prevalencia ha ido en aumento debido parcialmente al incremento de la prevalencia de diabetes e hipertensión, las cuales, se han asociado a la ERC en países desarrollados, sin embargo, en países subdesarrollados no se saben las principales causas, o son debidas a la glomerulonefritis. Además, en los países subdesarrollados la prevalencia de la ERC disminuye debido a las bajas expectativas de vida en contraste con países desarrollados (Jha *et al.*, 2013). Como se mencionó

anteriormente, una de las principales complicaciones que genera es la enfermedad cardiovascular. En efecto, la mortalidad cardiovascular aumenta el doble en pacientes con etapa 3 y es 3 veces mayor en pacientes en etapa 4 de la ERC y, por ende, se ha enfatizado en buscar tratamientos para disminuir la enfermedad cardiovascular y detener la progresión de la ERC (Gansevoort *et al.*, 2013).

Chile es el noveno país con mayor prevalencia de esta enfermedad y número 17 dentro de los países con mayores tasas de incidencia (Levey & Coresh, 2012). Según la Sociedad Chilena de Nefrología, en nuestro país el número de pacientes en diálisis crónica (terapia renal de alto costo), ha experimentado un aumento de más de 30 veces en los últimos 25 años, a pesar de esto, la información disponible en etapas previas a diálisis es escasa, permaneciendo como una enfermedad subdiagnosticada y de referencia tardía (Flores *et al.*, 2009). En efecto, en Chile las enfermedades no transmisibles de notificación obligatoria no incluyen a la ERC (OMS, 2014). La información más sólida de la prevalencia de la ERC proviene de pacientes en diálisis (cuya incidencia no ha parado de aumentar), sin embargo, subyacente a esta población, existe otra población mucho mayor en etapas pre-diálisis de la ERC y cuya prevalencia se estima que es de 10% (Zuñiga *et al.*, 2011).

En Concepción se evaluó la prevalencia de esta enfermedad en 29.184 pacientes >18 años, de ambos sexos, que se atienden en Centros urbanos de Salud Familiar (CESFAM), quienes acudieron a éste por cualquier motivo de salud y que el médico tratante haya solicitado el examen de creatinina sérica sola o asociada a albuminuria. Este estudio reveló que la prevalencia global de la ERC en Concepción es más alta que el reporte oficial de esta patología (1,3% el reporte oficial y 12,1% la prevalencia global reportada), por lo tanto un gran número de personas poseen ERC no diagnosticada lo cual evidencia la desinformación del estado de la ERC (Zuñiga *et al.*, 2011).



### **3.2 Terapias para disminuir la progresión de ERC**

El tratamiento de la insuficiencia renal crónica se basa en evitar la progresión de ésta, reducir las complicaciones asociadas al decrecimiento de la TFG, disminuyendo los riesgos de enfermedad cardiovascular y mejorando la sobrevivencia y calidad de vida (Levey & Coresh, 2012). El manejo se basa en el diagnóstico clínico de acuerdo a la TFG y albuminuria. Existen diversos fármacos los cuales pueden evitar la progresión de la ERC. El beneficio más consistente son los inhibidores de las enzimas convertidores de angiotensina (ECA) y bloqueadores de los receptores de la angiotensina (BRA), generalmente asociados a fármacos diuréticos, pero se ha sugerido que no disminuye la progresión de la enfermedad cardiovascular (Levey & Coresh,

2012). Actualmente los tratamientos más eficaces son la diálisis y el trasplante, sin embargo, ambos tratamientos poseen sus limitaciones, de éstas la más complicada son sus altos costos y la escasez de donantes de órganos (para el caso del trasplante). En cualquier caso, los pacientes con trasplante poseen mayores tasas de supervivencia que los que se someten a diálisis (Levey & Coresh, 2012). Las bajas TFG se asocian a una farmacocinética y farmacodinamia alterada de muchas drogas, las cuales incrementan el riesgo de los efectos tóxicos si la dosis no es apropiadamente ajustada. Para impedir la progresión se deben evitar antiinflamatorios no esteroidales (AINEs), enemas de fosfato de sodio y contrastes ionizados (Levey & Coresh, 2012).



Por otro lado, los impedimentos de la función renal excretora y endocrina en paralelo con la reducción de TFG, nos lleva a complejos desórdenes generando respuestas compensatorias de otros órganos. La hipertensión se debe a la retención de sal y a un aumento del tono vascular generado por la falta de supresión del sistema nervioso simpático y el sistema renina-angiotensina, inhibición de la ATPasa sodio-potasio y la deficiencia del óxido nítrico. Una restricción dietaria de sodio y fármacos antihipertensivos son capaces de disminuir la presión sanguínea, sin embargo, no son capaces de reducir el riesgo de la enfermedad cardiovascular (Levey & Coresh, 2012). Una de las principales complicaciones asociadas es la anemia. Esta se produce debido a la baja producción de eritropoyetina (EPO) por las células peritubulares, y la falta

de respuesta de la medula ósea, indicando una inflamación sistémica, incremento en la producción de hepcidina por el hígado y los bajos niveles de metales disponibles para la eritropoyesis (Levey & Coresh, 2012). Debido a la inflamación sistémica, algunas citoquinas inhiben la diferenciación de los progenitores eritropoyéticos (IL-6, TNF e IFN- $\gamma$ ) y la producción de EPO (IL-1 $\beta$ ), a esto se le suma que, en ERC, las células peritubulares pierden su funcionalidad debido al NF- $\kappa$ B, imposibilitando la transcripción de *Epo*. La EPO actúa inhibiendo la apoptosis en las etapas previas a la síntesis de hemoglobina (Unidades formadores de colonias eritroides, proeritroblasto y etapas tempranas del eritroblasto basófilo) (Koury & Haase, 2015). El tratamiento con agentes estimuladores de eritrocitos (AEE) aumenta la hemoglobina y logra corregir los valores hematológicos evitando daños por hipoxia, sin embargo, también aumenta el riesgo de la enfermedad cardiovascular (Levey & Coresh, 2012).

Actualmente, el único tratamiento disponible para prolongar la vida en pacientes con IRT son las terapias de reemplazamiento del riñón, las cuales incluyen la diálisis y el trasplante de riñón ayudando a mantener una mejor calidad de vida, pero a un alto costo financiero (Vanholder *et al.*, 2017). Si bien, estas técnicas son capaces de disminuir las tasas de incidencia de IRT, sobre todo en las que son causadas por otras patologías como diabetes, obesidad e hipertensión, la prevalencia del uso de estas técnicas ha ido en aumento, pero con una incidencia mucho menor, lo que sugiere que el desarrollo de esta enfermedad

ha ido disminuyendo (Pippias *et al.*, 2016). El trasplante de riñón es el tratamiento más costo-efectivo de la IRT, sin embargo, el número de donantes está disminuyendo debido al aumento de pacientes con edad avanzada y frágiles que dificulta el uso de esta estrategia (Vanholder *et al.*, 2017). Una posible terapia que últimamente ha llamado la atención y se comentará más abajo, se relaciona con el eje intestino-riñón. Se ha descrito que una alteración de la microbiota intestinal (disbiosis) puede conducir a una disminución de las uniones estrechas de los enterocitos. Esto genera un aumento de permeabilidad de la barrera intestinal y una translocación de las bacterias entéricas al riñón lo cual genera daño renal (Hu *et al.*, 2017).



### **3.3 Moléculas de Retención Urémica**

La enfermedad renal se atribuye a la retención progresiva de una gran cantidad de compuestos llamados moléculas de retención urémica (MRUs) y pueden denominarse como solutos de retención urémica, o toxinas urémicas cuando actúan de forma negativa para las funciones biológicas (Vanholder *et al.*, 2003). Para el diagnóstico de ERC se utilizan principalmente la creatinina y la urea, sin embargo, existen más de 90 MRUs diferentes, dentro de los cuales, la creatinina y urea tienen relativamente bajo impacto sobre el status clínico de los pacientes, a esto se le suma que la remoción de urea no es representativa con

respecto a otras muchas moléculas como por ejemplo las moléculas unidas a proteínas (Neiryck *et al.*, 2013; Vanholder *et al.*, 2003).

