



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**EFFECTO DE UNA DIETA HIPOPROTEICA DURANTE LA GESTACIÓN Y/O LA  
LACTANCIA, EN LA LESIÓN RENAL AGUDA Y SU TRANSICIÓN A  
ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA EN CRÍAS**

**TESIS**  
**QUE PARA OTORGAR EL GRADO DE:**  
**DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**  
**LUIS ENRIQUE GARCÍA ORTUÑO**

**DIRECTORA DE TESIS**  
**DRA. NORMA BOBADILLA SANDOVAL**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**COMITÉ TUTOR**  
**DRA. ELENA ZAMBRANO**  
**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR**  
**ZUBIRÁN**  
**DR. ENRIQUE ORTEGA**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

Ciudad de México  
Diciembre 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DEDICATORIA

### ***A mi familia, Lorna, Yohualli y Mariel***

Las mujeres más importantes en mi vida.

### ***A mi mamá, Rosario Ortuño M. y mi hermana Rosa Alejandra García O.***

Por acompañarme siempre en cada una de mis etapas profesionales.

### ***A mi tutora, la Dra Norma Bobadilla Sandoval***

Por la confianza depositada en mi, por el tiempo dedicado en mi formación científica y por el apoyo personal en momentos difíciles.

### ***A los miembros del comité tutorial, Dra. Elena Zambrano y Dr. Enrique Ortega.***

Por el apoyo, asesoría y consejos durante todo el doctorado.

### ***A todos los amigos y amigas del laboratorio, en particular Rosalva Pérez, Jonatan Barrera y Emma Luna.***

Con mucho agradecimiento y cariño por todo su apoyo en el proyecto, su compañía y amistad en el laboratorio.

## RECONOCIMIENTOS ACADÉMICOS

El presente trabajo se realizó bajo la asesoría de la Dra. Norma Araceli Bobadilla Sandoval en la Unidad de Fisiología Molecular del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México y del Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” durante Enero del 2016 -diciembre 2019.

La realización de éste proyecto fue posible gracias a los financiamientos otorgados a la Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT No. 235855, 235964, 272390 y A1-S-8715) y por la UNAM DGAPA (IN223915 y IN201619). Durante mi doctorado gocé de una beca otorgada por el Programa de Apoyos para la Superación del Personal Académico (PASPA) de la Dirección General de Asuntos del Personal (DGAPA) UNAM.

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM, por todas las facilidades otorgadas.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por su apoyo para la asistencia a los congresos “ASN Kidney Week 2018 y al Congreso del Instituto Mexicano de Investigaciónes Nefrológicas (IMIN) 2019.

A la QFB. Rosalba Pérez Villalva por su asesoría técnica durante la realización de este trabajo.

Finalmente, se agradece al Jurado designado para el Examen Doctoral por el Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas:

Presidente: Dr. Víctor Julián Valdés. Instituto de Fisiología Celular. UNAM.

Secretario: Dra Norma A. Bobadilla Sandoval. Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM.

Vocal: Dra. María Elena Flores Carrasco. Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM.

Vocal: Dra. Rocío García Becerra. Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM.

Vocal: Dra Mara Medeiros Domingo. Hospital Infantil de México Federico Gómez.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ADAMTS1:** A Desintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs (metaloproteasa con motivos de tromboposdina)
- ADQI:** Acute Dialysis Quality Initiative
- AT1:** Angiotensin II Type 1 receptor (receptor de angiotensina II tipo 1)
- BPN:** Bajo Peso al Nacimiento
- CONEVAL:** Consejo Nacional de Evaluación Política de Desarrollo Social
- CTGF:** Connective Tissue Growth Factor (factor de crecimiento de tejido conectivo)
- DOHaD:** Development Origin in Health and Disease (origen durante el desarrollo de la salud y la enfermedad)
- ENA78:** Epithelial-neutrophil Activating Protein (proteína epitelial activadora de neutrófilos)
- eNOS:** Endothelial Nitric Oxide Synthase (óxido nítrico sintasa endotelial)
- ENSANUT:** Encuestas Nacionales de Salud y Nutrición
- EPO:** Eritropoyetina
- ERC:** Enfermedad Renal Crónica
- ERCT:** Enfermedad Renal Crónica Terminal
- ERO:** Especies Reactivas de Oxígeno
- ET<sub>A</sub>:** Endothelin receptor type A (receptor de endotelina tipo A)
- ET<sub>B</sub>:** Endothelin receptor type B (receptor de endotelina tipo B)
- FGF:** Fibroblast Growth Factor (factor de crecimiento de fibroblastos)
- FSR:** Flujo Sanguíneo Renal
- Gpx:** Glutathione Peroxidase
- HIF:** Hypoxia-inducible Factor (factor inducido por hipoxia)
- HSP:** Heat Shock Protein (proteína de choque térmico)
- ICAM:** Intercellular Adhesion Molecule (moléculas de adhesión intercelular)
- IR:** isquemia/reperfusión renal
- INCMNSZ:** Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
- JNK:** Jun N-Terminal Kinase
- KIM-1:** Kidney Injury Molecule-1 (molécula de daño renal-1)
- LRA:** Lesión Renal Aguda
- M1:** Macrófagos tipo 1

**M2:** Macrófagos tipo 2

**MCP-1:** Monocyte chemoattractant protein-1 (proteína quimiotáctica de monocitos)

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**PAM:** Presión Arterial Media

**PAS:** Periodic Acid-Schiff (ácido periódico de Schiff)

**PDGF:** Platelet-derived Growth Factor (factor de crecimiento derivado de plaquetas)

**PR:** Peso Renal

**RANTES:** Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted. (quimiocina de regulación por activación expresada y secretada por los linfocitos T)

**RCIU:** Restricción de Crecimiento Intra-Uterino

**RPM:** Restricción Proteínica Materna

**SRAA:** Sistema renina-angiotensina-aldosterona

**SOD1:** Superoxide Dismutase 1 (superóxido dismutasa 1)

**TFG:** Tasa de Filtrado Glomerular

**TGF- $\beta$ :** Transforming Growth Factor- $\beta$  (factor de crecimiento transformante- $\beta$ )

**TIMP-3:** Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-3 (inhibidor tisular de metaloproteinasa-3)

**TLR:** Toll-like Receptor (receptor tipo Toll)

**TNF- $\alpha$ :** Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral- $\alpha$ )

**UNICEF:** United Nations International Children's Emergency Fund (fondo de las naciones unidas para la infancia)

**VEGF:** Vascular Endothelial Growth Factor (factor de crecimiento endotelial vascular)

**%C:** Porcentaje de Cambio

# ÍNDICE

<b>1.0 ANTECEDENTES.</b>	10
<b>1.1 Generalidades de anatomía y fisiología renal.</b>	10
<b>1.2 Lesión renal aguda y su fisiopatología.</b>	13
<b>1.2.1 El endotelio vascular renal.</b>	14
<b>1.2.2 Epitelio tubular renal.</b>	14
<b>1.2.3 Proceso inflamatorio después de la lesión renal.</b>	15
<b>1.2.4 Mecanismos de daño oxidante.</b>	16
<b>1.3 Transición de lesión renal aguda a enfermedad renal crónica.</b>	18
<b>1.3.1 Epitelio tubular renal.</b>	20
<b>1.3.2 El endotelio renal.</b>	20
<b>1.3.3 Origen de las células que inducen fibrosis renal (miofibroblastos).</b>	22
<b>1.3.4 El proceso inflamatorio persistente después de lesión renal.</b>	23
.....	24
<b>1.4 La desnutrición, el desarrollo fetal y su influencia en la salud y la enfermedad.</b>	25
.....	25
<b>1.4.1 Desnutrición en el mundo y México.</b>	25
<b>1.4.2 Concepto DOHaD (Developmental Origin in Health and Disease).</b>	27
<b>1.4.3 La desnutrición durante la gestación y su efecto en el desarrollo fetal.</b>	29
<b>1.4.4. Programación renal durante el desarrollo y sus implicaciones clínicas.</b>	31
<b>1.4.5 La restricción proteínica y su influencia en el desarrollo renal.</b>	32
<b>2.0 JUSTIFICACIÓN.</b>	33
<b>3.0 OBJETIVO GENERAL.</b>	34
<b>3.1 Objetivos Específicos.</b>	34
<b>4.0 MATERIAL Y MÉTODOS.</b>	35
<b>4.1 Modelo para obtener crías de madres con restricción proteínica.</b>	35
<b>4.2 Peso y mediciones morfométricas en las crías del modelo de transición de lesión renal aguda a enfermedad renal crónica.</b>	37
<b>4.3 Modelo de lesión renal aguda inducida por isquemia/reperfusión.</b>	37
<b>4.4 Modelo de la transición de lesión renal aguda a enfermedad renal crónica inducido por isquemia/reperfusión unilateral más nefrectomía.</b>	38
<b>4.5 Mediciones fisiológicas y toma de muestras.</b>	40



4.6	Proteinuria.....	40
4.7	Creatinina plasmática y depuración de creatinina.....	40
4.8	Biomarcadores urinarios de daño renal HSP 72 y KIM-1 por Western Blot. ....	41
4.9	Histomorfometría y alteraciones histopatológicas.....	41
4.10	Análisis de expresión de genes.....	42
4.11	Análisis estadístico.....	43
5.0	RESULTADOS.....	44
5.1	Respuesta fisiológica basal renal y posterior a lesión renal aguda inducida por isquemia/reperfusión en crías provenientes de madres con restricción proteínica.....	44
5.1.1	En condiciones basales, la RPM redujo el número de nefronas y el flujo sanguíneo renal en las crías.....	44
5.1.2	La RPM redujo los niveles de RNAm, de moléculas vasoactivas, antioxidantes e inflamatorias.....	45
5.1.3	Los grupos de RPM (RC y RR) mostraron una mejor respuesta hemodinámica renal después de la la lesión renal aguda en las crías.....	47
5.1.4	Las crías con RPM muestran una mejor perfusión sanguínea glomerular después de la isquemia/reperfusión renal, medida por el área de los penachos glomerulares.....	49
5.1.5	Los grupos de las crías con RPM (RC y RR) mostraron menor daño del epitelio tubular renal inducido por isquemia/reperfusión evaluado por biomarcadores urinarios e histopatología.....	51
5.1.6	Los grupos de RPM presentaron una mejor respuesta antioxidante y ante la hipoxia después del daño renal causado por isquemia/reperfusión.....	53
5.2	Resultados preliminares del impacto de la restricción proteínica materna en condiciones basales y en la transición de lesión renal aguda a enfermedad renal crónica.....	56
5.2.1	La restricción proteínica en la dieta no afecta el peso corporal o la ingesta de alimento durante gestación o lactancia de las ratas madres.....	57
5.2.2	La restricción proteínica materna no ifnluyó en las determinaciones morfométricas al nacimiento las crías.....	58
5.2.3	Las crías de los grupos de RPM (CR y RR) mostraron un menor peso corporal durante los primeros 30 días de vida.....	59
	.....	60
5.2.4	Todos los grupos experimentales presentan el mismo grado de disfunción renal y las crías con RPM menor producción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> urinario evaluados 24 h post-isquemia renal.....	60
5.2.5	Seguimiento mensual de peso corporal y proteinuria durante la transición de la LRA a ERC en las crías con RPM.....	62

5.2.6 Determinación de condición corporal e ingesta de alimento en las crías con restricción proteínica materna al quinto mes.....	63
6.0 DISCUSIÓN.....	64
6.1 La restricción proteínica materna en ratas confiere resiliencia en las crías ante un episodio de la lesión renal aguda.....	65
6.2 La resiliencia al daño renal se mantiene en la transición de LRA a ERC principalmente en los grupos de doble restricción proteínica materna (RR).....	71
7.0 CONCLUSIÓN.....	72
8.0 PESPECTIVAS.....	73
9.0 REFERENCIAS.....	74
10.0 ANEXOS.....	85
10.1 Artículos publicados.....	85

## 1.0 ANTECEDENTES.

### 1.1 Generalidades de anatomía y fisiología renal.

Los riñones en el humano están situados en el retro-peritoneo a ambos lados de la columna vertebral. El riñón derecho está desplazado por el hígado, de modo que se sitúa 12 mm más abajo que el izquierdo. Cada riñón está compuesto por dos regiones principales una corteza externa y una médula interna que se continúa con la pelvis renal.<sup>1</sup>

La unidad estructural y funcional del riñón es la nefrona, en la rata cada riñón contiene entre 30,000 a 35,000 nefronas por riñón y en humanos aproximadamente 1 millón de nefronas, aunque existen muchas diferencias entre individuos. La nefrona consiste en un glomérulo, conectado al túbulo contorneado proximal, que se continua con el asa de Henle, posteriormente el túbulo contorneado distal y por último el túbulo y conducto colector.<sup>2</sup>

El riñón cumple un amplio espectro de funciones que resultan importantes para mantener la homeostasis en el organismo interactuando con diversos órganos y sistemas. A continuación, se enlistan las funciones más importantes.