Las MRUs se encuentran subdivididas en tres diferentes categorías de acuerdo con sus características fisicoquímicas y su comportamiento durante la diálisis. Primero, se encuentran las moléculas pequeñas, solubles en el agua y no unidas a proteínas, luego están las moléculas medianas y grandes, principalmente péptidos con un peso molecular de 300 D y 12000 D y, por último, se encuentran las moléculas pequeñas unidas a proteínas (Vanholder *et al.*, 2003). Las moléculas pequeñas solubles en agua, como la urea y creatinina, son las que se encuentran en mayor cantidad en nuestro organismo, dentro de estas se destacan las guanidinas ya que son neurotoxinas que podrían estar involucradas en la enfermedad cardiovascular y aumentan considerablemente en pacientes con ERC. De todas formas, la remoción de estas moléculas es efectiva durante la diálisis (Neiryck *et al.*, 2013). Por otro lado, existen más de 50 solutos que cumplen la definición de moléculas medianas y muchas de estas están principalmente involucradas en la enfermedad cardiovascular (*b2-microglobulin* es la MRUs representante de este grupo). La remoción de estas moléculas es baja, para esto se debe aumentar los poros de la diálisis aplicando membranas de alto flujo (Neiryck *et al.*, 2013). Por último, se encuentra el grupo de las moléculas unidas a proteínas, las cuales se caracterizan por su baja remoción con terapias convencionales, y dentro de

éstas, las más estudiadas corresponden a sulfato de indoxilo (IS), p-Cresol (pCr) y sus derivados (p-Cresolsulfato y p-Cresilglucuronida) (Neiryck *et al.*, 2013).

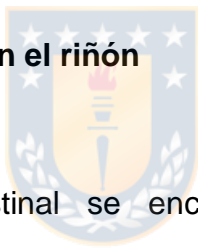
IS es una molécula derivada del triptófano, el cual es metabolizado por la triptofanasa de bacterias intestinales como *E. coli* y generan indol, el cual pasa al torrente sanguíneo desde el intestino y luego llega al hígado en donde es metabolizado a IS. Este es normalmente eliminado por la orina, sin embargo, en insuficiencia renal es dificultado permitiendo la acumulación en la sangre (Niwa, 2010). El IS sérico se ha asociado con la progresión de la ERC y patologías cardiovasculares, se ha descrito que IS aumenta la producción de especies de oxígeno reactivas (ROS) y el factor nuclear NF- $\kappa$ B en el túbulo proximal del nefrón y en el endotelio vascular (Ellis *et al.*, 2016), también se ha asociado con el aumento de la fibrosis renal (Vanholder *et al.*, 2014). Asimismo, se relaciona con el aumento del sistema renina-angiotensina generando hipertensión, daño vascular y permite la progresión de la ERC (Ellis *et al.*, 2016; Neiryck *et al.*, 2013).

El pCr también es una molécula derivada de la proteína dietaria, se produce específicamente a partir de la tirosina, la cual es metabolizada por las bacterias anaerobias, ocurre preferentemente en el colon distal, donde la descomposición proteica es más intensa. pCr es absorbido por las células epiteliales del colon,



se transfiere al torrente sanguíneo, se metaboliza en el hígado y se excreta en la orina (Wong *et al.*, 2016). Se ha asociado al aumento de enfermedades cardiovasculares, progresión de ERC, estrés oxidativo (Similar a IS), reducción de la función endotelial, daño tubular y promueve la resistencia a la insulina (Poesen *et al.*, 2016). En general, la microbiota del individuo y una disbiosis de esta puede incrementar las concentraciones plasmáticas de algunas MRUs importantes por su acción en la ERC, promoviendo la progresión de esta enfermedad (Ellis *et al.*, 2016)

### **3.4 Efecto de la disbiosis en el riñón**



En el sistema gastrointestinal se encuentra una microbiota compuesta principalmente por 5 filos bacterianos (*Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* y *Verrucomicrobia*) de los cuales, dos son los más dominantes (poseen el 90% de todas las especies), *Bacteroidetes* y *Firmicutes* (Sabatino *et al.*, 2015). Esta microbiota tiene funciones relevantes para el sistema gastrointestinal y, dentro de éstas los tres efectos fisiológicos más estudiados son la protección de la integridad y función del tracto gastrointestinal (por ejemplo, la restauración de proteínas de las uniones estrechas), efectos inmunológicos y metabólicos (Sabatino *et al.*, 2015). Dado que la microbiota está en contacto con un importante número de distintos tipos celulares, dirige la maduración del sistema inmune en la infancia y contribuye al mantenimiento de

la homeostasis durante la vida (Cigarran *et al.*, 2017). Entonces, la integridad y función adecuada de la microbiota es esencial para la salud, y una alteración de esta se asocia con diversas enfermedades, tales como enfermedad inflamatoria intestinal, diabetes, enfermedades cardiovasculares, cáncer, obesidad, inflamación crónica, dislipidemia y trastornos alérgicos (Wong *et al.*, 2014). La disbiosis se puede generar por la exposición de varios factores ambientales, incluyendo dieta, toxinas, drogas y patógenos. Este desequilibrio en la microbiota puede generar una inflamación sistémica y local, alterando la microbiota y la función de la barrera, lo que puede desencadenar autoinmunidad como se ha demostrado en la diabetes tipo 1 (DT1) (Carding *et al.*, 2015).



En la ERC y desde las etapas previas a ésta se produce una disbiosis en la microbiota, afectando su composición y actividades metabólicas, lo que contribuye a una inflamación sistémica y la acumulación de toxinas urémicas absorbidas en el intestino las que se eliminan por el riñón (Carding *et al.*, 2015), esto se debe a que en la ERC se altera profundamente el medio gastrointestinal por varios mecanismos: (1) la elevación de urea en fluidos intracelulares y extracelulares permite una inlfujo masivo dentro del tracto gastrointestinal. La hidrolisis de la urea por bacterias que poseen ureasa, resulta en la formación de grandes cantidades de amonio lo cual modifica el pH del lumen y puede causar enterocolitis urémica (Carding *et al.*, 2013), (2) El ácido úrico es excretado

normalmente por los riñones por filtración glomerular y reabsorción tubular, sin embargo, en ERC, el colon puede reemplazar a los riñones evitando un aumento de esta molécula en el plasma (Vaziri *et al.*, 2013), (3) como el ácido úrico, el colon actúa como mayor excretor de oxalatos. (4) En ERC una de las opciones terapéuticas es una restricción estricta de la dieta para prevenir hipercalcemia y sobrecarga de oxalatos lo cual limita el consumo de frutas, vegetales y productos altos en fibra (los cuales son ricos en potasio y oxalato). Estos nutrientes son la fuente de carbono principal para la microbiota intestinal, por lo tanto, estas dietas contribuyen a la alteración de ésta (Vaziri *et al.*, 2013). (5) Los pacientes con ERC avanzado se les recetan grandes cantidades de agentes quelantes de fosfato en cada comida para prevenir la hiperfosfatemia. El uso en periodos largos de estos agentes ha demostrado afectar la microbiota intestinal (Vaziri *et al.*, 2013). (6) Por último, el uso de antibióticos para tratar el acceso vascular y otras infecciones es otro mecanismo que afectará la microbiota y conducirá a una disbiosis (Vaziri *et al.*, 2013). En efecto, los pacientes con ERC terminal, han demostrado tener marcadas diferencias en la abundancia de numerosos taxones bacterianos recuperados en las heces en comparación con individuos sanos (Wong *et al.*, 2014). Como se mencionó anteriormente, existen bacterias que son capaces de producir MRUs tóxicos como fenoles, índoles y aminas los cuales son absorbidos a través de la mucosa intestinal (Guida *et al.*, 2014), de éstos las más relevantes son el IS y pCr. Asimismo, los principales metabolizadores de tirosinas y triptófano son

aerobios, principalmente Enterobacterias, pero algunos anaerobios (como *Clostridium perfringens*) también pueden jugar un rol importante (Nazzal *et al.*, 2017), se ha demostrado que en pacientes con ERC/hemodiálisis han incrementado la población de Enterobacterias y disminuido las Bifidobacterias en comparación con la población sana (Ellis *et al.*, 2016). Asimismo, en otro estudio, en el cual determinan que los pacientes con ERC tienen una motilidad gastrointestinal muy reducida, mencionan que gracias a esto se genera el sobrecrecimiento de bacterias como Enterobacteriácea, Halomonadaceae, Moraxellaceae y Pseudomonadaceae, y un decrecimiento en la población de Lactobacillaceae y Prevotellaceae (Guida *et al.*, 2014).

La mayoría de los esfuerzos para disminuir los solutos urémicos se han concentrado en el incremento de la remoción de estos principalmente por diálisis y se ha ignorado la estrategia alternativa de suprimir la producción de solutos a nivel intestinal, de hecho, en pacientes a los que se les ha practicado colectomía total, los niveles de IS y pCr sanguíneos, son disminuidos significativamente (Nazzal *et al.*, 2017), entonces, en efecto, el sistema gastrointestinal está profundamente implicado en la concentración sanguínea de algunas MRUs. Asimismo, se han descrito opciones terapéuticas para limitar la producción de solutos derivados del colon alterando el alimento consumido, por ejemplo, se puede disminuir la proteína dietaria, incrementar la fibra dietética y administrar adsorbentes a base de carbono (Como el AST-120)

(Meyer & Hostetter, 2012). Una de las opciones terapéuticas propuestas por Vanholder, *et al.* (2003) es disminuir la absorción intestinal de los MRUs mediante la administración de probióticos.