**Excreción de metabolitos de desecho:** Los riñones son los principales medios de eliminación de los productos del metabolismo que ya no son necesarios para el cuerpo. El organismo de manera constante está generando productos de desecho que en altas concentraciones pueden ser perjudiciales y por lo tanto es necesario metabolizar o excretar en la misma tasa en la que son producidos. Algunos de estos productos incluyen urea, creatinina, bilirrubina, urobilina y varias hormonas.<sup>3</sup> Los riñones también eliminan la mayoría de las toxinas y otras sustancias extrañas que el cuerpo produce o ingiere como los pesticidas, los fármacos y los aditivos de alimentos.<sup>1</sup>

**Regulación del equilibrio hídrico y electrolítico:** El agua y los electrolitos ingresan al cuerpo en cantidades variables modificando la composición en el organismo. Los riñones se encargan de variar su excreción para que se encuentren en concentraciones adecuadas por lo tanto, debe haber un equilibrio entre el ingreso y la excreción tanto de agua como de electrolitos,<sup>3</sup> Si los ingresos superan la excreción de una sustancia, ésta incrementará en el cuerpo y si la ingestión es menor que la excreción la cantidad de esa sustancia se reducirá. Un ejemplo de esto es la notable capacidad que tiene el riñón para eliminar el exceso de

sodio ingerido. Se ha descrito que una persona puede incrementar o disminuir 10 veces la ingesta de sodio con cambios relativamente pequeños en el volumen de líquido extracelular o en la concentración plasmática de sodio. Esto aplica también para el agua y la mayoría de los demás electrolitos como los iones de cloro, potasio, calcio, hidrógeno, magnesio y fosfato.<sup>4</sup>

**Regulación de la presión arterial:** El riñón puede regular la presión arterial a través de la excreción variable de sodio y agua. Otro mecanismo importante corresponde es la síntesis de sustancias vasoactivas a través del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) que ejerce un control predominante en la resistencia vascular periférica y por lo tanto en la presión arterial sanguínea. La renina es una enzima sintetizada por las células yuxtglomerulares y liberada cuando desciende la presión arterial. Las células yuxtglomerulares son miocitos modificados situados en las arteriolas aferentes. La renina es una enzima que actúa sobre otra proteína plasmática sintetizada por el hígado que corresponde al angiotensinógeno para liberar angiotensina I, posteriormente la angiotensina I se escinde para formar un péptido de 8 aminoácidos angiotensina II, mediada por la enzima convertidora de angiotensina que es sintetizada principalmente en el endotelio de los capilares pulmonares. La angiotensina II incrementa la presión arterial a través de dos efectos: 1) vasoconstricción de la arteriola eferente y 2) la estimulación de la síntesis de aldosterona con lo cual incrementa la absorción de sodio y agua.<sup>1 3</sup>

**Regulación del equilibrio ácido-base:** La concentración de hidrogeniones influye en casi todos los sistemas enzimáticos del organismo, por lo cual es esencial que esté regulada de forma precisa. Las concentraciones plasmáticas de iones de hidrógeno se ven influidas por diversos procesos: 1) el metabolismo de los alimentos ingeridos, 2) la secreción del tracto gastrointestinal, 3) la producción de ácidos y bases del metabolismo de las grasas y carbohidratos y 4) cambios en la producción de dióxido de carbono. Los riñones juegan un papel principal en la excreción de ácidos y bases para mantener el equilibrio del pH sanguíneo. El componente más importante del equilibrio ácido-base es la concentración del bicarbonato y una de las funciones del riñón es absorber prácticamente la totalidad del bicarbonato filtrado, esto sucede principalmente en el túbulo proximal con la finalidad de conservar el bicarbonato plasmático. De igual forma, en el túbulo proximal se secretan bases o ácidos orgánicos y posteriormente en la nefrona distal (principalmente en los túbulos colectores) se eliminan protones o bicarbonato para garantizar el equilibrio en el organismo.<sup>2 4</sup>

**Regulación de la producción de eritrocitos:** La eritropoyetina (EPO) es una glicoproteína con un peso molecular de 35 kDa es el principal factor de la eritropoyesis, la cual promueve la maduración y diferenciación de la línea eritrocítica en médula ósea. La EPO es sintetizada en el 90% por el riñón, específicamente por las células intersticiales de la región cortico medular. La disminución en el aporte de oxígeno secundario a anemia o hipoxemia es el principal estímulo para la síntesis de EPO.<sup>3</sup>

**Metabolismo de la vitamina D:** La Vitamina D3 (Vit D3) o colecalciferol es una hormona importante en la regulación del calcio (Ca), sin embargo, se requiere su activación a nivel renal para ejercer su función. El primer paso en la conversión del colecalciferol a 25-hidroxicolecalciferol tiene lugar en el hígado. Posteriormente en el epitelio tubular renal a través de la enzima  $1\alpha$ -hidroxilasa se da la conversión de 25-hidroxicolecalciferol en 1-25-dihidroxicolecalciferol o calcitriol, por lo tanto, en insuficiencia renal se pierde la mayoría de su actividad. La función de la Vit D3 activa, principalmente se ejerce en intestino, riñón y hueso. A nivel intestinal aumenta la formación de calbindina una proteína fijadora de Ca en las células epiteliales intestinales promoviendo la absorción de calcio. La absorción del fósforo también es favorecida por la Vit D3. En riñón, la Vit D3 incrementa la reabsorción de Ca y fosfato por parte de las células epiteliales de los túbulos renales por lo tanto disminuye la secreción de esta sustancia. A nivel óseo, la Vit D desempeña importantes funciones relacionadas con la resorción de hueso.<sup>1 4</sup>

## 1.2 Lesión renal aguda y su fisiopatología.

La lesión renal aguda (LRA) no es una entidad patológica individual, se trata de un grupo heterogéneo de condiciones que se caracterizan por una rápida disminución en la función renal y por lo tanto de la tasa de filtrado glomerular (TFG),<sup>5</sup> que trae como consecuencia la acumulación de compuestos nitrogenados como urea y creatinina y la disminución en la producción de orina. Estas anomalías se presentan en horas o días después de haber ocurrido el evento.<sup>6 7 8</sup>

La LRA tiene alta morbilidad, mortalidad y un incremento en el riesgo de consecuencias a largo plazo en los pacientes que sobreviven, aunado a esto, genera un costo adicional importante a los sistemas de salud, así como, una mayor estancia hospitalaria.<sup>9 10</sup> A nivel mundial se ha estimado que la LRA ocurre en 13.3 millones de personas por año, el 85% de las cuales viven en países de mediano o bajo ingreso económico. Se ha reportado que la LRA contribuye con aproximadamente 1.7 millones de muertes por año. En un meta análisis recientemente publicado, que incluyó 700 millones de pacientes que fueron hospitalizados se encontró que el 21% padeció de LRA<sup>11 12</sup> y la incidencia fue mayor en los pacientes críticamente enfermos en la unidad de cuidados intensivos (30 a 70%).<sup>12</sup>

Las causas más frecuentes de LRA se asocian a daño isquémico generalizado o localizado debido a cirugías, sepsis, traumatismos, infecciones, deshidratación y a daño tóxico por medicamentos.<sup>13</sup> En particular, algunos agentes ampliamente utilizados como los son: medios de radiocontraste o medicamentos antiinflamatorios no esteroideos pueden causar daño directo a la nefrona, daño isquémico o ambos.

Durante un episodio de lesión renal aguda, la hipoxia, la inflamación y la formación de radicales libres son los principales mediadores del daño al endotelio y al epitelio renal que caracterizan a esta patología.

### ***1.2.1 El endotelio vascular renal.***

Las células endoteliales fisiológicamente contribuyen al mantenimiento del tono vascular, la regulación del flujo sanguíneo hacia los tejidos, la permeabilidad vascular, la modulación del proceso inflamatorio y la coagulación.<sup>14</sup>

La LRA inicialmente induce daño al endotelio renal que se caracteriza por la disrupción del citoesqueleto de actina provocando el desprendimiento de las células de la monocapa del endotelio. La alteración en el citoesqueleto también afecta las uniones estrechas intercelulares incrementando la permeabilidad vascular y produciendo edema, comprometiendo aún más la perfusión tisular.<sup>15 16</sup> El endotelio tiene una participación clave en el inicio y en la progresión del proceso inflamatorio, puesto que, el daño microvascular induce la activación endotelial junto con la expresión de marcadores de superficie celular como ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular) que promueven la adhesión y reclutamiento de leucocitos y plaquetas.<sup>13</sup> Una vez que el endotelio ha sido afectado, particularmente las arteriolas en la zona post-isquémica sufren vasoconstricción en respuesta al incremento de las concentraciones tisulares de la endotelina, la angiotensina II, el tromboxano A2, la prostaglandina H2, los leucotrienos C4 y D4 y la adenosina, así como, por la estimulación simpática nerviosa<sup>17</sup> (Fig. 1). Aunado a la vasoconstricción, la vasodilatación se ve limitada en respuesta a la disminución de la acetil colina, la bradicinina, el óxido nítrico y otras sustancias vasodilatadoras.<sup>18 15</sup> La consecuencia de estos fenómenos vasoactivos es uno de los efectos de gran importancia que suceden después de la LRA, que corresponde a la disminución en el flujo sanguíneo renal y el sostenimiento de la hipoperfusión renal después de varias horas. A nivel sistémico se ha descrito también disfunción endotelial secundario a daño renal también como consecuencia de un balance inadecuado de las moléculas vasodilatadoras como óxido nítrico y vasoconstrictoras como endotelina afectando a órganos blanco como por ejemplo el corazón.

### ***1.2.2 Epitelio tubular renal.***

El sistema tubular renal da inicio en la región opuesta al polo vascular del glomérulo y está compuesto por el túbulo proximal, asa de Henle, túbulo distal y colector. El epitelio tubular renal está conformado por una capa simple de células cilíndricas o cuboidales adheridas a la membrana basal, de manera particular el las células epiteliales del túbulo

proximal se caracterizan por estar provistas por un prominente borde de cepillo apical y numerosos pliegues basales<sup>19</sup>.

Posterior al estado de hipoxia, las células epiteliales tubulares son incapaces de mantener niveles adecuados de ATP, sufriendo daño y muerte celular principalmente por necrosis y apoptosis<sup>20 21</sup> El epitelio tubular proximal es particularmente más sensible a estados de hipoxia que el resto de los segmentos tubulares; esto es debido a que tiene una demanda metabólica energética más alta y porque tiene una limitada capacidad de glucólisis anaeróbica.

Uno de los componentes del epitelio tubular renal que se afecta de forma preponderante corresponde al citoesqueleto de la actina. El citoesqueleto tiene un papel integral en el mantenimiento de la función y estructura celular, así como, en la polaridad, la endocitosis, la transducción de señales, la motilidad, el movimiento de organelos, la exocitosis, la división celular y la adhesión célula-matriz, de tal modo que el daño al citoesqueleto repercute de diversas formas en la función celular.<sup>14</sup> La disminución de ATP, que resulta después del proceso isquémico, afecta la integridad del citoesqueleto, lo que conlleva a diversas alteraciones como, pérdida del borde de cepillo del epitelio tubular, cambio en la polaridad de la célula, alteración en la localización de las moléculas de adhesión y de las proteínas de membrana como la bomba Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPasa y de las β-integrinas. La relocalización de las β-integrinas de la membrana basal a la membrana apical y la falta de adhesión de las células epiteliales resultan en la exfoliación de células al lumen del túbulo, los restos celulares se combinan con las proteínas de Tamm Horsfall y fibronectina para formar los cilindros que pueden obstruir los túbulos incrementando la presión intratubular<sup>17 18</sup>(Fig. 1).

### ***1.2.3 Proceso inflamatorio después de la lesión renal.***

Durante la LRA se inicia una cascada de inflamación, en donde, las quimiocinas son el principal mediador de este proceso, promoviendo la expresión de moléculas de adhesión y la activación e infiltración de los leucocitos.<sup>22</sup> En el proceso inflamatorio participan células del sistema inmune como los neutrófilos, los monocitos/macrófagos, las células dendríticas, los linfocitos natural killer, entre otras.<sup>18 23</sup> El reclutamiento de los leucocitos es la principal causa de daño endotelial y tubular en todas las fases de la LRA. Inicialmente el proceso



inflamatorio, es caracterizado por la marginación de los leucocitos al endotelio vascular activado, vía la interacción entre las selectinas y los ligandos que ayudan a la adhesión firme. Posteriormente, hay una trans migración de los leucocitos al sitio inflamatorio.<sup>14</sup> Los neutrófilos y los monocitos regulan el proceso inflamatorio en la fase aguda dentro de las primeras 24 h.<sup>13</sup>

El epitelio tubular renal también contribuye a la exacerbación del proceso inflamatorio, ya que sintetiza moléculas proinflamatorias y quimioatrayentes como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , por sus siglas en inglés), la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1, por sus siglas en inglés), el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ , por sus siglas en inglés), quimiocina de regulación por activación expresada y secretada por los linfocitos T (RANTES por sus siglas en inglés o CCL5), proteína epitelial activadora de neutrófilos (ENA-78, por sus siglas en inglés) y las interleucinas IL8, IL6, IL1- $\beta$ , que activan a las células inflamatorias (Fig. 1). El epitelio tubular también expresa receptores tipo toll (TLRs por sus siglas en inglés),<sup>24</sup> que son una familia de receptores transmembranales que detectan antígenos exógenos microbianos o ligandos endógenos liberados de las células dañadas. Varios estudios han demostrado que la prevención del proceso inflamatorio a través de la inhibición de neutrófilos y monocitos/macrófagos o el bloqueo de las interacciones leucocito-célula endotelial tiene un efecto renoprotector.<sup>25 26</sup>

#### ***1.2.4 Mecanismos de daño oxidante.***

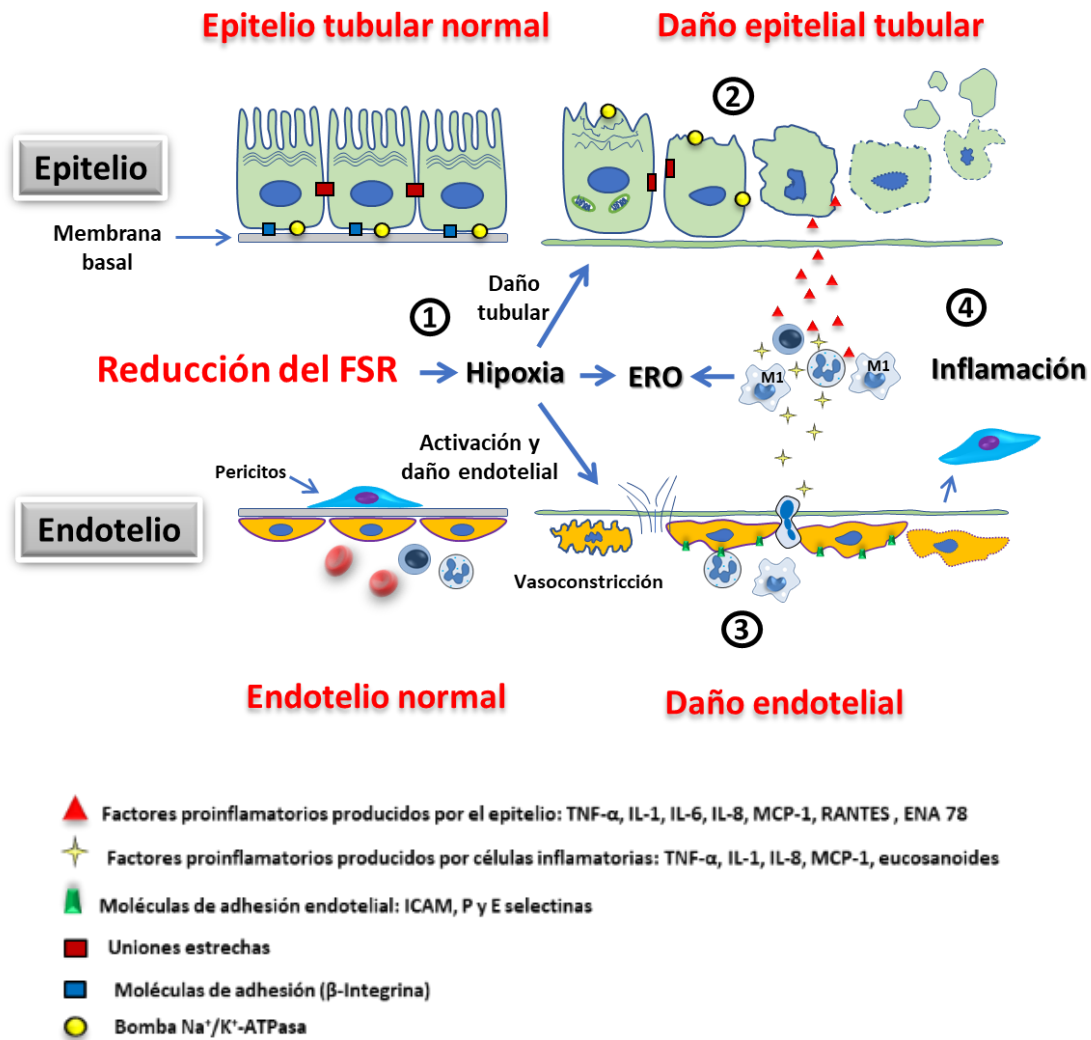
El estrés oxidante juega un papel primordial en la fisiopatología tanto de la LRA, como de la enfermedad renal crónica (ERC),<sup>27 28 29 30</sup> ya que puede afectar la hemodinámica renal al reducir la capacidad vasodilatadora del óxido nítrico o al producir daño en las células endoteliales e inducir daño del epitelio tubular al promover la muerte celular por apoptosis o necrosis.<sup>28</sup>

Las principales especies reactivas de oxígeno (ERO) que pueden participar en el daño renal son: el anión superóxido, el cual es generado por diversas enzimas oxidasas y por los componentes de la cadena de transporte de electrones; el peróxido de hidrógeno que puede ser formado por reducción directa del oxígeno o puede provenir de la dismutación del superóxido; el radical hidroxilo, el cual se produce a partir de la reacción de Fenton y el ácido hipocloroso, que es sumamente reactivo y se forma por la mieloperoxidasa

de células fagocíticas cuando se metaboliza el peróxido de hidrógeno.<sup>28</sup> De igual forma existen antioxidantes que intentan proteger la integridad celular de las ERO, dentro de los más importantes se encuentran las enzimas: superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y tioredoxina reductasa.<sup>27 28</sup> Es ampliamente conocido que durante cualquier enfermedad renal, los antioxidantes intracelulares se encuentran disminuidos lo que resulta en el incremento del estrés oxidante en el tejido.<sup>27</sup>

Una de las fuentes más importantes de la generación de ERO corresponde a la mitocondria. Este orgánulo en células renales normalmente produce pocas cantidades de ERO, las cuales sirven para procesos de señalización celular.<sup>31</sup> Bajo condiciones patológicas, el desacople de la fosforilación oxidativa y la pérdida en la integridad de la membrana mitocondrial inducen excesiva cantidad de ERO provenientes de la cadena respiratoria, particularmente del complejo I y III.<sup>30</sup> La producción de superóxido en la mitocondria es aumentada por diferentes estímulos fisiopatológicos como: la angiotensina II, el TNF- $\alpha$ , la hiperglucemia y la oxidación de los lípidos de baja densidad, entre otros. Particularmente las células tubulares proximales poseen abundantes mitocondrias, lo cual indica que son altamente vulnerables al daño causado por estrés oxidante.<sup>24 32</sup> La desregulación mitocondrial además, se caracteriza por la disminución en la respiración celular y menor producción de ATP, así como, por la liberación de factores proapoptóticos que finalmente determinan el daño al epitelio tubular.<sup>27</sup>

Otra fuente frecuente de ERO en la LRA corresponde al infiltrado de células inflamatorias, principalmente neutrófilos y macrófagos, las cuales además de liberar una gran cantidad de citosinas proinflamatorias sufren el denominado estallido respiratorio o explosión oxidante, generando los radicales libres: superóxido, hidroxilo, ácido hipocloroso y peróxido de hidrógeno<sup>28</sup> (Fig. 1). En sentido inverso, las ERO incrementan el proceso inflamatorio e inducen la liberación de citosinas proinflamatorias, por lo tanto, ambos procesos están íntimamente relacionados en los diferentes tipos de enfermedad renal<sup>29 33</sup> (Fig. 1).



**Figura 1.** Integración de los mecanismos y componentes involucrados en la lesión renal aguda. **1.** La lesión renal aguda da inicio con la reducción del flujo sanguíneo renal (FSR) que induce hipoxia. **2.** La hipoxia y la producción de ERO (especies reactivas de oxígeno) provocan daño en el epitelio tubular renal caracterizada por alteración del citoesqueleto, pérdida del borde de cepillo, despolarización de la célula, disrupción de las células de la membrana basal y muerte celular por necrosis y apoptosis. **3.** La hipoxia y las ERO también inducen daño y activación del endotelio, incremento en la permeabilidad vascular, aumento en la expresión de las moléculas de adhesión endotelial, migración de células inflamatorias y desprendimiento de pericitos. **4.** Se establece el proceso inflamatorio incluyendo neutrófilos, macrófagos y linfocitos.

### 1.3 Transición de lesión renal aguda a enfermedad renal crónica.

Anteriormente se pensaba que los pacientes que sobrevivían a un episodio de LRA y que presentaban una recuperación de la función renal no tendrían consecuencias a largo plazo.<sup>34</sup> En los últimos años esta idea ha cambiado puesto que diversos estudios experimentales y epidemiológicos demuestran que la LRA es un factor eminente de riesgo para conducir a enfermedad renal progresiva.<sup>12 35</sup>

En un meta-análisis que incluyó 13 estudios de pacientes que sobrevivieron a un episodio de LRA, se evaluaron las consecuencias renales a largo plazo, en los resultados se encontró una incidencia de ERC y de enfermedad renal crónica terminal (ERCT) del 25.8% y del 8.6%, respectivamente.<sup>36</sup> También se ha reportado que los pacientes con mayor severidad de LRA, medido por el aumento en la concentraciones de creatinina sérica, tienen mayor riesgo de una evolución más rápida a ERC y de mayor severidad.<sup>37</sup> En adultos mayores el riesgo de ERCT, después de un episodio de LRA, se incrementa de 2 a 13 veces.<sup>38</sup> Se podría considerar la posibilidad de que la ERC en personas mayores sea consecuencia de otros padecimientos secundarios, aunque en otro estudio realizado en 126 niños que presentaron LRA sin ningún otro padecimiento, el 10% desarrolló ERC en un lapso comprendido entre 1 y 3 años.<sup>39</sup>

La transición de la LRA a ERC ha atraído la atención de varios investigadores incluyendo a nuestro grupo, quienes hemos tratado de dilucidar los mecanismos responsables de la transición, a pesar de esto, todavía existen muchas interrogantes en este proceso.

Posterior al inicio de la LRA, se espera que haya una recuperación completa de la función y la estructura renal, sin embargo, esto no sucede en todos los casos, ya que, la reparación puede ser incompleta. En este sentido, el grupo de trabajo de la 13ª conferencia de la ADQI (Acute Dialysis Quality Initiative) ha definido la reparación completa como la resolución de la estructura y función renal sin secuelas a largo plazo por un lapso de 90 días. Mientras que, la reparación incompleta se definió como un proceso a lo largo del tiempo, que resulta de daño estructural, fibrosis renal y con la consecuente reducción progresiva de la función renal.<sup>40</sup>

Varios estudios, incluyendo los de nuestro laboratorio, han mostrado que un sello distintivo de la reparación incompleta y por lo tanto de la transición de la LRA a ERC en la rata es la persistencia del proceso inflamatorio, proliferación del epitelio tubular y excesiva

deposición de matriz extracelular, con la consecuente aparición de fibrosis túbulo-intersticial.<sup>41 42 43 44</sup>

### ***1.3.1 Epitelio tubular renal.***

El epitelio tubular renal juega un papel central en la respuesta fibrótica que conlleva a la ERC progresiva.<sup>45 46</sup> Existe un interés en estudiar la capacidad de regeneración principalmente del túbulo proximal renal y de las células progenitoras que lo facilitan. En ese sentido, se conoce que después de la LRA, las células epiteliales tubulares que sobreviven son las principales responsables de la regeneración tubular.<sup>47</sup> El mecanismo por el cual, las células tubulares promueven la fibrosis renal es complejo, sin embargo, varios estudios ha descrito que ocurre una reparación incompleta debido a que, las células epiteliales pierden la capacidad de rediferenciarse y recuperar su estructura normal, y por lo tanto hay un arresto patológico de estas células en la fase G2/M del ciclo celular. Estas células anormales tienen una intensa actividad de señalización y expresan citocinas profibróticas que promueven la infiltración intersticial de células inflamatorias y la proliferación de fibroblastos.<sup>45 48 49</sup> Se ha reportado que las células arrestadas en G2/M sintetizan factores profibróticos asociados a la activación de la vía de señalización de la cinasa Janus (JNK, por sus siglas en inglés), lo que facilita la producción principalmente de TGF- $\beta$ 1 y del factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF, por sus siglas en inglés)<sup>40 48</sup> (Fig. 2).

La relevancia de la participación del epitelio tubular en la progresión a ERC, se hace todavía más evidente con los estudios recientes que demuestran que la lesión específica y aislada del túbulo proximal fue suficiente para inducir la activación de la respuesta inflamatoria, rarefacción vascular y fibrosis renal, a pesar de que las células endoteliales no fueron directamente dañadas.<sup>46 50 51</sup>

### ***1.3.2 El endotelio renal.***

Una de las complicaciones de la LRA a largo plazo corresponde a la disminución en la densidad capilar peritubular, conocida como rarefacción vascular.<sup>52</sup> En este sentido, se ha demostrado que la densidad capilar se reduce hasta en un 45%, cuatro semanas después de inducir LRA en modelos murinos.<sup>53 54 55</sup> Esto indica que a diferencia del epitelio

tubular, la vasculatura tiene menos potencial de regeneración.<sup>15</sup> Se ha postulado que la ausencia de la reparación vascular es debido a la reducción en la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés),<sup>53 56</sup> lo que causa alteraciones en la integridad endotelial, disminución en la densidad capilar, defectos en la perfusión tisular e hipoxia.<sup>49</sup> A este respecto, se ha demostrado que la administración del VEGF después de la isquemia preserva la densidad capilar en la rata.<sup>57</sup> La rarefacción vascular puede ser un elemento clave en el desarrollo de fibrosis, puesto que mantiene al tejido renal en un estado de hipoxia crónica, lo que a su vez inicia la activación de las vías de señalización inducidas por hipoxia<sup>37</sup> y se ha determinado que la densidad capilar renal correlaciona con la severidad de la fibrosis renal<sup>54</sup> (Fig. 2).

Es ampliamente aceptado que la hipoxia renal crónica es la vía común para la progresión de la ERC, inclusive se ha considerado como un blanco terapéutico para la transición de LRA a ERC.<sup>56 58</sup> Existe un círculo vicioso entre el daño tubular y la hipoxia, ya que, como se explicó anteriormente, la hipoxia es causada por la rarefacción vascular, que a su vez impide la rediferenciación y regeneración de los túbulos perpetuando así, la disminución del VEGF y manteniendo la rarefacción vascular.

La hipoxia tiene también otros efectos deletéreos, pues es causante de apoptosis en células epiteliales renales y puede activar fibroblastos locales, contribuyendo así a la fibrogénesis.<sup>56</sup> La fibrosis agrava aún más la hipoxia, reduciendo la eficiencia en la difusión del oxígeno a través del incremento de la distancia entre los capilares y los túbulos.<sup>59</sup> Además, estudios *in vitro* han vinculado a la hipoxia con el proceso inflamatorio, debido a que induce la adhesión leucocitaria al endotelio a través de la activación de la integrina  $\beta 2$ .<sup>60</sup> No está totalmente claro cómo es que persiste la rarefacción vascular y la hipoxia crónica, debido a que durante la hipoxia se debe activar al factor inducido por hipoxia (HIF, por sus siglas en inglés) que inicia la inducción de múltiples factores angiogénicos para estimular una respuesta vascular compensatoria, sin embargo, casi siempre este mecanismo no es suficiente para evitar la rarefacción vascular.<sup>61</sup>