### 3.5 Terapias con probióticos para evitar progresión de ERC

En el último tiempo, se ha puesto énfasis en el estudio de probióticos para disminuir la ERC ya que se ha demostrado que han sido capaces de disminuir diferentes MRUs ya sea en modelos tanto *in vitro* como *in vivo*. En un estudio realizado con 16 pacientes en etapa 3 y etapa 4 de ERC, se evaluó el efecto que genera en las concentraciones de nitrógeno ureico, creatinina y ácido úrico sanguíneo, la administración de los probióticos *L. acidophilus* KB31, *B. longum* KB35 y *S. thermophilus* KB27 en una cápsula a concentraciones de  $1.5 \times 10^{10}$  UFC. Los resultados que obtuvieron indicaron una disminución significativa solo de nitrógeno ureico en sangre (BUN) (Ranganathan *et al.*, 2009). Miranda *et al.* (2014) realizaron un estudio sobre el efecto del probiótico en los niveles de BUN en pacientes con ERC. El objetivo del estudio fue determinar la efectividad de 2 dosis de *Lactobacillus casei* Shirota para lograr una disminución de la concentración de urea en pacientes en estadio 3 y estadio 4. Demostraron que dos tercios los pacientes con ERC generaron anomalías en la mucosa gastrointestinal y disbiosis producida por el aumento de Enterobacterias. Al analizar el cambio porcentual entre diferentes dosis, se encontró una

disminución de > 10% en la concentración de BUN en sangre para el paciente tratado con dosis altas. En general, los probióticos tienen el potencial de disminuir la concentración de diversas MRUs. Para el caso de IS y pCr, también se han realizado estudios *in vitro* (Nowak & Libudzisz, 2007) e *in vivo* (Fang *et al.*, 2014; Panza *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2017) que demuestran la capacidad que poseen diferentes probióticos de disminuir la concentración de estos MRUs. Asimismo, se han realizado estudios en donde se ha administrado simbióticos para reducir la progresión de la ERC con resultados favorables. Los frútanos tipo inulina son los prebióticos de mayor relevancia para este tópico ya que han demostrado disminuir la progresión de la ERC (Lai *et al.*, 2019) y MRUs como el IS y pCr (Li *et al.*, 2020). Panza *et al.* (2017) administro los probióticos *L. acidophilus* y *Bifidobacterium longum* más fructooligosacáridos (FOS) en pacientes con ERC etapa 2-5 y obtuvieron que los pacientes sin tratamiento tenían significativamente mas IS y pCr en la sangre en comparación que los pacientes que se les administro el simbiótico.

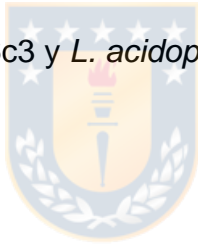
Estudios previos realizados por el Laboratorio Pasteur en colaboración con el Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana de la Universidad de concepción, muestran que las cepas *L. bulgaricus* 6c3 y *L. acidophilus* VIIIc2 suplementadas con Inulina y FOS son capaces de disminuir IS y pCr en modelo *in vitro*.

### **3.6 Pregunta de investigación**

¿Tendrán las cepas *L. bulgaricus* 6c3 y *L. acidophilus* VIIIc2 más inulina y FOS, la capacidad de disminuir la progresión de la ERC en modelo murino juntas?

### **3.7 Hipótesis**

La progresión de la ERC causada por elevadas concentraciones de IS y pCr plasmáticos disminuye debido a la administración de un simbiótico desarrollado con las cepas *L. bulgaricus* 6c3 y *L. acidophilus* VIIIc2.



### **3.8 Objetivo General**

Desarrollar un simbiótico con las cepas *L. bulgaricus* 6c3 y *L. acidophilus* VIIIc2  
capas de disminuir la progresión de la ERC en modelo murino.

### **3.9 Objetivos específicos**

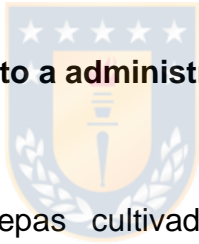
1. Evaluar si existe sinergismo entre ambas cepas de *Lactobacillus* con respecto a la disminución de IS y pCr para escoger el tratamiento que se administrará a ratas Sprague-Dawley con ERC inducido.
2. Determinar los niveles plasmáticos de IS y pCr luego de la administración del tratamiento probiótico en las ratas Sprague-Dawley con ERC inducido.
3. Evaluar el daño renal luego de la administración del tratamiento probiótico en ratas Sprague-Dawley con ERC inducido.



## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Cepas bacterianas como tratamiento probiótico

Se utilizaron 2 cepas bacterianas aisladas de productos comerciales. La primera fue aislada del producto lácteo yogur Griego de Danone y corresponde a *L. bulgaricus* 6C3, mientras que la segunda cepa fue aislada del producto farmacéutico SymbioVag® de Laboratorios Andromaco y corresponde a *L. acidophilus* VIII C2.



### 4.2 Selección del tratamiento a administrar

Para evaluar si ambas cepas cultivadas en conjunto pueden potenciar la disminución de MRUs se experimentó con un cocultivo y se comparó con cada cepa por si sola la habilidad de disminuir los MRUs. Para ello se activaron las cepas (que se mantienen en cepario a -20 °C) en caldo MRS por 10 horas a 37°C en condiciones aerobias. Luego fueron agregadas en matraces con caldo MRS (5% v/v) suplementado con los prebióticos inulina y fructooligosacárido (FOS) (12 g/L de cada uno), además, se les agrego IS y pCr a las siguientes concentraciones: 15 mg/L y 600 mg/L respectivamente. A continuación, se incubaron durante 48 horas a 37 °C en condiciones de aerobiosis. Se tomaron 500 µl de muestras al inicio y pasadas las 48 horas las cuales fueron centrifugados (13.400 g, 5 min). Los sobrenadantes fueron filtrados a través de una membrana de 0,22 µm y se

depositaron en viales para luego realizar cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

La concentración de IS y pCr fue cuantificada utilizando la técnica de HPLC equipado con un detector DAD (Elite LaChrom L-2455®) y una columna C18 de 5 µm (4.6x250 mm) la cual se mantuvo a 30°C. La fase móvil consistió en un gradiente de concentración compuesto de acetonitrilo, metanol y agua (26,3:15:58,7) por 13 minutos, luego cambio a una fase móvil compuesta por acetonitrilo y ácido fosfórico 1% (3:17) por 47 minutos, el flujo fue de 0.7 mL/min y la absorbancia fue medida a 220 nm para IS y 200 nm para pCr.



### **4.3 Animales**

Este ensayo se realizó con ratas Sprague-Dawley hembra de 12 semanas de edad. La cría de animales y su uso experimental se realizaron de acuerdo con las regulaciones nacionales y todos los estudios fueron aprobados por el Comité de Bioética y Bioseguridad, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción. Las ratas se alimentaron ad libitum en una habitación constantemente mantenida a 25 ° C y con un fotoperíodo 12/12 en el Centro Regional de Estudios Avanzados para la Vida (CREAV).

#### 4.4 Desarrollo del simbiótico y protocolo de experimentación

Para obtener el simbiótico, se inocularon 4 L de caldo MRS con la *cepa L. bulgaricus* 6c3 y se incubaron durante 24 h en un agitador térmico (Velp científica), luego, se centrifugaron los 4 L (Gyrozen) a 3000 x g durante 5 min para obtener el pellet el cual fue resuspendido en agua estéril y se volvió a centrifugar para remover el exceso de medio de cultivo. Por último, el sedimento se resuspendió en 500 ml de una matriz que contenía 4% de inulina y 4% de FOS, se congeló a -50 ° C en matraces adecuados para liofilización. La liofilización se realizó a 10 psi durante 36 h (Biobase). A partir de una muestra del liofilizado, se determinó el recuento de *L. bulgaricus* 6c3.

Se indujo ERC mediante una reducción de la masa renal (5/6<sup>th</sup>) mediante nefrectomía luego de anestésiar a los animales usando Xilacina (6 µg/g de peso) y Ketamina (90 µg/g de peso). La nefrectomía se realizó según lo descrito por Wang *et al.* (2017). Para esto, se extrajo el riñón derecho y se ligaron los dos polos del riñón izquierdo para alcanzar una reducción del 75% de la masa renal total, en 214 ratas. Las ratas control se sometieron a la cirugía, pero se dejaron los riñones intactos. Después de la cirugía, los ratones fueron alimentados con una dieta estándar de mantención. Fueron creados 3 grupos de ratones: el grupo 1 consistió en ratones nefrectomizado con tratamientos del probiótico (Lac) (n = 5), el grupo 2 consistió en ratones nefrectomizado sin

tratamientos (Nef) (n = 4) y el último grupo contuvo ratones pertenecientes al grupo control (C) (n = 5). El tratamiento con probióticos (10 g/rata/día) fue administrado 1 semana después de la cirugía hasta el final de este experimento (10<sup>6</sup> UFC/g) todos los días. Las ratas de los tres grupos (Nef, Lac y C) fueron sacrificadas a las 17 semanas después de la cirugía. El sacrificio fue realizado por el método aceptado para la eutanasia de ratas de laboratorio (Leary *et al.*, 2013), para esto se inyectó Xilacina (6 µg/g de peso) y Ketamina (120 µg/g de peso) y se realizó dislocación cervical. Se les tomaron muestras de sangre al inicio del tratamiento con probióticos (semana 1) y al momento de ser sacrificadas (semana 17) para realizar ensayos con MRUs. Los riñones fueron retirados y analizados.