### ***1.3.3 Origen de las células que inducen fibrosis renal (miofibroblastos).***

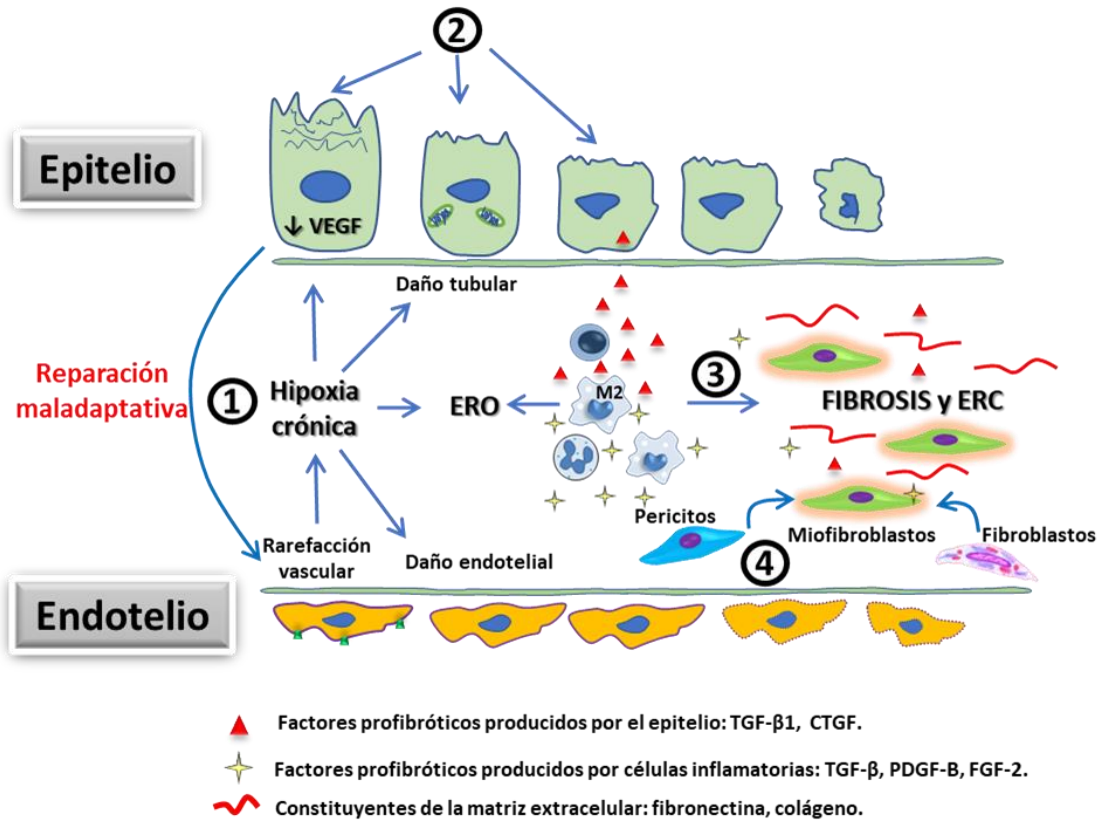
Si bien está claro que los miofibroblastos son las células encargadas de la síntesis de tejido conectivo que da origen a la fibrosis, tanto en el riñón como, en otros órganos, el origen de los miofibroblastos está en debate y ha estimulado intensa investigación al respecto.<sup>49 52</sup> Identificar los miofibroblastos en riñón ha sido un reto, ya que requiere una combinación de criterios que incluye localización, morfología y marcadores de expresión.<sup>62</sup> Varios grupos han demostrado que principalmente los pericitos son las células que contribuyen a la acumulación de miofibroblastos a través de la transdiferenciación de pericito-miofibroblasto<sup>6 49 63</sup>(Fig. 2). Los pericitos son células especializadas que se encuentran adheridas a células endoteliales y mantienen la estabilidad e integridad vascular involucrando la liberación de factores como: VEGF-A, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por sus siglas en inglés), angiopoyetina, y TGF- $\beta$ .<sup>52 64</sup> Aunque los mecanismos responsables de la disociación de los pericitos de la célula endotelial están en investigación, se ha descrito que la disminución del VEGF-A, puede inducir la inestabilidad capilar y la liberación de los pericitos al intersticio, con la subsecuente transdiferenciación a miofibroblastos. La pérdida de pericitos del endotelio vascular, aunado a su participación en la fibrosis renal, causa inestabilidad en los capilares contribuyendo así, a la rarefacción vascular.<sup>64</sup> También, se ha reportado que este proceso se acompaña de la sobre-regulación de los receptores  $\beta$  y  $\alpha$  de PDGFR (PDGFR- $\beta$  y PDGFR- $\alpha$ ), mientras que, el bloqueo de estos receptores previene la disociación de los pericitos.<sup>63</sup> La estabilidad vascular y por lo tanto, la de los pericitos también se ve reducida después del daño renal por alteraciones en la regulación del inhibidor tisular de metaloproteinasas (TIMP-3, por sus siglas en inglés), la desintegrina y la metaloproteinasa con motivos de trombospondina (ADAMTS1, por sus siglas en inglés) que son proteínas que regulan la proteólisis y angiogénesis en el pericito.<sup>65</sup>

Otras células que podrían estar involucradas en el origen de los miofibroblastos son fibroblastos residentes, las células derivadas de la médula ósea, las células endoteliales y las células productoras de eritropoyetina.<sup>66</sup> También, se ha sugerido la posibilidad de que los miofibroblastos tuvieran su origen derivado del epitelio tubular dañado, por el proceso de transdiferenciación epitelio-mesénquima, sin embargo, algunos estudios ponen en duda esta afirmación.<sup>62 66 67</sup>

### ***1.3.4 El proceso inflamatorio persistente después de lesión renal.***

Después del daño renal, el proceso inflamatorio se establece inicialmente como respuesta de protección, para tratar de eliminar la causa y promover la reparación del tejido, sin embargo, ésta también puede ocasionar fibrosis progresiva<sup>68</sup> (Fig. 2). Los macrófagos particularmente juegan un papel central, tanto en la reparación del tejido afectado, como en la promoción del daño,<sup>13</sup> induciendo fibrosis y progresión a ERC al generar citocinas profibróticas entre las que se incluyen TGF- $\beta$ , PDGF-B, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2, por sus siglas en inglés), entre otras, las cuales promueven la proliferación y la sobrevivencia de miofibroblastos, que a su vez, producen constituyentes de la matriz extracelular.<sup>6 66 69</sup> Los macrófagos estimulados son capaces también de sintetizar fibronectina y colágeno contribuyendo con esto a la fibrosis. Después de la LRA se ha demostrado la presencia de dos subtipos de macrófagos que pueden diferenciarse bajo la influencia del microambiente local.<sup>23 68 69</sup> Los macrófagos tipo 1 (M1) (inducidos por interferón y lipopolisacáridos) que migran inmediatamente después del daño y se encargan de la producción de moléculas proinflamatorias, y los los macrófagos tipo 2 (M2) (estimulados por IL-4 e IL13) que surgen en la fase de recuperación de la LRA y que sintetizan factores profibróticos que ayudan a la proliferación de las células tubulares y la reparación del daño. Los M2 se han subclasificado en M2a (profibróticos o de reparación), M2b (inducidos por complejos inmunes) y M2c (antinflamatorios).<sup>68</sup>





**Figura 2.** Integración de los mecanismos y componentes involucrados en la transición de lesión renal aguda (LRA) a enfermedad renal crónica (ERC). **1.** La hipoxia y las especies reactivas de oxígeno (ERO) causan daño persistente al epitelio tubular y reducen la producción de VEGF (factor de crecimiento endotelial y vascular) lo cual ocasiona rarefacción vascular y disfunción endotelial. **2.** El epitelio tubular dañado es incapaz de diferenciarse y se arresta en la fase G2/M del ciclo celular provocando la síntesis de factores profibróticos y proinflamatorios aunado a disfunción mitocondrial y atrofia tubular. **3.** Se establece un proceso inflamatorio y los macrófagos promueven fibrosis y progresión de la ERC. **4.** Los pericitos se desprenden del endotelio transdiferenciándose a miofibroblastos y contribuyendo a la inestabilidad vascular y síntesis de moléculas profibróticas y matriz extracelular.

## 1.4 La desnutrición, el desarrollo fetal y su influencia en la salud y la enfermedad.

### 1.4.1 Desnutrición en el mundo y México.

La malnutrición es un término general que hace referencia a la desnutrición o a la sobrealimentación. La desnutrición se define como la ingesta insuficiente de alimentos y nutrientes para las necesidades del organismo y se manifiesta como bajo peso o retardo en el crecimiento para la edad.<sup>70</sup> Se ha estimado que durante el 2017, el número de personas subalimentadas alcanzó los 821 millones, lo cual representa una persona de cada 9 alrededor del mundo, pero en particular en países subdesarrollados.<sup>71</sup> Aunado a esto, la anemia en mujeres en edad reproductiva también está aumentando a nivel mundial puesto que se presenta en un 34.8%, lo que representa un problema de atención inmediata.<sup>71</sup> Los niños desnutridos suelen ser la población más vulnerable, ya que tienen consecuencias importantes como limitaciones relacionadas con retraso en el crecimiento, deficiente estado inmunitario, enfermedades infecciosas recurrentes, incapacidad para recuperarse de enfermedades, deficiencias para aprender y para realizar actividades físicas.<sup>72</sup> Se conoce que 151 millones de niños menores de 5 años en todo el mundo (aproximadamente el 22%) están afectados por retraso en el crecimiento y 51 millones por emaciación por lo cual son una población vulnerable y corren mayor riesgo de morbilidad y mortalidad.<sup>71</sup> Se ha estimado que el 45% de las muertes de niños menores de 5 años está relacionada con malnutrición.<sup>73</sup> Dadas estas cifras, prevenir la desnutrición es un reto importante para los países e incluye una adecuada alimentación, antes y durante la gestación y la lactancia, además de que el niño sea alimentado con leche materna por 2 años, alimentos seguros y saludables durante la infancia y accesos a servicios básicos y actividad física.<sup>72</sup>

En México, las fuentes fundamentales para evaluar y monitorear los indicadores de salud de la población han sido las Encuestas Nacionales de Salud y Nutrición (ENSANUT), las cuales en las últimas dos décadas se han convertido en un insumo primordial para estudiar la magnitud, distribución y tendencias de los padecimientos que afectan a la sociedad con más frecuencia y de esta forma se establezcan programas y políticas públicas en materia de salud y nutrición.

La seguridad alimentaria en la población en pobreza o marginación es uno de los retos más importantes para lograr el bienestar en la población. Derivado de los resultados

de la encuesta ENSANUT 2012, se reportó que alrededor de un tercio de los hogares en México se encuentran en las formas más graves de inseguridad alimentaria y los más afectados son los estados del sur, los hogares indígenas y los hogares en pobreza.<sup>74</sup> En los resultados de la encuesta ENSANUT 2018, 4 de cada 10 hogares mexicanos de menor nivel socioeconómico y que habitan en localidades menores de 100,000 habitantes se encuentran en inseguridad alimentaria moderada o severa.<sup>75</sup> Desde luego estos resultados impactan en el estado nutricional de los mexicanos. Cuevas-Nasu y colaboradores 2019, describieron la prevalencia de desnutrición infantil y algunas características sociodemográficas asociadas con la desnutrición crónica en menores de 5 años de localidades de menos de 100,000 habitantes. Sus resultados revelan que el 4.4% de los niños tienen bajo peso, el 14.9% desnutrición crónica y el 1.5% emaciación.<sup>76</sup> La desnutrición crónica infantil se presentó con mayor prevalencia en hogares indígenas, hogares de mayores carencias socioeconómicas y con inseguridad alimentaria. Como se mencionó anteriormente, los niños que sufren de desnutrición pueden tener daños irreversibles en el desarrollo cerebral, lo que impide que desarrollen plenamente su potencial físico y cognitivo.

La anemia es también un problema de salud pública principalmente en países de ingresos medios y bajos,<sup>77</sup> aunque sus causas pueden ser multifactoriales, la nutrición juega un papel importante. Este padecimiento es una de las causas más importantes de morbilidad-mortalidad materna e infantil, partos prematuros, bajo peso al nacer, capacidad disminuida para realizar trabajo físico y baja productividad en la vida adulta, lo que provoca menor desarrollo económico. En México, el 34.3% de las mujeres en edad reproductiva presentó anemia.<sup>77</sup> Los factores asociados con la presentación de anemia fueron: pertenecer a categorías más severas de inseguridad alimentaria en el hogar y vivir en áreas urbanas. Las causas son diversas, pero algunas de las detectadas fueron deficiencia de hierro, pobre consumo de factores potenciadores de la absorción (vitamina C y carne) e infecciones, entre otras. En el caso de las mujeres embarazadas, la desnutrición puede tener repercusiones graves particularmente durante la gestación y/o la lactancia resultando en consecuencias negativas en la vida adulta.<sup>78 79</sup>

Los padecimientos previamente mencionados (la inseguridad alimentaria, la desnutrición y la anemia) tienen un factor común que corresponde a la pobreza, que también representa uno de los retos más importantes para este país. En México, de acuerdo con el informe del 2018 del Consejo Nacional de Evaluación de la Política de Desarrollo

Social (CONEVAL) el 41.9% de la población (52.4 millones de personas) se encuentran en pobreza y el 7.4 % en pobreza extrema (9.3 millones de personas).

Como se mencionó, lo anterior es un problema de salud pública, pero también refleja una distribución inequitativa de la riqueza y un sistema de salud ineficiente que no garantiza la cobertura y el acceso efectivo y universal a sus servicios.

#### ***1.4.2 Concepto DOHaD (Developmental Origin in Health and Disease).***

Existen suficientes evidencias en animales y en humanos que demuestran que la alteración del ambiente intrauterino durante la gestación repercute de forma importante en el desarrollo de los organismos.<sup>79 80 81</sup> A este fenómeno se le llamó “programación del desarrollo”, el cual se refiere a la exposición de eventos adversos durante la etapa de desarrollo prenatal o posnatal temprana que causan cambios permanentes en la fisiología, metabolismo o epigenoma de un individuo y que subsecuentemente puede verse afectado en su salud e incrementar el riesgo de presentar enfermedades.<sup>80</sup> Actualmente, el término más apropiado es DOHaD (por sus siglas en inglés Developmental Origin of Health and Disease) que se puede traducir como el origen durante el desarrollo de la salud y la enfermedad. De forma más específica el concepto DOHaD propone que ciertos microambientes durante el desarrollo pueden influenciar la respuesta individual a los retos presentados en la vida adulta en términos de susceptibilidad o resiliencia y no necesariamente a que inevitablemente puede presentar determinada enfermedad.<sup>82</sup> El área de investigación en DOHaD ha sido cada vez más aceptado por la comunidad científica en el área médica y ciencias biológicas y ha tenido una expansión importante en sus líneas de estudio. Desde el establecimiento en el 2003 de la sociedad internacional en el campo de DOHaD, el reconocimiento científico y social ha venido en aumento debido a que ofrece una perspectiva más amplia que incluye el desarrollo fetal como determinante de la salud o enfermedad en la edad adulta y su asociación con una amplia variedad de enfermedades crónicas no transmisibles, que hoy en día son causantes del 72% de las muertes a nivel mundial.<sup>82</sup> Debido a esto, el creciente interés está relacionado con las principales enfermedades que afectan a la sociedad y los conocimientos derivados de esta área, están contribuyendo en el desarrollo de políticas públicas. Conforme se avanza en la investigación científica se han sumado cada vez más patologías que pueden tener su origen en el desarrollo fetal, dentro de las cuales se encuentran enfermedades cardiovasculares,

renales, metabólicas, pulmonares crónicas, algunos tipos de cáncer, osteoporosis, déficit cognitivo y más recientemente enfermedades mentales.<sup>82</sup>

Tanto la gestación como la lactancia, son periodos críticos que se caracterizan por alto grado de plasticidad y elevada tasa de proliferación celular para la formación de tejidos y órganos, por lo tanto, la exposición a un ambiente intrauterino adverso en estas etapas críticas repercute negativamente en el desarrollo y se ve reflejado en la vida adulta.<sup>83</sup> Dichas exposiciones incluyen desnutrición, sobrealimentación, malnutrición, teratógenos como contaminación, drogas, alcohol, ambiente hormonal alterado, sobrepeso, obesidad, exceso de ganancia de peso gestacional, diabetes mellitus, estrés materno, estrés oxidante por hipertensión o insuficiencia placentaria.