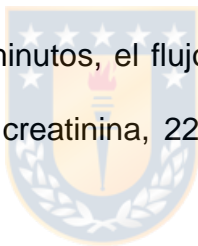


#### **4.5 Análisis hematológico**

Se realizó una medición del Volumen globular aglomerado (VGA) en micro hematocrito. Para esto, la sangre obtenida se depositó en capilares de microhematocito y fue centrifugada por 10000 rpm por 1 minuto. Luego se midió el volumen de glóbulos rojos y se estableció una relación entre el largo del capilar y el largo medido por los glóbulos rojos.

#### **4.6 Medición de la concentración de creatinina e IS**

Se tomaron muestras iniciales y terminales de sangre por triplicado de cada rata para medir la concentración de creatinina e IS. Estas fueron extraídas mediante el kit Ostro™ (Waters) y medidas por HPLC equipado con un detector DAD (Elite LaChrom L-2455®) usando una columna de fase reversa C18 de 5 µm (4.6\*250 mm) (InertSustain®). La fase móvil consistió en un gradiente de concentración compuesto de acetonitrilo, metanol y agua (26,3:15:58,7) por 13 minutos, luego cambio a una fase móvil compuesta por acetonitrilo y ácido fosfórico 1% (3:17) por 47 minutos, el flujo fue de 0.7 mL/min. La absorbancia fue medida a 205 nm para creatinina, 220 nm para IS y 200 nm para pCr a 30°C.



#### **4.7 Análisis histológico**

Las muestras de riñón se fijaron en paraformaldehído 10% en primer lugar y después se procesaron hasta bloquear parafina y se cortaron en rebanadas de espesor de 7 µm. Finalmente, se tiñeron con hematoxilina y eosina (H & E), y Tinción de Masson (Diapath). Después de evaluar el daño, el colágeno se caracterizó a partir de las muestras previamente seccionadas utilizando microscopía de excitación de dos fotones.

#### **4.8 Análisis estadístico**

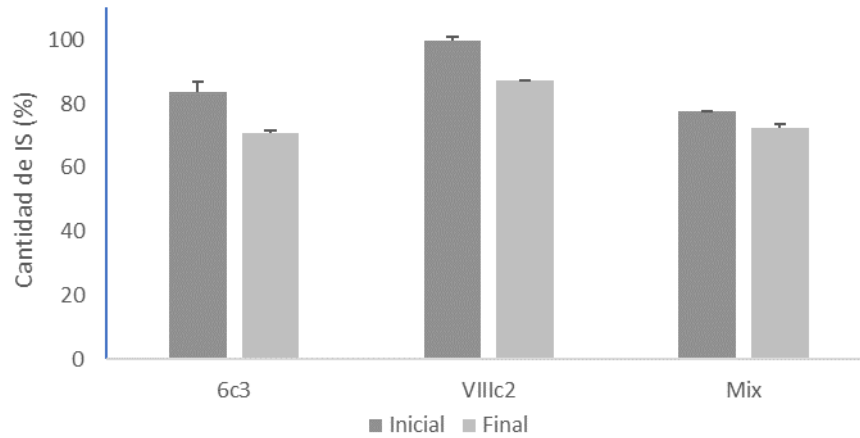
Las variables cuantitativas fueron representadas por su media y su desviación estándar, las categóricas por la frecuencia de cada una de sus clases. Con la finalidad de comparar los resultados de la evaluación inicial de las variables numéricas se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y se aplicó el test de Tukey de comparaciones múltiples cuando el resultado del ANOVA sea estadísticamente significativo.



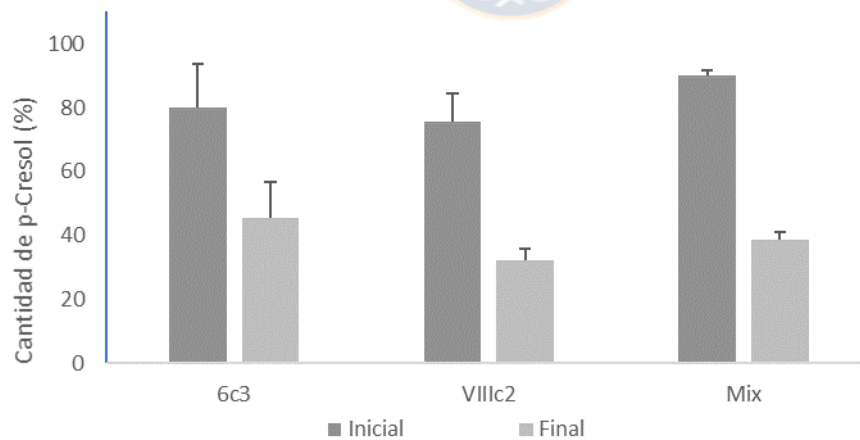
## 5. RESULTADOS

### 5.1 Efecto del cultivo de ambas cepas en la concentración de IS y pCr

Para evaluar si el tratamiento debía ser con ambas cepas juntas se realizó un cocultivo en presencia de MRUs. La concentración de IS y pCr disminuyeron significativamente para ambas cepas y el cocultivo, sin embargo, en el cocultivo, la disminución fue menor para ambos casos. La cepa 6c3 disminuyó un 16% el IS en el medio siendo la cepa con mayor capacidad de disminuirlo, la cepa VIIIc2 disminuyó un 12%, sin embargo, al utilizar ambas cepas, solo disminuyó un 7% (Figura 1). Por otro lado, la cepa 6c3 disminuyó un 43% el pCr en el medio, mientras que la cepa VIIIc2 y el cocultivo un 57%. Adicionalmente se realizó un ensayo de inhibición según el criterio de Gaudana y se observó que la cepa VIIIc2 inhibía a la cepa 6c3 (Datos no entregados). Debido a esto, los siguientes ensayos se realizaron solo con la cepa 6c3.



**Figura 5.1:** Disminución de IS al inicio del experimento y luego de 48 horas de cultivo por las cepas *L. bulgaricus* 6c3, *L. acidophilus* VIIIc2 y el Mix (Cocultivo de ambas cepas). Los ensayos fueron realizados por triplicado.



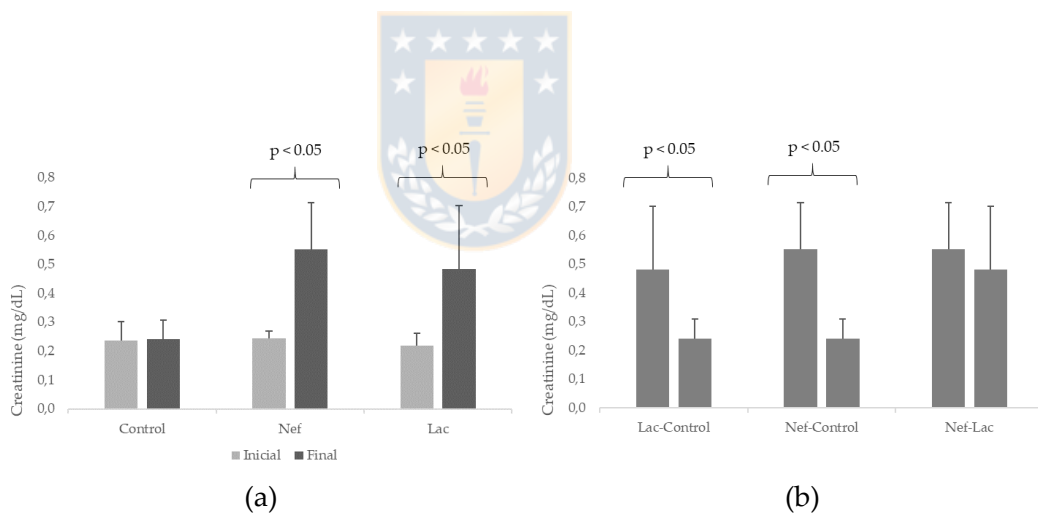
**Figura 5.2:** Disminución de pCr al inicio del experimento y luego de 48 horas de cultivo por las cepas *L. bulgaricus* 6c3, *L. acidophilus* VIIIc2 y el Mix (Cocultivo de ambas cepas). Los ensayos fueron realizados por triplicado.



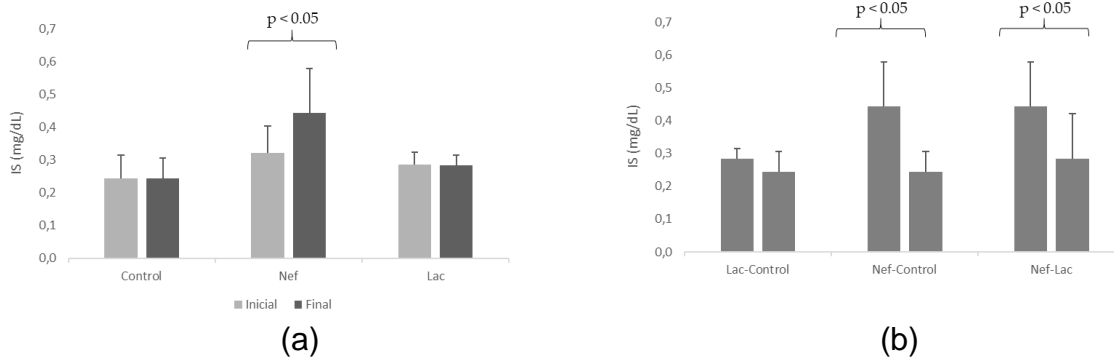
## **5.2 La administracion del simbiótico disminuye creatinina e IS en sangre de las ratas.**

La cepa *L. bulgaricus* 6c3 fue liofilizado junto con los prebióticos Inulina y FOS, y se obtuvo una concentración de  $10^6$  UFC/g la cual fue administrada diariamente en el agua de bebida. Se midieron los valores de creatinina e IS mediante HPLC en el tiempo inicial y al finalizar el experimento, además se comparó el Hematocrito entre los grupos. Los cambios que ocurrieron en los valores de creatinina al inicio del experimento y al final en los fueron significativos ( $p < 0.05$ ) en los grupos Nef y Lac (Figura 3). Los valores de creatinina aumentaron en todos los grupos, sin embargo, el aumento del grupo control fue solo de un 2%, mientras que los grupos Nef y Lac aumentaron un 127% y 121% respectivamente. De todas formas, los 3 grupos se mantuvieron dentro de los rangos normales de creatinina para estas Ratas. A pesar de esto, el incremento dramático de creatinina en los grupos Nef y Lac fueron significativamente mayores que el grupo control ( $p < 0.05$ ). Por otro lado, los valores de IS aumentaron significativamente sólo en el grupo Nef ( $p < 0.05$ ), en cambio, en los grupos Control y Lac hubo cambios, pero que no fueron significativos ( $p > 0.05$ ) (Figura 4). El grupo Control tuvo un aumento de un 0.5%, mientras que el grupo Lac disminuyó los valores de IS séricos en un

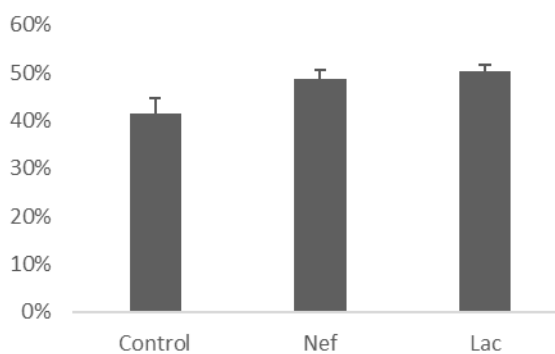
0.8%. El grupo Nef aumento los valores de IS en un 38.8%. La relación que hubo entre los grupos indica que hubo una diferencia significativa entre el grupo que tomó el probiótico (Lac) versus el grupo que no lo tomó (Nef), adicionalmente no hubo diferencia significativa entre el grupo Lac y el grupo Control ( $p < 0.05$ ). Las concentraciones de pCr en sangre no lograron ser medidas. Los resultados obtenidos en el hematocrito de las ratas no mostraron diferencias significativas, por lo tanto, la nefrectomía realizada no tuvo efecto en el volumen de eritrocitos, así como también el tratamiento no generó influencia en el hematocrito.



**Figura 5.3.** (a) Niveles de creatinina en suero de ratas Sprague-Dawley al comienzo y al final de las 16 semanas de administración del simbiótico. (b) Comparación entre grupos. Nef: ratas nefrectomizadas que no reciben el simbiótico, Lac: ratas nefrectomizadas que reciben el simbiótico, Control: ratas simuladas nefrectomizadas. A todas las muestras se les realizó el análisis por triplicado.



**Figura 5.4.** (a) Niveles de IS en suero de ratas Sprague-Dawley al comienzo y al final de las 16 semanas de administración del simbiótico. (b) comparación entre grupos. Nef: ratas nefrectomizadas que no reciben el simbiótico, Lac: ratas nefrectomizadas que reciben el simbiótico, Control: ratas simuladas nefrectomizadas. A todas las muestras se les realizó el análisis por triplicado.

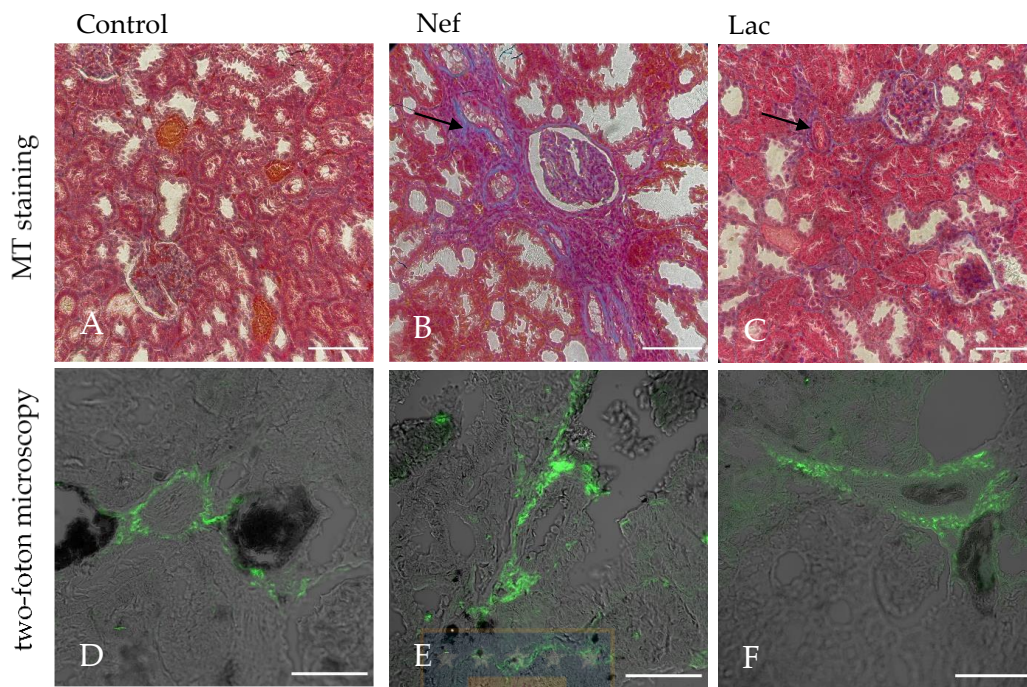


**Figura 5.5.** Valores de hematocrito de ratas Sprague-Dawley al final de las 16 semanas de administración del simbiótico. Nef: ratas nefrectomizadas que no reciben el simbiótico, Lac: ratas

nefrectomizadas que reciben el simbiótico, Control: ratas simuladas nefrectomizadas. A todas las muestras se les realizó el análisis por triplicado.

### **5.3 Los análisis histológicos muestran que la administración del simbiótico disminuyó la progresión de ERC.**

El área fibrótica evaluada por tinción de Masson-tricromo obtuvo un gran aumento en Nef (25%) en comparación con la de Control, mientras que en el grupo Lac tuvo un aumento menor del área fibrótica (12%). Las lesiones se encuentran en la capa parietal del corpúsculo renal, membrana basa de los túbulos proximales y distales. En el caso del grupo Nef, se observó una pérdida de citoplasma en los túbulos y corpúsculo renal con un desarrollo concomitante de tejido fibrótico. Al analizar los tejidos con microscopia de excitación de 2 fotones, se encontró colágeno en todas las muestras. Los grupos Nef y Lac presentaban mayor cantidad de lesiones versus el control que solo se encontró un área con tejido fibrótico (Figura 5). No se encontró lesión en el corpúsculo renal para ninguna de las muestras.



**Figura 5.6.** Secciones histológicas de riñones de ratas Sprague-Dawley. A, B y C: mancha tricrómica de nefronas de Masson. Las áreas fibróticas se observan en azul (flechas). D, E y F: mismo tejido observado por microscopía de excitación de dos fotones. El tejido fibrótico se observa en verde. Nef: ratas nefrectomizadas que no reciben el simbiótico, Lac: ratas nefrectomizadas que reciben el simbiótico, Control: ratas simuladas nefrectomizadas. Barra de escala: 100  $\mu\text{m}$  para micrografías A, B y C y 50  $\mu\text{m}$  para micrografías D, E y F. Se realizo un análisis por muestra.