En términos generales se pueden establecer tres mecanismos no mutuamente excluyentes, que pueden estar involucrados en una programación negativa durante el desarrollo:

- 1) Cambios estructurales permanentes en órganos o tejidos: Estos cambios debido a que son permanentes pueden contribuir al desarrollo de enfermedad crónica. Durante la organogénesis la escasa cantidad de nutrientes son utilizados para órganos vitales como cerebro o corazón causando una exacerbada limitación de nutrientes a órganos viscerales como páncreas, hígado y riñones. Si un nutriente se restringe durante una etapa crítica del desarrollo ese reto nutricional puede resultar en alteraciones permanentes en la función celular, estructura del órgano y la consecuente función del mismo.<sup>84 85</sup>
- 2) Envejecimiento celular acelerado: Se han propuesto varias causas para explicar el envejecimiento, incluido estrés oxidante, inflamación y un ambiente hormonal alterado. El estrés oxidante puede inducir daño en el DNA, mutaciones puntuales, rompimiento directo del DNA, función celular alterada y envejecimiento celular.<sup>80 85</sup>
- 3) Epigenética: La epigenética se refiere a los cambios heredables mitóticos o meióticos, en la expresión del gen, que no pueden ser explicados por los cambios en la secuencia de DNA. Los mecanismos específicos de programación epigenética de la expresión del gen incluyen metilación del DNA, modificación de varias histonas, proteínas de unión autorregulatorias del DNA y RNA no codificantes.<sup>86</sup>

Generalmente se ha pensado que las enfermedades no transmisibles (ENT), como el caso de enfermedades renales y cardiovasculares, hipertensión, síndrome metabólico o

diabetes mellitus, tienen predominantemente un componente genético o que están asociadas al estilo de vida de la población afectada. Aunque estos factores son importantes, el modelo DOHaD ofrece una teoría alterna más completa que explica la alta prevalencia de estas enfermedades y en particular en países en desarrollo.<sup>87</sup> Este abordaje permite diseñar estrategias de intervención que incluyan la óptima alimentación de la madre con el objetivo de impactar positivamente el desarrollo fetal y por lo tanto en la salud del niño con el objetivo de reducir la presentación y prevalencia de las ENT.

### ***1.4.3 La desnutrición durante la gestación y su efecto en el desarrollo fetal.***

El desarrollo fetal está influenciado por tres factores: el estado nutricional de la madre durante el embarazo, la función placentaria y la capacidad del feto para utilizar los nutrientes.<sup>88</sup> La nutrición materna juega un papel fundamental en el adecuado crecimiento y desarrollo del feto. La falta de nutrientes durante la gestación puede producir alteraciones permanentes tanto estructurales como funcionales.<sup>89</sup> El impacto a largo plazo dependerá del momento de la gestación en el que se produjo la desnutrición, de su duración e intensidad, el tipo de nutriente, la especie, el sexo y cada órgano o tejido tiene un periodo crítico o sensible de mayor replicación celular durante el cual se verá más afectado.<sup>89</sup> Como se mencionó anteriormente, existe una amplia variedad de enfermedades en la vida adulta asociadas a desnutrición durante el embarazo. Un ejemplo que se suele citar frecuentemente son las mujeres holandesas embarazadas durante la hambruna en la Segunda Guerra Mundial ocurrida entre 1944 y 1945, en donde el consumo de calorías se disminuyó en un 50% y los hijos de estas madres desarrollaron en la edad adulta diversas patologías. En este estudio encontraron, que si la restricción de nutrientes era en el primer, segundo o tercer trimestre de gestación, tenía una clara influencia en el tipo de enfermedad que presentarían los hijos en el futuro, estableciendo así cual órgano o sistema sería el afectado. Las personas expuestas a desnutrición materna en el primer trimestre de gestación fueron más susceptibles a la presentación de enfermedad cardíaca coronaria, perfil lipídico alterado, mayor obesidad e incrementos en el fibrinógeno plasmático. La desnutrición en el segundo trimestre de gestación se relacionó con enfermedad obstructiva de vías respiratorias y el incremento en la prevalencia de microalbuminuria y la desnutrición durante el tercer trimestre de gestación se asoció con alteración en la prueba de tolerancia a la glucosa.<sup>90</sup> En este tipo de estudios epidemiológicos en humanos no es posible

determinar los mecanismos moleculares de la programación, por lo cual resulta indispensable el uso de modelos animales.

Algunos de los mecanismos que alteran el desarrollo fetal, que se han descrito de forma específica asociado a deficiencia de nutrientes incluyen: vías de señalización sensible a nutrientes,<sup>91</sup> estrés oxidante,<sup>92</sup> remodelación tisular,<sup>85</sup> modificaciones epigenéticas<sup>86</sup> y alteraciones en la microbiota intestinal.<sup>93</sup>

Contrariamente a todo lo que se ha expuesto, en algunas ocasiones los eventos adversos intrauterinos pueden tener ciertas ventajas conferidas por la plasticidad en el desarrollo. La plasticidad involucra la capacidad de un genotipo a producir más de una forma alternativa de estructura y estado fisiológico o comportamiento en respuesta a condiciones ambientales.<sup>84</sup> Desde una perspectiva evolutiva biológica, la plasticidad de un organismo en desarrollo forma parte de un proceso adaptativo, ya que los cambios inducidos durante el desarrollo fetal, capacitan al organismo para la sobrevivencia, aunque éste pueda tener un costo a largo plazo.<sup>94</sup>

Si bien no hay una prueba específica que permita conocer si ha sucedido un efecto adverso intrauterino, se puede hacer uso de los datos clínicos para aproximarse. Uno de los marcadores más importantes es el peso al nacimiento, el cual nos habla de una salud y nutrición materna y fetal adecuada.<sup>95</sup> El bajo peso al nacimiento (BPN) es definido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como el nacimiento de niños con un peso menor a 2,500 g. Las causas del BPN incluyen malnutrición materna (anemia, bajo peso), enfermedades maternas (hipertensión, diabetes, infecciones), características maternas (corta o avanzada edad y múltiples partos) u otros factores de riesgo (fumadoras, alcoholismo, fármacos innecesarios).<sup>96</sup> La reducción de la prevalencia del BPN sigue siendo reconocida como una prioridad a nivel mundial debido a las consecuencias que pueden padecer estos niños en la vida adulta, no solo porque se asocia a un riesgo mayor de padecer complicaciones en el periodo neonatal y a un aumento en la mortalidad perinatal, sino que también se asocia con un mayor riesgo de padecer enfermedades crónicas como: diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular, hipertensión, deficiencias cognitivas, entre otras.<sup>87 97</sup> La UNICEF estimó que a nivel mundial 1 de cada 7 niños nacidos (14.6%, 20.5 millones) padecen BPN presentándose más de la mitad de los casos en Asia.<sup>96</sup>

#### **1.4.4. Programación renal durante el desarrollo y sus implicaciones clínicas.**

Existe un consenso general de que en los humanos cada riñón tiene aproximadamente 1 millón de nefronas al nacimiento, sin embargo, se conoce que hay gran variabilidad entre individuos.<sup>98</sup> Esto sugiere una influencia importante al momento del desarrollo fetal sobre la nefrogénesis. Existen numerosas condiciones que pueden influenciar la nefrogénesis durante el desarrollo incluyendo la restricción del crecimiento intrauterino, nacimientos prematuros, intervenciones farmacológicas, inadecuada nutrición, contaminantes ambientales, etc.<sup>99</sup>

Desde que se describió que el BPN, ya sea asociado a nacimientos prematuros (<37 semanas de gestación) o por restricción del crecimiento intrauterino (RCIU), es un antecedente para el desarrollo de enfermedades renales y cardiovasculares,<sup>100</sup> se le ha dado importancia a este dato clínico y ha promovido la investigación en búsqueda de la explicación de esta asociación. Diversos estudios epidemiológicos han demostrado que existe una correlación positiva entre el BPN y un reducido número de nefronas,<sup>101</sup> por lo tanto, el BPN también es un marcador robusto del déficit de nefronas.<sup>90 102</sup> Personas que nacieron con un número menor de nefronas, a diferencia de los que tuvieron la cantidad adecuada, son más susceptibles a desarrollar hipertensión y disfunción renal, en particular después de padecer alguna otra complicación que promueve una pérdida adicional de nefronas, como es el caso de diabetes mellitus o hipertensión, ambas enfermedades muy prevalentes en las personas adultas.<sup>87</sup>

Las consecuencias clínicas en humanos producto de una reducida cantidad de nefronas fueron propuestas por primera vez por Brenner *et al* en 1988<sup>103</sup> sugiriendo que estos individuos podrían estar predispuestos a enfermedades como hipertensión arterial y enfermedad renal crónica. Posteriormente, se confirmó que la disminución de nefronas, ya sea de forma adquirida o congénita se puede asociar a hipertrofia, hiperfiltración e hipertensión glomerular.<sup>98 104</sup> Inicialmente éstos son mecanismos compensatorios adaptativos, pero que, conforme pasa el tiempo puede favorecer todavía a una mayor pérdida de nefronas que conlleve a enfermedad renal crónica progresiva.<sup>87</sup>

Histológicamente el tamaño glomerular varía de forma inversa con el número de nefronas, de hecho la glomerulomegalia es también un marcador indicativo del reducido número de nefronas.<sup>98</sup> Aunado a los cambios estructurales se ha visto que niños con BPN



y prematuros tienen una TFG reducida al nacimiento y un incremento en el riesgo de presentar microalbuminuria.<sup>100</sup>

#### ***1.4.5 La restricción proteínica y su influencia en el desarrollo renal.***

Como se ha explicado anteriormente, la nutrición materna antes de la concepción y durante el embarazo es un factor crucial que puede influenciar el desarrollo renal durante la vida fetal. Diversos estudios han explorado el efecto de la deficiencia de hierro, vitamina A, calcio, zinc, ácido fólico, restricción proteínica y calórica entre otras y los fenotipos pueden ser revertidos con la suplementación de los nutrientes demostrando la importancia de una nutrición óptima para el desarrollo adecuado del tejido renal.<sup>79 99 102</sup>

De manera particular, se ha reportado que la restricción proteínica (RP) en ratas durante la gestación induce cambios morfo-funcionales relacionados principalmente con nefrogénesis deficiente.<sup>105 106</sup> En el año de 1968 Zeman FJ, describió por primera vez que la deficiencia severa de proteína materna trae como consecuencias disminución en el número de nefronas en las crías, así como, menor proporción de glomérulos bien diferenciados.<sup>107</sup> En estudios posteriores este hallazgo ha sido consistente, reportando una reducción entre el 20 y 30% de nefronas dependiendo del grado de RP.<sup>105 108 109 110 111</sup> Aunque los mecanismos no han sido dilucidados del todo, se han sugerido cambios en la expresión de genes involucrados en la transformación de mesénquima a epitelio<sup>112</sup> y en los genes que participan en las vías de señalización de la nefrogénesis,<sup>113</sup> así como, la regulación a la baja de microRNAs específicos que alteran función, estructura y cantidad de nefronas.<sup>114</sup> Otro mecanismo descrito corresponde al incremento de apoptosis de las células mesenquimales de la zona nefrogénica, principalmente al inicio de la metanefrogénesis de los riñones en desarrollo.<sup>110 115 116</sup> Diversos autores han propuesto que la supresión del sistema renina angiotensina aldosterona intrarrenal podría contribuir al déficit de nefronas,<sup>108 117</sup> puesto que en condiciones normales es esencial para la formación de vasos sanguíneos y túbulos durante la nefrogénesis. En restricción proteínica materna (RPM) severa se ha descrito en las crías, la presencia de glomérulos morfológicamente inmaduros<sup>118 119</sup> y ultraestructuralmente se observó engrosamiento de la membrana basal glomerular con desorganización del endotelio fenestrado y la degeneración de los pedícelos de los podocitos.<sup>119</sup>

## 2.0 JUSTIFICACIÓN.

Existe suficiente evidencia en estudios experimentales y en humanos que demuestran que la alteración del ambiente uterino durante la gestación repercute de forma importante en el desarrollo de los organismos. Aunque son múltiples los factores que pueden estar interactuando en el desarrollo fetal, los aspectos nutricionales cobran mayor importancia debido a que existen países o regiones geográficas en donde una nutrición adecuada puede estar comprometida durante el desarrollo fetal. Específicamente, se ha reportado en ratas que la restricción proteica durante la gestación repercute en alteraciones morfo-funcionales relacionadas principalmente con una nefrogénesis deficiente y como consecuencia un menor número de nefronas en las crías. Este tipo de alteraciones asociadas a la desnutrición durante el desarrollo fetal podrían impactar en la infancia o la vida adulta del individuo y hacerlo más susceptible a desarrollar enfermedades renales. Por lo tanto, en este estudio decidimos evaluar el impacto que tiene la restricción proteínica materna y la consecuente nefrogenénesis reducida frente a un segundo reto, como lo es la lesión renal aguda y su transición a enfermedad renal crónica.

### **3.0 OBJETIVO GENERAL.**

Evaluar el impacto fisiológico, morfológico y molecular en los riñones por la restricción proteínica materna en las crías de rata Wistar machos, en condiciones basales y frente a un episodio de Lesión Renal Aguda, así como su transición a Enfermedad Renal Crónica.

#### **3.1 Objetivos Específicos**

1. Evaluar si existen diferencias en la fisiología y/o estructura renal de crías de ratas Wistar provenientes de madres con restricción proteínica.
2. Estudiar si existe un comportamiento diferencial en la expresión de genes vasoactivos, inflamatorios y de estrés oxidante.
3. Determinar el impacto de la restricción proteínica materna sobre un episodio de LRA en las crías de rata Wistar.
4. Evaluar el impacto de la restricción proteínica materna frente a la transición de LRA a ERC en las crías de rata Wistar.
5. Establecer los posibles mecanismos involucrados, estudiando vías vasoactivas, profibróticas y de inflamación.

## 4.0 MATERIAL Y MÉTODOS.

El protocolo de investigación se llevó a cabo con la aprobación del Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ).