## 6 DISCUSIÓN

Actualmente la enfermedad renal crónica emerge como uno de los principales desafíos en salud pública debido al incremento significativo en la prevalencia mundial, la dificultad y costo de los tratamientos y por ser uno de los principales factores de riesgo para la enfermedad cardiovascular (Koppe *et al.*, 2015; Tao *et al.*, 2019). Hoy en día, existe una creciente evidencia científica que avala la estrecha relación entre la salud intestinal y la salud renal, la cual se conoce más comúnmente como eje intestino-riñón (Sabatino *et al.*, 2015). Específicamente la comunicación/interacción entre la microbiota intestinal y su hospedador es pato-fisiológicamente relevante sobre todo en pacientes con ERC (Poesen *et al.*, 2016). En el caso de estos pacientes, el aumento de compuestos urémicos en sangre puede afectar la composición y metabolismo de la microbiota, además de favorecer el crecimiento de grupos bacterianos productores de estos metabolitos (Poesen *et al.*, 2016; Sabatino *et al.*, 2015), de hecho, se ha reportado que individuos con disbiosis, la microbiota alterada puede producir más de 200 metabolitos sanguíneos (Li *et al.*, 2020). Todo lo anterior se traduce en un aumento en la permeabilidad intestinal, pudiendo existir traslocación de metabolitos, endotoxinas y bacterias vivas al torrente sanguíneo (Anders *et al.*, 2013), contribuyendo así a la inflamación crónica, aumento de riesgo cardiovascular y empeorando la toxicidad urémica. A pesar de esto, este desbalance en el microbioma intestinal puede ser revertido, por ejemplo, con el

uso de prebióticos, probióticos y ambos unidos como simbióticos. En este contexto, se ha descrito que la suplementación con ciertos prebióticos y probióticos podría disminuir la producción de algunas toxinas urémicas y restablecer la microbiota intestinal normal (Meijers *et al.*, 2019). Los resultados obtenidos por trabajos previos demostraron que, de un pool de 84 cepas aisladas por el Laboratorio Pasteur, la cepa *L. bulgaricus* 6c3 mostró capacidad de disminuir significativamente IS en el medio de cultivo. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores (Fang *et al.*, 2014; Nowak & Libudzisz, 2007). El mecanismo por el cual bajan la concentración de IS es aún incierto, se ha postulado que se une a la pared celular y luego es eliminado por las fecas (Nowak & Libudzisz, 2007) o que poseen enzimas capaces de degradarlo (Wang *et al.*, 2016), de todas maneras se ha reportado ampliamente que pueden reestablecer la microbiota normal en individuos con ERC causada por disbiosis o viceversa (Lee *et al.*, 2020).

El uso de prebióticos y probióticos como terapia para disminuir la progresión de la ERC ha sido ampliamente investigado. Diferentes prebióticos han demostrado ser útiles para la disminución de diferentes metabolitos (Li *et al.*, 2020; Panza *et al.*, 2017). Lai *et al.* (2019) comparó el efecto de la dieta baja en proteínas versus la adición de inulina (19 g/día) a esta dieta en pacientes con ERC en etapa 3 o 4. Los investigadores demostraron que la intervención dietaría posee bajo efecto en la microbiota, de hecho, mencionan que solo es

capaz de disminuir la frecuencia del género *Lactobacillus*, sin embargo, al agregar inulina se logró aumentar los niveles de *Bifidobacterium*. Otro efecto benéfico de la utilización de inulina es la disminución del pH intestinal, nitrógeno ureico en sangre, TNF- $\alpha$  y NOX2, lo cual limita el crecimiento de bacterias productoras de MRUs y disminuye el estado inflamatorio (Lai *et al.*, 2019). Sin embargo, se ha reportado que la adición de probióticos en la dieta genera efectos mucho más significativos. Debido a esto, se han utilizado prebióticos con probióticos (simbióticos) para potenciar su acción de modulación de la microbiota. Alla and Sadeek (2018) evaluaron la administración de Goma Arábica con *L. casei* Shirota en ratones Wistar con ERC inducida. Sus resultados muestran que el tratamiento es capaz de disminuir las concentraciones de urea, creatinina y ácido úrico en la sangre. Asimismo, ha sido ampliamente reportado que el uso de prebióticos, probióticos y simbióticos posee un efecto modulador sobre la microbiota intestinal. Esto es de vital importancia, ya que las toxinas urémicas producidas en disbiosis (especialmente derivados del indol y además el LPS) y acumuladas en ERC, han demostrado activar el receptor pregnane X (PXR) el cual regula la expresión de TLR4 lo que produce un incremento en el estatus inflamatorio, lo que afecta la barrera intestinal aumentando su permeabilidad de diferentes metabolitos y permitiendo la traslocación de bacterias (Yoshifuji *et al.*, 2018). En este caso el tratamiento consistió en un simbiótico conformado por Inulina, FOS y *L. bulgaricus* 6c3.



En los grupos experimentales, se observan diferencias de los valores de creatinina entre las ratas el grupo C y las ratas nefrectomizadas (Lac y Nef) lo que indica que el modelo de uremia fue exitosamente establecido, sin embargo no existió diferencia significativa entre el grupo Lac y Nef , en otras palabras, no existe diferencia entre administrar el tratamiento o no en ratas con ERC, lo cual es consistente con lo reportado en otros trabajos (Fang *et al.*, 2014; Wanchai *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2017). Asimismo, se ha reportado que la creatinina no es suficientemente sensible para el diagnóstico de la ERC en comparación con otras moléculas, de hecho se ha recomendado el uso de moléculas como dimetilarginina simétrica (DSMO) (El-Khoury *et al.*, 2016). Por otro lado, los valores séricos de IS aumentaron significativamente en el grupo NEF (38,8%) No así en el grupo Lac el cual se mantuvo prácticamente igual al grupo control, en otras palabras, el tratamiento con simbiótico es capaz de mantener las concentraciones de IS sanguíneas a pesar de la ERC inducida. Varios trabajos han reportado que la administración de prebióticos (Lai *et al.*, 2019), probióticos (Fang *et al.*, 2014) y simbióticos (Alla & Sadeek, 2018) han sido capaces de disminuir IS en diferentes modelos de estudio. Wu et al. (Wu *et al.*, 2017) administró *L. acidophilus* LB de ratas Sprague-Dawley nefrectomizadas y evaluaron 35 metabolitos en las heces. Curiosamente, algunos metabolitos (ácido 3- (3-hidroxifenil) propiónico, amebamida, benzopireno, aspartil-glutamina, glucurónido de fenetilamina y control de toxina T2) aumentaron cinco veces en ratas nefrectomizadas; sin embargo, sus niveles fueron restaurados a

niveles normales después del tratamiento. Estos resultados están de acuerdo con nuestras observaciones porque la administración del simbiótico mantuvo niveles de IS similares a los del grupo de control. Una de las principales complicaciones obtenidas fue la de evaluación de pCr en sangre debido a que la metodología experimental realizada en este trabajo no fue la adecuada, esto a pesar de que esta molécula efectivamente logro ser medida *in vitro* con la misma técnica. La razón es que el pico generado por pCr se diluyo con otros picos pertenecientes al suero, en otras palabras, no se logró bien separar la molécula de las interferencias del suero. Además, la técnica no poseía la sensibilidad adecuada para las concentraciones de esta molécula. Por lo tanto se sugiere utilizar técnicas como cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) (Salmean *et al.*, 2015) o espectrometría de masas por ionización por electropulverización (ESI-MS) (Martinez *et al.*, 2005) las cuales son ampliamente usadas para determinar pCr en estudios Humanos.

Por otra parte, ha sido reportado que IS induce localmente el aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales activan el factor nuclear KappaB (NF-kB) y activan el estrés oxidativo y la producción de citoquinas proinflamatorias (Yoshifuji *et al.*, 2018). En las células tubulares, IS es capaz de ingresar por el transportador de aniones orgánicos al interior de la célula, una vez ahí, aumenta las ROS y NF-kB, lo que lleva a la disminución de E-caderina y un aumento del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y actina alfa del

musculo liso ( $\alpha$ -SMA). Esto produce una transición epitelio mesenquimal provocando la fibrosis renal (Vanholder *et al.*, 2014). Asimismo, uno de los principales mecanismos para los efectos protectores del riñón por *L. bulgaricus* 6c3, es su actividad antiinflamatoria disminuyendo los niveles de IS. En nuestros resultados observamos que el área fibrótica en el grupo Nef fue considerablemente mayor que en los grupos Lac y C, por lo tanto, el tratamiento simbiótico fue efectivo en disminuir la progresión de la ERC. Teóricamente este efecto protector se puede explicar por una alteración del lumen intestinal lo que a su vez disminuiría las concentraciones de IS en el suero. Feng *et al.* (2019), realizo un estudio en el que demostró cambios significativos entre ratas nefrectomizadas y no nefrectomizadas. El cambio consistió en 13 especies bacterianas (*Blautia*, *Escherichia\_Shigella*, *Bacteroides*, *Allobaculum* y *Clostridium\_IV*) y 291 metabolitos destacando así el impacto de la ERC en la microbiota y la producción de MRUs. Luego, evidencio que al administrar 2 prebióticos (Poria cocos y poricoic acid A) logro modificar el lumen intestinal y normalizó la microbiota intestinal. Ambos prebióticos mitigaron la inflamación y estrés oxidativo al inhibir la vía I $\kappa$ B $\alpha$  / NF- $\kappa$ B I y normalizó los valores de urea y creatinina sérica, así como también la expresión de  $\alpha$ -SMA. Por otra parte, hasta la fecha, no existen estudios similares utilizando microscopia de 2 fotones. En nuestra investigación se demostró que todas las lesiones presentaban una organización similar a lo largo de las muestras, independientemente si se le administró tratamiento o no. Lo interesante es que,

aunque se evidencia daño en el corpúsculo glomerular (tinción de Masson), las lesiones fibróticas solo se observaron en los túbulos mediante microscopia de 2 fotones. Esto es consistente con lo reportado por otros estudios los cuales mencionan que el efecto principal que tienen los MRUs más estudiados es en las células de los túbulos renales (Vanholder *et al.*, 2014).



## 7 CONCLUSIONES

Los resultados aquí presentados demuestran que el simbiótico formulado usando la cepa *L. bulgaricus* 6c3, inulina y FOS es capaz de disminuir el IS tanto *in vitro* como en la sangre de animales del modelo murino. Además, fue capaz de disminuir el desarrollo de fibrosis renal cuando se administró diariamente, pero no pudo evitar el desarrollo de fibrosis cardíaca.



## 8 FINANCIAMIENTO

Este trabajo fue financiado por el Departamento de Investigación y Desarrollo del Laboratorio Pasteur con el apoyo de los Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, del Departamento de Fisiología y del Departamento de Fisiopatología de la Universidad de Concepción.



## 9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alla, F., & Sadeek, E. A. (2018). Effect of Arabic Gum as prebiotics and *Lactobacillus casei* Shirota (LcS) as probiotic on oxidative stress and renal function in adenine-induced chronic renal failure in rats. *European j nutr food saf*, 8(1), 29-46.
- Anders, H. J., Andersen, K., & Stecher, B. (2013). The intestinal microbiota, a leaky gut, and abnormal immunity in kidney disease. *Kidney International*, 83(6), 1010-1016. doi:10.1038/ki.2012.440.
- Carding, S., Verbeke, K., Vipond, D. T., Corfe, B. M., & Owen, L. J. (2015). Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 26, 26191. doi:10.3402/mehd.v26.26191.
- Cigarran, S., González, E., & Cases, A. (2017). Microbiota intestinal en la enfermedad renal crónica. *Nefrología (Madr.)*, 37, 9-19. doi:10.1016/j.nefro.2016.05.008.
- El-Khoury, J. M., Bunch, D. R., Hu, B., Payto, D., Reineks, E. Z., & Wang, S. (2016). Comparison of symmetric dimethylarginine with creatinine, cystatin C and their eGFR equations as markers of kidney function. *Clinical Biochemistry*, 49(15), 1140-1143. doi:10.1016/j.clinbiochem.2016.07.009.
- Ellis, R. J., Small, D. M., Vesey, D. A., Johnson, D. W., Francis, R., Vitetta, L., Gobe, G. C., & Morais, C. (2016). Indoxyl sulphate and kidney disease: Causes, consequences and interventions. *Nephrology (Carlton)*, 21(3), 170-177. doi:10.1111/nep.12580.

- Fang, C. Y., Lu, J. R., Chen, B. J., Wu., C., Chen, Y. P., & Chen, M. J. (2014). Selection of uremic toxin-reducing probiotics *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Functional Foods*, 7, 407-415.
- Feng, Y. L., Cao, G., Chen, D. Q., Vaziri, N. D., Chen, L., Zhang, J., Wang, M., Guo, Y., & Zhao, Y. Y. (2019). Microbiome-metabolomics reveals gut microbiota associated with glycine-conjugated metabolites and polyamine metabolism in chronic kidney disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(24), 4961-4978. doi:10.1007/s00018-019-03155-9.
- Flores, J. C., Alvo, M., Borja, H., Morales, J., Vega, J., Zuniga, C., Muller, H., & Munzenmayer, J. (2009). [Clinical guidelines on identification, management and complications of chronic kidney disease]. *Revista Medica de Chile*, 137(1), 137-177. doi:10.4067/s0034-98872009000100026.
- Gansevoort, R. T., Correa-rotter, R., Hemmelgarn, B. R., Jafar, T. H., Heerspink, H. J., Mann, J. F., Matsushita, K., & Wen, C. P. (2013). Chronic kidney disease and cardiovascular risk: epidemiology, mechanisms, and prevention. *Lancet*, 382, 339–352. doi:/10.1016/ S0140-6736(13)60595-4.
- Guida, B., Germano, R., Trio, R., Russo, D., Memoli, B., Grumetto, L., Barbato, F., & Cataldi, M. (2014). Effect of short-term synbiotic treatment on plasma p-cresol levels in patients with chronic renal failure: a randomized clinical trial. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases*, 24(9), 1043-1049. doi:10.1016/j.numecd.2014.04.007.



- Hu, J., Luo, H., Wang, J., Tang, W., Lu, J., Wu, S., Xiong, Z., Yang, G., Chen, Z., Lan, T., Zhou, H., Nie, J., Jiang, Y., & Chen, P. (2017). Enteric dysbiosis-linked gut barrier disruption triggers early renal injury induced by chronic high salt feeding in mice. *Experimental and Molecular Medicine*, *49*(8), e370. doi:10.1038/emm.2017.122.
- Jha, V., Garcia-Garcia, G., Iseki, K., Li, Z., Naicker, S., Plattner, B., Saran, R., Wang, A. Y., & Yang, C. W. (2013). Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *Lancet*, *382*(9888), 260-272. doi:10.1016/s0140-6736(13)60687-x.
- Koppe, L., Mafra, D., & Fouque, D. (2015). Probiotics and chronic kidney disease. *Kidney International*, *88*(5), 958-966. doi:10.1038/ki.2015.255.
- Koury, M. J., & Haase, V. H. (2015). Anaemia in kidney disease: harnessing hypoxia responses for therapy. *Nat Rev Nephrol*, *11*(7), 394-410. doi:10.1038/nrneph.2015.82.
- Lai, S., Molfino, A., Testorio, M., Perrotta, A. M., Currado, A., Pintus, G., Pietrucci, D., Unida, V., La Rocca, D., Biocca, S., & Desideri, A. (2019). Effect of Low-Protein Diet and Inulin on Microbiota and Clinical Parameters in Patients with Chronic Kidney Disease. *Nutrients*, *11*(12). doi:10.3390/nu11123006.
- Leary, S. L., Underwood, W., Anthony, R., Cartner, S., Corey, D., Grandin, T., Greenacre, C., Gwaltney-Brant, S., McCrackin, M. A., & Meyer, R. (2013). *AVMA guidelines for the euthanasia of animals: 2013 edition*.

- Lee, Y. J., Li, K. Y., Wang, P. J., Huang, H. W., & Chen, M. J. (2020). Alleviating chronic kidney disease progression through modulating the critical genus of gut microbiota in a cisplatin-induced Lanyu pig model. *Journal of Food and Drug Analysis*, 28(1), 103-114.
- Levey, A. S., & Coresh, J. (2012). Chronic kidney disease. *Lancet*, 379(9811), 165-180. doi:10.1016/S0140-6736(11)60178-5.
- Li, L., Xiong, Q., Zhao, J., Lin, X., He, S., Wu, N., Yao, Y., Liang, W., Zuo, X., & Ying, C. (2020). Inulin-type fructan intervention restricts the increase in gut microbiome-generated indole in patients with peritoneal dialysis: a randomized crossover study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1, nqz337. doi:10.1093/ajcn/nqz337.
- Martinez, A. W., Recht, N. S., Hostetter, T. H., & Meyer, T. W. (2005). Removal of P-cresol sulfate by hemodialysis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 16(11), 3430-3436. doi:10.1681/ASN.2005030310.
- Meijers, B., Evenepoel, P., & Anders, H. J. (2019). Intestinal microbiome and fitness in kidney disease. *Nat Rev Nephrol*, 15(9), 531-545. doi:10.1038/s41581-019-0172-1.
- Meyer, T. W., & Hostetter, T. H. (2012). Uremic solutes from colon microbes. *Kidney International*, 81(10), 949-954. doi:10.1038/ki.2011.504.
- Miranda, P. V., Urbina, R., Gomez, C. O., & Espinosa, L. (2014). Effect of probiotics on human blood urea levels in patients with chronic renal failure. *Nutricion Hospitalaria*, 29(3), 582-590. doi:10.3305/nh.2014.29.3.7179.