### 4.1 Modelo para obtener crías de madres con restricción proteínica.

Se utilizaron ratas Wistar hembras y machos (Tabla 1. número de ratas) de 10-12 semanas de edad y con un peso entre  $220\pm 20$  g, obtenidas del INCMNSZ. Las ratas se mantuvieron en un cuarto con temperatura controlada entre 21 y 22 °C, con ciclos de luz y oscuridad de 12 h. Previo al apareamiento, las ratas estuvieron alimentadas con Purina Chow 5001. Las ratas hembras se colocaron con los machos (1 Macho por 4 hembras) y cuando se identificaron espermatozoides en frotis vaginal se consideró el día de concepción (día 0). Las ratas gestantes se dividieron en dos grupos: el que se alimentó con dieta control (C) o con dieta restringida en proteínas (R) (Tabla 2, composición de la dieta elaborada en el INCMNSZ)<sup>120 121</sup>

Después del nacimiento de las crías y durante la lactación, las ratas madre se sometieron a las siguientes intervenciones: El grupo control se dividió en dos partes iguales: una parte continuó con la dieta control y la otra parte recibió dieta restringida en proteínas, conformando el grupo con dieta estándar en la gestación y dieta restringida en proteínas en la lactancia (CR). El grupo con dieta restringida en proteínas durante la gestación se dividió en dos partes iguales: una parte continuaron con dieta restringida en proteínas durante la lactancia (grupo RR) y la otra recibió dieta control (grupo RC). Para asegurar homogeneidad en el estudio, camadas de 10 a 14 crías se ajustaron al nacimiento a 10 crías por madre, en donde se estimó que aproximadamente la mitad son machos y la otra mitad hembras.

LESIÓN RENAL AGUDA						
Grupos de Madres	n de madres	Dieta en Gestación	Dieta en Lactancia	No. Crías macho	Grupos en crías	n crías/gpo
C	3	C	C	15	CC	7
					CC+IR	8
CR	3	C	R	15	CR	7
					CR+IR	8
RC	3	R	C	15	RC	7
					RC+IR	8
RR	3	R	R	15	RR	7
					RR+IR	8
TRANSICIÓN DE LESIÓN RENAL AGUDA A ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA						
Grupos de Madres	n de madres	Dieta en Gestación	Dieta en Lactancia	No. Crías macho	Grupos en crías	n crías/gpo
C	6	C	C	30	CC	10
					CC+Nx	10
					CCIR+Nx	10
CR	4	C	R	20	CR+Nx	10
					CRIR+Nx	10
RC	4	R	C	20	RC+Nx	10
					RCIR+Nx	10
RR	4	R	R	20	RR+Nx	10
					RRIR+Nx	10

**Tabla 1.** Conformación de los grupos y número de las ratas madre y crías en los estudios de lesión renal aguda y su transición a enfermedad renal crónica. C: dieta control, R: dieta restringida en proteína, CC: dieta control durante gestación y lactancia, CR: dieta control durante gestación y restringida en lactancia, RC: dieta restringida en gestación y control en lactancia, RR: dieta restringida durante gestación y lactancia, IR: isquemia/reperfusión renal, Nx: nefrectomía.

	Dieta Control (%)	Dieta restringida (%)
<b>Caseína</b>	20	10
<b>Cistina</b>	0.3	0.15
<b>Colina</b>	0.165	0.165
<b>Vitaminas</b>	1	1
<b>Minerales</b>	5	5
<b>Celulosa</b>	5	5
<b>Aceite de maíz</b>	5	5
<b>Carbohidratos</b>		
<b>Harina de maíz</b>	31.76	37.34
<b>Dextrosa</b>	31.76	37.34

**Tabla 2.** Composición de las dietas control y restringidas.

## **4.2 Peso y mediciones morfométricas en las crías del modelo de transición de lesión renal aguda a enfermedad renal crónica.**

Entre 12 y 24 h después del nacimiento las crías se identificaron, se pesaron y posteriormente con el uso del calibrador Bernier se hicieron las siguientes mediciones morfométricas:

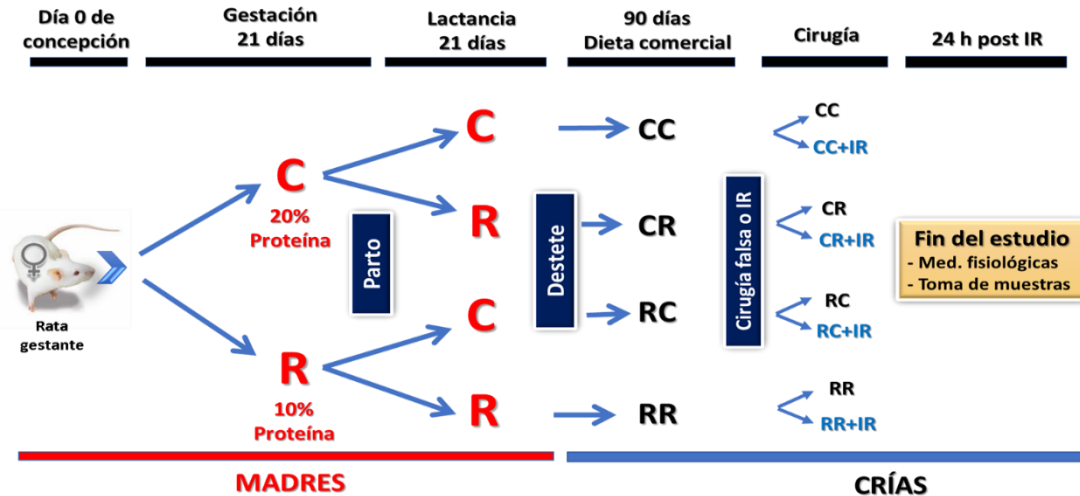
- Longitud: desde el hocico hasta la punta de la cola.
- Ancho abdominal: medido de lado a lado en el abdomen medio.
- Ancho craneal: de oreja a oreja.
- Distancia ano-genital para determinación del sexo.

El seguimiento del peso corporal de las crías se realizó los días 7, 14 y 21.

## **4.3 Modelo de lesión renal aguda inducida por isquemia/reperfusión.**

Una vez que las ratas crías fueron destetadas al día 21 post-nacimiento, se separaron por sexo para utilizar únicamente los machos, se alimentaron con dieta estándar para roedores y se clasificaron con base en las dietas de las madres en los siguientes grupos: CC, CR, RC y RR. Cuando las crías alcanzaron entre 280-330 g, cada grupo fue dividido a su vez en dos partes iguales: la mitad de las ratas se sometieron a isquemia/reperfusión renal (IR) conformando los grupos CC+IR, CR+IR, RC+IR, RR+IR y a la otra mitad de las ratas por grupo se les realizó cirugía falsa conservando el mismo nombre de los grupos originales (CC, CR, RC y RR).

Las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico a una dosis de 30 mg/kg y se colocaron en una cama termoregulada a 37°C. Se realizó una laparotomía para acceder a retroperitoneo y disecar el paquete vascular renal de forma bilateral para interrumpir el flujo sanguíneo a los riñones mediante la colocación de un clip vascular en cada arteria renal durante 45 min. La isquemia fue verificada visualmente por el cambio de color del riñón. Los animales fueron suturados de la pared abdominal con vicryl 3-0 y la piel con seda 3-0. El mismo procedimiento se realizó en las ratas con cirugía falsa, con excepción de la colocación del clip. Cuando los animales se recuperaron de la anestesia se colocaron en jaulas metabólicas para recolección de orina y después de 24 h de reperfusión renal se realizaron las mediciones fisiológicas (Fig. 3).



**Figura 3.** Diseño experimental para el estudio del efecto de una dieta hipoproteica materna en la gestación y/o la lactancia, en la lesión renal aguda en las crías. C: dieta control, R: dieta restringida en proteína, CC: dieta control durante gestación y lactancia, CR: dieta control durante gestación y restringida en lactancia, RC: dieta restringida en gestación y control en lactancia, RR: dieta restringida durante gestación y lactancia, IR: isquemia/reperfusión renal.

#### 4.4 Modelo de la transición de lesión renal aguda a enfermedad renal crónica inducido por isquemia/reperfusión unilateral más nefrectomía.

Las ratas crías fueron destetadas el día 21 y se sexaron para utilizar únicamente los machos. Las ratas se alimentaron con dieta estándar para roedores y se clasificaron con base en las dietas de las madres en los siguientes grupos: CC, CR, RC y RR.

Cuando las crías alcanzaron entre 280 y 330 g, cada grupo fue dividido en dos partes iguales: la mitad de las ratas se sometieron a IR más nefrectomía (IR+Nx) conformando los grupos CCIR+Nx, CRIR+Nx, RCIR+Nx, RRIR+Nx, y a la otra mitad de las ratas por grupo se les realizó cirugía falsa más nefrectomía, conformando los siguientes grupos (CC+Nx, CR+Nx, RC+Nx y RR+Nx), de igual forma se agregó un grupo control sin isquemia y sin nefrectomía (CC).

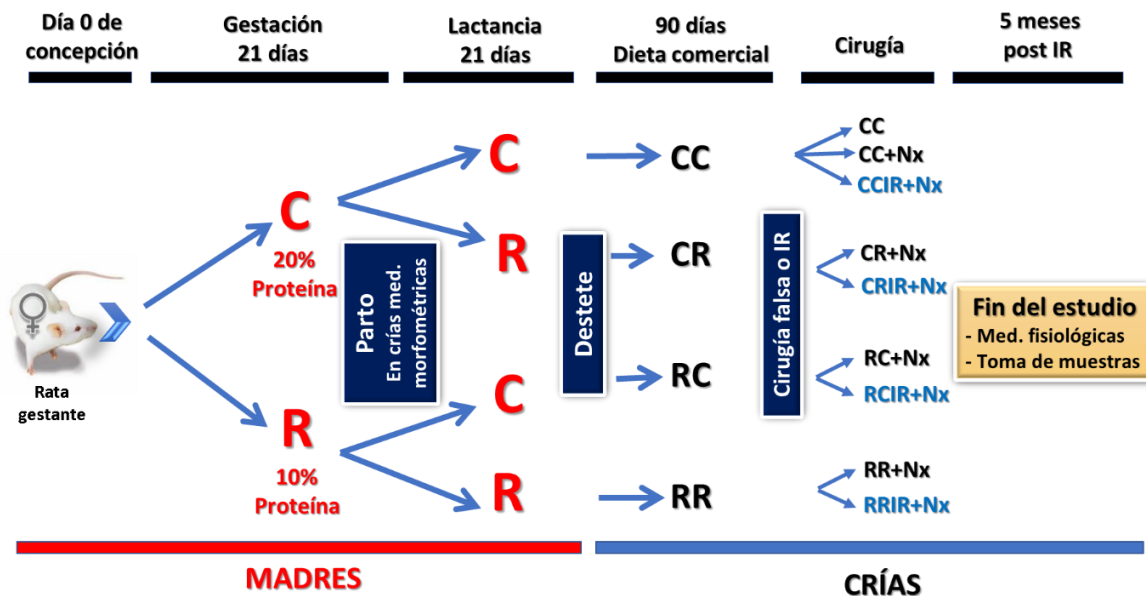
Para llevar a cabo el procedimiento de IR unilateral, las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico a una dosis de 30 mg/kg y se colocaron en una cama termorregulada a 37°C. Se realizó laparotomía para acceder a retroperitoneo y disecar el paquete vascular del riñón izquierdo para interrumpir el flujo sanguíneo mediante la colocación de un clip vascular en la arteria renal durante 45 min. La isquemia fue verificada visualmente por el cambio de color del riñón.

En el caso de la nefrectomía, se disecó el paquete vascular del riñón derecho, se colocaron dos ligaduras con hilo seda 3-0, en el hilio renal, tanto proximal como distal y se realizó el corte en la parte central de las ligaduras. Se retiró el riñón teniendo cuidado de no extraer la glándula adrenal y se verificó que no hubiera hemorragia.

Después de la nefrectomía y de haber transcurrido los 45 min de isquemia, los animales fueron suturados de la pared abdominal con vicryl 3-0 y la piel con seda 3-0. El mismo procedimiento se realizó en las ratas con cirugía falsa, incluyendo la nefrectomía, pero sin la colocación del clip.

Cuando los animales se recuperaron de la anestesia se colocaron en jaulas metabólicas para recolección de orina entre 18 y 20 h y posteriormente se tomó muestra sanguínea del plexo retro-orbital.

Para el estudio de transición de LRA-ERC, mensualmente se realizó recolección de orina para evaluar la proteinuria y la progresión del daño renal, así como, el registro del peso corporal. Cinco meses después de la isquemia renal se determinó condición corporal con un equipo de imagen por resonancia magnética (Echo Medical Systems, Houston), se realizó la última recolección de orina y posteriormente las mediciones fisiológicas renales (Fig. 4).



**Figura 4.** Diseño experimental para el estudio del efecto de una dieta hipoproteica materna en la gestación y/o la lactancia en la transición de la lesión renal aguda a enfermedad renal crónica en las crías. C: dieta control, R: dieta restringida en proteína, CC: dieta control durante gestación y lactancia, CR: dieta control durante gestación y restringida en lactancia, RC: dieta restringida en gestación y control en lactancia, RR: dieta restringida durante gestación y lactancia, IR: isquemia/reperfusión renal, Nx: nefrectomía.



#### **4.5 Mediciones fisiológicas y toma de muestras.**

Después de 24 h (LRA) o 5 meses (ERC) de la cirugía falsa o IR, las ratas fueron anestesiadas nuevamente con pentobarbital sódico a (30 mg/kg) y se colocaron en una tabla termorreguladora para mantener la temperatura corporal a 37°C. Con el fin de medir la presión arterial media (PAM) durante el experimento se cateterizaron las arterias femorales y se monitorizó en una de ellas con un transductor de presión (modelo p23) conectado a un polígrafo (Grass Instrument, Quincy, MA). Para la medición del flujo sanguíneo renal (FSR) se realizó una laparotomía y se colocó gel de ultrasonido y una sonda de flujo de ultrasonido alrededor de la arteria renal izquierda y se registró con un flujómetro sanguíneo (Transonic Flow Probe, New York NY).

Al terminar las determinaciones fisiológicas se tomaron muestras sanguíneas a partir de la arteria femoral cateterizada, con tubos con heparina como anticoagulante, posteriormente se dio muerte a los animales y se tomó muestra de tejido renal. Se determinó la creatinina plasmática y urinaria, se calculó la depuración de creatinina y en la orina se determinó la proteinuria y los biomarcadores de daño renal HSP72 (heat shock protein 72 kDa) y KIM-1 (kidney Injury molecule-1). Una parte del tejido renal se utilizó para la evaluación histopatológica y la otra parte para estudios bioquímicos y moleculares.

#### **4.6 Proteinuria.**

La proteinuria se determinó a partir de la recolección de orina que se realizó 24 h posterior a la IR o cirugía falsa para el caso del estudio de LRA. En el estudio de transición de LRA a ERC, también se recolectó orina en cada uno de los meses. Se utilizó el método turbidimétrico con ácido tricloroacético.<sup>122</sup>

#### **4.7 Creatinina plasmática y depuración de creatinina.**

Las muestras sanguíneas se tomaron previo al sacrificio de los animales y se recolectaron en tubos con heparina. Se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min para obtener el plasma. La concentración de creatinina, tanto en plasma, como en orina se midió con el uso del kit Quantichrom (DICT-500, BioAssay System) de acuerdo con las instrucciones del

fabricante. La depuración de creatinina (Dep Creat) se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:  $DepCr = (U \times V) / P$ , donde U es la concentración de creatinina en orina, V= la tasa del flujo urinario y P= la concentración de creatinina plasmática.