Nazzal, L., Roberts, J., Singh, P., Jhavar, S., Matalon, A., Gao, Z., Holzman, R., Liebes, L., Blaser, M. J., & Lowenstein, J. (2017). Microbiome perturbation by oral vancomycin reduces plasma concentration of two gut-derived uremic solutes, indoxyl sulfate and p-cresyl sulfate, in end-stage renal disease. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 32(11), 1809-1817. doi:10.1093/ndt/gfx029.

Neiryneck, N., Vanholder, R., Schepers, E., Eloot, S., Pletinck, A., & Glorieux, G. (2013). An update on uremic toxins. *International Urology and Nephrology*, 45(1), 139-150. doi:10.1007/s11255-012-0258-1.

Niwa, T. (2010). Uremic toxicity of indoxyl sulfate. *Nagoya Journal of Medical Science*, 72(1-2), 1-11.

Nowak, A., & Libudzisz, Z. (2007). Ability of intestinal lactic bacteria to bind or/and metabolise phenol and p-cresol. *Annals of Microbiology*, 57(3), 329-335. doi:10.1007/BF03175068.

Panza, F., Duranti, D., Chiara, R., Basile, M., & Bagnati, M. J. A. R. D. M. (2017). Short-Term Effects of Pre/Probiotics on P-Cresol and Indoxyl-Sulphate Serum Concentrations During the Various Stages of Chronic Kidney Disease. 3(1), 001-005.

Pippias, M., Jager, K. J., Kramer, A., Leivestad, T., Sanchez, M. B., Caskey, F. J., Collart, F., Couchoud, C., Dekker, F. W., Finne, P., Fouque, D., Heaf, J. G., Hemmelder, M. H., Kramar, R., De Meester, J., Noordzij, M., Palsson, R., Pascual, J., Zurriaga, O., Wanner, C., & Stel, V. S. (2016). The changing trends and outcomes in renal replacement therapy: data

from the ERA-EDTA Registry. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 31(5), 831-841. doi:10.1093/ndt/gfv327.

Poesen, R., Evenepoel, P., de Loor, H., Kuypers, D., Augustijn, P., & Meijers, B. (2016). Metabolism, Protein Binding, and Renal Clearance of Microbiota-Derived p-Cresol in Patients with CKD. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 11, 1136–1144. doi:10.2215/CJN.00160116.

Ranganathan, N., Friedman, E. A., Tam, P., Rao, V., Ranganathan, P., & Dheer, R. (2009). Probiotic dietary supplementation in patients with stage 3 and 4 chronic kidney disease: a 6-month pilot scale trial in Canada. *Current Medical Research and Opinion*, 25(8), 1919-1930. doi:10.1185/03007990903069249.

Sabatino, A., Regolisti, G., Brusasco, I., Cabassi, A., Morabito, S., & Fiaccadori, E. (2015). Alterations of intestinal barrier and microbiota in chronic kidney disease. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 30(6), 924-933. doi:10.1093/ndt/gfu287.

Salmean, Y. A., Segal, M. S., Palii, S. P., & Dahl, W. J. (2015). Fiber supplementation lowers plasma p-cresol in chronic kidney disease patients. *Journal of Renal Nutrition*, 25(3), 316-320. doi:10.1053/j.jrn.2014.09.002.

Schiffrin, E. L., Lipman, M. L., & Mann, J. F. (2007). Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system. *Circulation*, 116(1), 85-97. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.678342.

- Tao, S., Tao, S., Cheng, Y., Liu, J., Ma, L., & Fu, P. (2019). Effects of probiotic supplements on the progression of chronic kidney disease: A meta-analysis. *Nephrology (Carlton)*, 24(11), 1122-1130. doi:10.1111/nep.13549.
- Vanholder, R., Annemans, L., Brown, E., Gansevoort, R., Gout-Zwart, J. J., Lameire, N., Morton, R. L., Oberbauer, R., Postma, M. J., Tonelli, M., Biesen, W. V., Zoccali, C., & European Kidney Health, A. (2017). Reducing the costs of chronic kidney disease while delivering quality health care: a call to action. *Nat Rev Nephrol*, 13(7), 393-409. doi:10.1038/nrneph.2017.63.
- Vanholder, R., De Smet, R., Glorieux, G., Argiles, A., Baurmeister, U., Brunet, P., Clark, W., Cohen, G., De Deyn, P. P., Deppisch, R., Descamps-Latscha, B., Henle, T., Jorres, A., Lemke, H. D., Massy, Z. A., Passlick-Deetjen, J., Rodriguez, M., Stegmayr, B., Stenvinkel, P., Tetta, C., Wanner, C., Zidek, W., & European Uremic Toxin Work, G. (2003). Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney International*, 63(5), 1934-1943. doi:10.1046/j.1523-1755.2003.00924.x.
- Vanholder, R., Schepers, E., Pletinck, A., Nagler, E. V., & Glorieux, G. (2014). The uremic toxicity of indoxyl sulfate and p-cresyl sulfate: a systematic review. *Journal of the American Society of Nephrology*, 25(9), 1897-1907. doi:10.1681/ASN.2013101062.
- Vaziri, N. D., Wong, J., Pahl, M., Piceno, Y. M., Yuan, J., DeSantis, T. Z., Ni, Z., Nguyen, T. H., & Andersen, G. L. (2013). Chronic kidney disease alters

intestinal microbial flora. *Kidney International*, 83(2), 308-315. doi:10.1038/ki.2012.345.

Wanchai, K., Yasom, S., Tunapong, W., Chunchai, T., Eaimworawuthikul, S., Thiennimitr, P., Chaiyasut, C., Pongchaidecha, A., Chatsudthipong, V., Chattipakorn, S., Chattipakorn, N., & Lungkaphin, A. (2018). Probiotic *Lactobacillus paracasei* HII01 protects rats against obese-insulin resistance-induced kidney injury and impaired renal organic anion transporter 3 function. *Clinical Science (London, England: 1979)*, 132(14), 1545-1563. doi:10.1042/cs20180148.

Wang, F., Jiang, Y. S., & Liu, F. (2016). The influence of mutant lactobacilli on serum creatinine and urea nitrogen concentrations and renal pathology in 5/6 nephrectomized rats. *Renal Failure*, 38(9), 1441-1447. doi:10.1080/0886022X.2016.1227617.

Wang, X., Chaudhry, M. A., Nie, Y., Xie, Z., Shapiro, J. I., & Liu, J. (2017). A Mouse 5/6th Nephrectomy Model That Induces Experimental Uremic Cardiomyopathy. *JoVE*(129), e55825. doi:doi:10.3791/55825.

Wong, J., Piceno, Y. M., DeSantis, T. Z., Pahl, M., Andersen, G. L., & Vaziri, N. D. (2014). Expansion of urease- and uricase-containing, indole- and p-cresol-forming and contraction of short-chain fatty acid-producing intestinal microbiota in ESRD. *American Journal of Nephrology*, 39(3), 230-237. doi:10.1159/000360010.

Wong, X., Carrasco-Pozo, C., Escobar, E., Navarrete, P., Blachier, F., Andriamihaja, M., Lan, A., Tome, D., Cires, M. J., Pastene, E., & Gotteland, M. (2016). Deleterious Effect of p-Cresol on Human Colonic

Epithelial Cells Prevented by Proanthocyanidin-Containing Polyphenol Extracts from Fruits and Proanthocyanidin Bacterial Metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(18), 3574-3583. doi:10.1021/acs.jafc.6b00656.

Wu, B., Jiang, H., He, Q., Wang, M., Xue, J., Liu, H., Shi, K., Wei, M., Liang, S., & Zhang, L. (2017). Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Reveals the Effect of *Lactobacillus* Treatment on the Faecal Metabolite Profile of Rats with Chronic Renal Failure. *Nephron*, 135(2), 156-166. doi:10.1159/000452453.

Yoshifuji, A., Wakino, S., Irie, J., Matsui, A., Hasegawa, K., Tokuyama, H., Hayashi, K., & Itoh, H. (2018). Oral adsorbent AST-120 ameliorates gut environment and protects against the progression of renal impairment in CKD rats. *Clinical and Experimental Nephrology*, 22(5), 1069-1078. doi:10.1007/s10157-018-1577-z.

Zuñiga, C., Müller, H., & Flores, M. (2011). Prevalencia de enfermedad renal crónica en centros urbanos de atención primaria. *Revista Médica de Chile*, 139, 1176-1184. doi:10.4067/S0034-98872011000900010