#### 4.8 Biomarcadores urinarios de daño renal HSP 72 y KIM-1 por Western Blot.

Para la separación de las proteínas por electroforesis se utilizó un gel SDS-PAGE al 8.5 %, cargando 2  $\mu$ L de orina para KIM-1 y 0.1  $\mu$ L para HSP72, que fueron diluidas con solución salina al 0.9%. La transferencia de proteínas se realizó en membranas de Fluoruro de polivinilideno (PVDF, por sus siglas en inglés) con un Trans-blot (Bio-Rad) durante 1 h a 9 volts. Las membranas fueron bloqueadas con un agente bloqueante a base de leche por 60 min y posteriormente se incubaron con anticuerpo anti-HSP72 (ENZO Life Science, dilución 1:5000) y con anticuerpo anti-KIM-1 (Biorbyt, dilución 1:1000), por último se incubaron con anticuerpo secundario anti-mouse (Santacruz Biotechnology dilución 1:5000) a temperatura ambiente por 90 min. La dilución se realizó con buffer de anticuerpo. Las proteínas se detectaron usando un kit comercial quimioluminiscente (Millipore) y autoradiografía, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las bandas se escanearon y se realizó la densitometría con el programa Image J.

#### 4.9 Histomorfometría y alteraciones histopatológicas.

Una vez que los parámetros fisiológicos fueron registrados, se perfundió el riñón izquierdo a través del catéter femoral con NaCl 0.9% y posteriormente con formol al 4%, en el que se conservó hasta antes de su procesamiento. El tejido renal se incluyó en parafina y se realizaron cortes histológicos de 3  $\mu$ m que se tiñeron con ácido peryódico de Schiff (PAS). Se tomaron fotos de las laminillas, de 12 campos diferentes de la corteza renal (magnificación 100x), con el uso de una cámara digital incorporada a un microscopio (Nikon). El análisis de las laminillas se efectuó de manera cegada.

**El número de nefronas** se cuantificó en un área de al menos 10,000  $\mu$ m<sup>2</sup>. En este caso, las ratas con IR y cirugía falsa de cada grupo se unificaron, considerando que el estudio agudo llevado a cabo 24 h después de la IR, no influye en el número de glomérulos ni

ocasiona pérdida de nefronas.

**El área del penacho glomerular** se midió en cada uno de los glomérulos de las imágenes de los cortes histológicos (por lo menos 70 glomérulos por rata) de los diferentes grupos con ayuda del programa de computación Eclipse Net.

**El daño tubular** se cuantificó a partir de los cortes histológicos, con base al porcentaje de túbulos dañados y túbulos normales. El criterio más importante para definir los túbulos dañados corresponde a la presencia de túbulos con desprendimiento de células epiteliales de la membrana basal, dilatación del lumen, así como la presencia de cilindros. Todo el análisis se realizó cegado.

#### 4.10 Análisis de expresión de genes.

El riñón derecho se extrajo, se pesó y después de separar la corteza y médula se congeló de forma inmediata. El RNA del tejido se extrajo utilizando el método de TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se determinó la pureza y la concentración mediante espectrofotometría. La integridad se verificó por electroforesis con un gel de agarosa al 1%. La transcripción reversa se llevó a cabo con 1 µg, a partir del RNA total y 200 unidades de transcriptasa reversa (Invitrogen, SuperScript III). Los niveles de RNAm de los genes de receptor de Angiotensina II tipo 1 (AT1), prepro-endotelina, receptor de endotelina tipo A (ET<sub>A</sub>), receptor de endotelina tipo B (ET<sub>B</sub>), óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), catalasa, glutatión peroxidasa (Gpx), superóxido dismutasa (SOD 1), HIF-1α, VEGF, IL6 y TNF-α, fueron cuantificadas por PCR en tiempo real en un sistema de detección de secuencias ABI Prism 7300 (TaqMan, ABI, FosterCity, CA). La expresión del gen 18S se usó para normalizar los datos. Las sondas fueron las siguientes: AT1, Rn00561409\_S1; prepro-endothelin-1, Rn00561129\_m1; ET<sub>A</sub>, Rn00561129\_m1; ET<sub>B</sub>, Rn00569139\_m1; eNOS, Rn02132634\_s1; catalase, Rn00560930\_m1; Gpx, Rn00577994\_g1; SOD1, Rn00566938\_m1; HIF-1α, Rn00577560\_m1; IL-6, Rn01410330\_m1; TNF-α, Rn99999017\_m1; y VEGF, Rn01511601\_m1.

#### **4.11 Análisis estadístico.**

Los resultados obtenidos se presentan como media  $\pm$  ES y se analizaron por ANOVA de una vía y las diferencias entre grupos se determinarán con la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples. En el caso de las diferencias en la distribución de los diámetros glomerulares se evaluó por un análisis de contingencia y las diferencias a partir de la prueba de  $X^2$ . Las diferencias se consideran estadísticamente significativas cuando la P alcanzó un valor menor a 0.05.

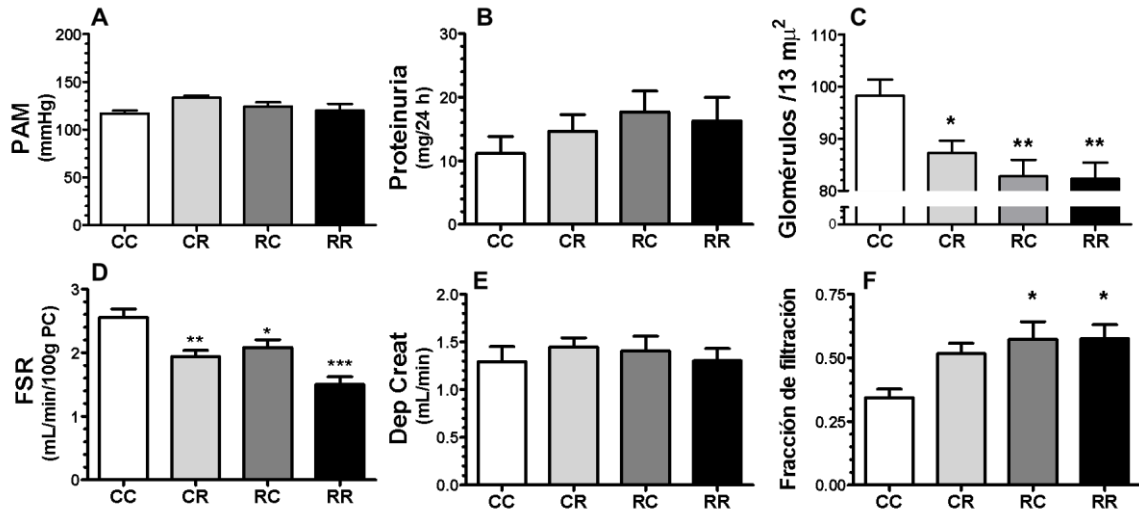
## 5.0 RESULTADOS.

### 5.1 Respuesta fisiológica basal renal y posterior a lesión renal aguda inducida por isquemia/reperfusión en crías provenientes de madres con restricción proteínica.

Una vez que las crías provenientes de madres con RPM durante la gestación, lactancia o ambas, alcanzaron un peso entre 280 – 330 g, se sometieron al procedimiento de isquemia reperfusión renal o cirugía falsa. Con el objetivo de determinar la magnitud de la LRA en los diferentes grupos, una vez transcurridas 24 h post-isquemia se evaluaron parámetros fisiológicos renales y se tomó muestra de tejido renal para estudios histopatológicos (morfológicos) y moleculares.

#### 5.1.1 En condiciones basales, la RPM redujo el número de nefronas y el flujo sanguíneo renal en las crías.

Inicialmente se estudió si la RPM tiene influencia sobre la función renal basal y la cantidad de nefronas en las crías, para lo cual en los grupos de RPM sin IR se registró 24 h después de la cirugía falsa la PAM, la proteinuria, se cuantificaron los glomérulos por área, se registró el FSR, se determinó la Dep Creat y la fracción de filtración (Fig. 5A-F). Con respecto a PAM (Fig. 5A) y la proteinuria (Fig. 5B) no se observaron diferencias estadísticas. En cambio, **hubo una disminución estadísticamente significativa en el número de glomérulos (nefronas) de los diferentes grupos de crías con RPM** en comparación con el grupo control, siendo la reducción del 15.7, 11.2 y 16.2% (el % se calculó a partir de los datos de la gráfica) para los grupos RC, CR y RR, respectivamente (Fig. 5C). Un hallazgo particularmente interesante, fue la reducción estadísticamente significativa en el FSR en todos los grupos de crías con RPM comparado con el grupo control (Fig. 5D), sin embargo, la Dep Creat se mantuvo dentro de valores normales en todos los grupos (Fig. 5E). **Es interesante notar que la reducción de glomérulos indujo un estado de hiperfiltración en los grupos de RPM**, que se reflejó por el incremento significativo en la fracción de filtración (Fig. 5F). Con este resultado se demostró que la RPM afecta la nefrogénesis durante el desarrollo fetal que repercutió tanto en la cantidad de nefronas como, en el comportamiento hemodinámico renal siendo evidente la reducción del FSR.



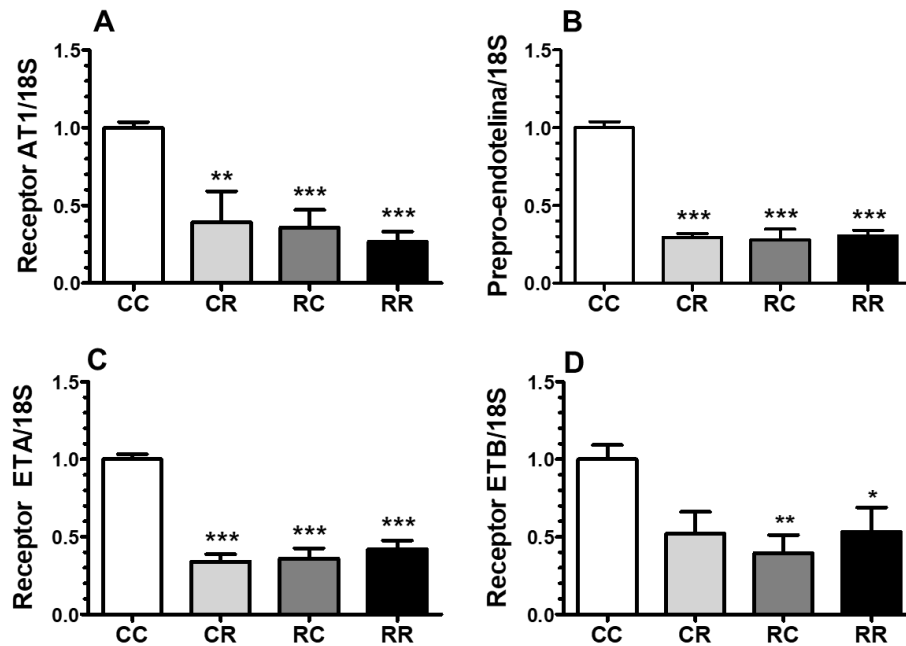
**Figura 5.** La restricción proteínica materna redujo en las crías el número de glomérulos y el FSR. Parámetros de fisiología renal y número de glomérulos de crías provenientes de madres alimentadas con dieta control (grupo CC, barra blanca) o madres con restricción proteínica durante la lactación (grupo CR, barra gris claro), gestación (grupo RC, barra gris intenso) o ambas (grupo RR, barra negra). A) Presión arterial media (PAM), B) Proteinuria, C) Número de glomérulos, D) Flujo sanguíneo renal (FSR), E) Depuración de creatinina (Dep Creat), F) Fracción de filtración. Los datos se muestran en media  $\pm$  EE.  $n =$  por lo menos 6 ratas por grupo. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$ , \*\*\* $P < 0.0001$  vs. grupo CC.

### 5.1.2 La RPM redujo los niveles de RNAm, de moléculas vasoactivas, antioxidantes e inflamatorias.

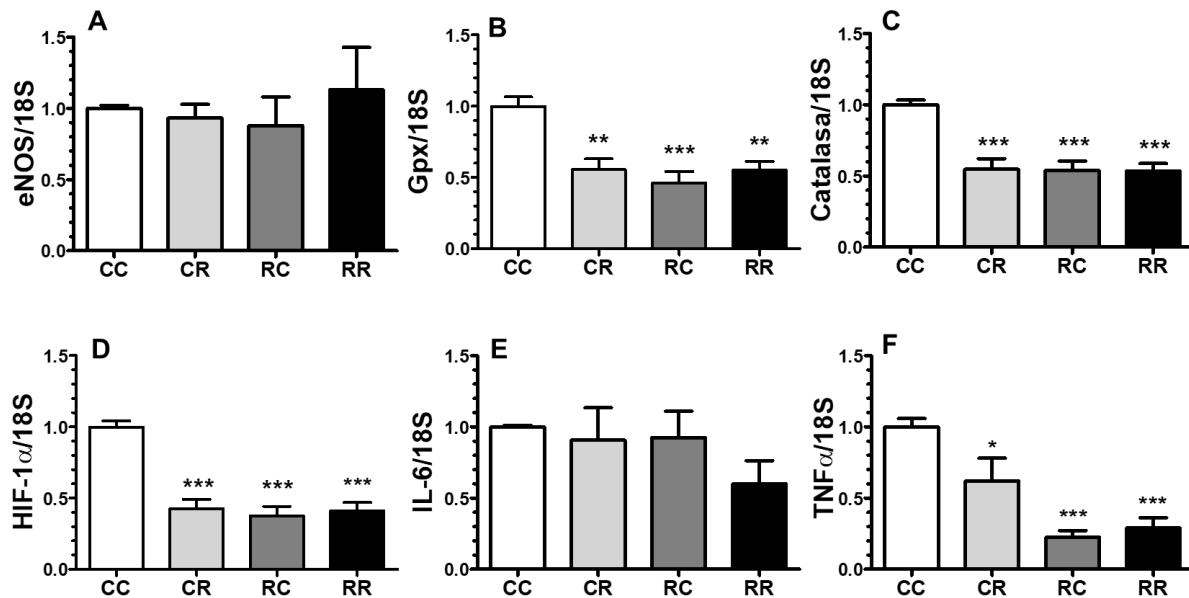
Considerando la importancia que tiene el flujo sanguíneo en la función renal normal y habiendo previamente detectado diferencias entre los grupos de RPM y el control, se decidió evaluar la expresión de genes de moléculas vasoactivas renales importantes. De igual forma, dado que el proceso inflamatorio y el daño oxidante juegan un papel predominante en la fisiopatología de la LRA se consideró la evaluación de RNAm de enzimas antioxidantes y moléculas inflamatorias en condiciones basales y posterior a la LRA.

En los animales sin daño renal, es decir en condiciones basales, se observó una disminución significativa en las cantidades de RNAm del receptor AT<sub>1</sub>, prepro-endotelina y los receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> (Fig. 6A-B) en todos los grupos de RPM comparados con el grupo control, con excepción del receptor ET<sub>B</sub> para el grupo CR. Los niveles de RNAm de eNOS (Fig. 7A) fueron similares en todos los grupos. Se observó reducción significativa en los niveles de RNAm de Gpx (Fig. 7B), catalasa (Fig. 7C), HIF1- $\alpha$  (Fig. 7D) y TNF- $\alpha$  (Fig. 7F) en todos los grupos de RPM comparados con el grupo control. En IL6 no se encontraron

diferencias entre grupos (Fig. 7E). Estos resultados sugieren que la RPM tiene una influencia importante en la programación fetal en las crías, lo cual puede marcar una diferencia en la respuesta ante un segundo reto como es la LRA.



**Figura 6.** La restricción proteínica materna redujo los niveles de RNAm de moléculas vasoactivas en tejido renal de crías provenientes de madres alimentadas con dieta control (grupo CC, barra blanca) o madres con restricción proteínica durante la lactación (grupo CR, barra gris claro), gestación (grupo RC, barra gris intenso) o ambas (grupo RR, barra negra). A) Receptor de angiotensina II tipo 1 (AT<sub>1</sub>), B) Pre-proendotelina, C) Receptor de endotelina tipo A (ET<sub>A</sub>), D) Receptor de endotelina tipo B (ET<sub>B</sub>). Los datos se muestran en media ± EE. n= por lo menos 4 ratas por grupo. \*P<0.05, \*\*P<0.001, \*\*\*P<0.0001 vs. grupo CC.



**Figura 7.** La restricción proteínica materna redujo los niveles de RNAm de moléculas antioxidantes e inflamatorias en tejido renal de crías provenientes de madres alimentadas con dieta control (grupo CC, barra blanca) o madres con restricción proteínica durante la lactación (grupo CR, barra gris claro), gestación (grupo RC, barra gris intenso) o ambas (grupo RR, barra negra). A) Óxido Nítrico Sintasa endotelial (eNOS), B) Glutathion peroxidasa (Gpx), C) Catalasa, D) HIF-1 $\alpha$ , E) IL-6, F) TNF- $\alpha$ . Los resultados se presentan en promedio  $\pm$  EE. n= por lo menos 6 ratas por grupo. \*P<0.05, \*\*P<0.001, \*\*\*P< 0.0001 vs. grupo CC.

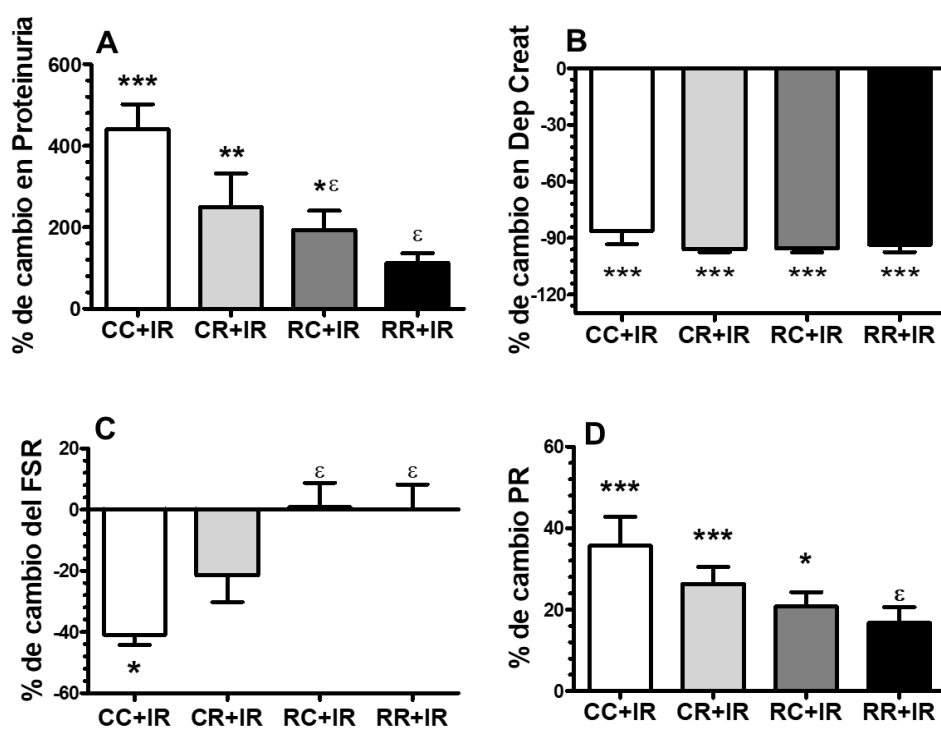
### 5.1.3 Los grupos de RPM (RC y RR) mostraron una mejor respuesta hemodinámica renal después de la la lesión renal aguda en las crías.

Una vez caracterizado el efecto de la RPM en la función y estructura renal basal, se evaluó el impacto y la magnitud de la LRA en las crías 24 h posterior a la IR, considerando cambios hemodinámicos (FSR), funcionales (Dep Creat), de daño tubular (proteinuria) y de forma indirecta inflamación (peso renal). Los resultados en las gráficas se muestran con base en el porcentaje de cambio (%C) en comparación con el respectivo control de cada grupo sin IR.

De acuerdo con lo que hemos reportado previamente,<sup>42 43 123 124</sup> después de 24 h post-isquemia, el grupo control presentó el daño renal característico por IR que fue: proteinuria, el decremento en la Dep Creat, una reducción significativa del FSR, e inflamación renal indicada por el incremento en el peso renal (Fig. 8A-D). Interesantemente, la hipoperfusión renal característica 24 h post-isquemia, no se observó en los grupos de RPM cuando se compararon contra su propio control sin IR (Fig. 8C). Estos resultados



indican que las crías provenientes de madres restringidas proteínicamente durante la gestación y/o lactancia **tienen una mejor capacidad para recuperar el FSR**. A pesar de que el FSR se recuperó más rápidamente en estos grupos, esto no tuvo impacto sobre la reducción en la Dep Creat que descendió de manera similar en todos los grupos estudiados (Fig. 8B). Es importante aclarar, que la Dep Creat refleja la función renal en el transcurso de 24 h post-isquemia, en cambio el FSR se registró en un periodo específico, es decir, justo a las 24 h post-isquemia. La proteinuria aumentó significativamente en todos los grupos comparados contra su respectivo control sin IR con excepción del grupo RR+IR, aunado a esto, el %C fue significativamente menor en los grupos RC+IR y RR+IR comparados con el grupo CC+IR indicando menor daño en ambos grupos (Fig. 8A). La inflamación renal que se observó en el grupo control, también se detectó en el grupo CR+IR y en mucho menor magnitud en los grupos RC+IR y RR+IR (Fig. 8D). En conjunto estos resultados muestran que la mejor respuesta hemodinámica presentada en los grupos de

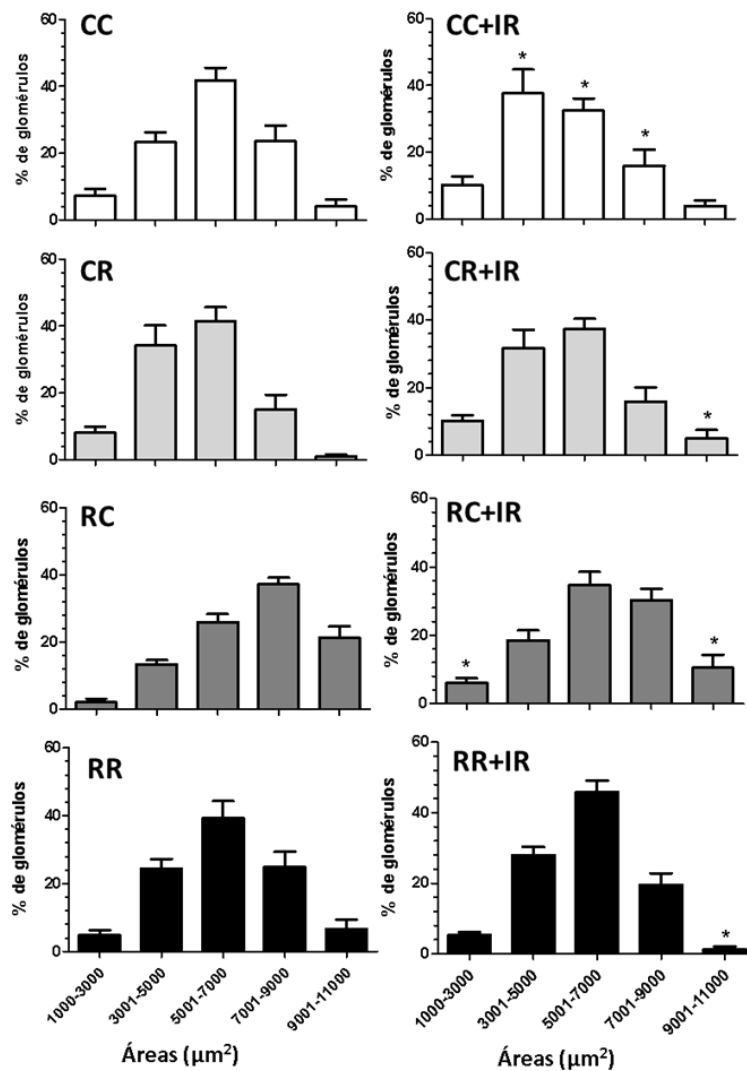


**Figura 8.** Los grupos de restricción proteínica materna (RC y RR) mostraron una mejor respuesta hemodinámica renal después del daño renal agudo inducido por isquemia/reperfusión (IR). Crías provenientes de madres alimentadas con dieta control (grupo CC, barra blanca) o madres con restricción proteínica durante la lactancia (grupo CR, barra gris claro), gestación (grupo RC, barra gris intenso) o ambas (grupo RR, barra negra). A) Proteinuria, B) Depuración de creatinina (Dep Creat), C) Flujo sanguíneo renal (FSR), D) Peso renal (PR). Los datos se presentan como promedio  $\pm$  EE del porcentaje de cambio con base en el grupo control (sin IR) de cada grupo. n= por lo menos 6 ratas por grupo. \*P<0.05, \*\*P<0.001, \*\*\*P< 0.0001 vs. CC de cada grupo. ε P<0.05 vs. el grupo CC+IR.

RPM (RC y RR) pudo impactar también en un menor daño renal, reflejado por la menor proteinuria y un menor peso renal (inflamación) en estos grupos.

#### **5.1.4. Las crías con RPM muestran una mejor perfusión sanguínea glomerular después de la isquemia/reperfusión renal, medida por el área de los penachos glomerulares.**

Previamente se determinó que los grupos de RPM tuvieron una mejor respuesta hemodinámica al no mostrar una disminución del FSR, 24 h después de la IR renal. Con el objetivo de corroborar este hallazgo morfológicamente, se evaluó en cortes histológicos de tejido renal el área de los penachos glomerulares considerando que una hipoperfusión sanguínea renal induce también constricción glomerular. Se compararon las áreas de los penachos glomerulares de los grupos sin IR y después de la inducción de la LRA por IR y se expresaron en un histograma de intervalos de frecuencias (Fig. 9A-H). En el grupo CC+IR se encontró una reducción significativa en el tamaño glomerular, puesto que, había un menor porcentaje de glomérulos de área normal que corresponden a los intervalos de 5001 a 7000 y 7001 a 9000  $\mu\text{m}^2$  presentando un % de glomérulos de 15.9 y 3.9% respectivamente, a diferencia del grupo CC que presentó porcentajes de 41.8 y 23.5%, respectivamente (los porcentajes exactos se obtuvieron de los datos de las gráficas). Como consecuencia, hubo un aumento significativo en el porcentaje de glomérulos con áreas menores, 3001 a 5000  $\mu\text{m}^2$  con respecto al grupo control (37.6 vs. 23.3%, respectivamente). Estos resultados reflejan que el grupo control sometido a IR, presentó constricción glomerular por hipoperfusión como consecuencia de la reducción del FSR en concordancia con los experimentos anteriores y que este efecto no se observó en los grupos con RPM.



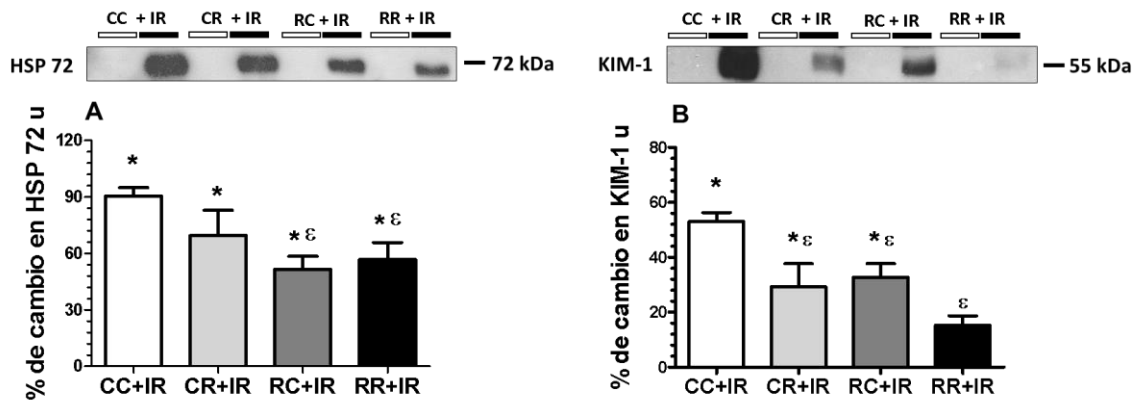
**Figura 9.** La isquemia reperfusion renal (IR) indujo glomerulconstriccion por hipoperfusión sanguinea glomerular únicamente en el grupo CC+IR. Area de los penachos glomerulares, de crías provenientes de madres alimentadas con dieta control (grupo CC, barra blanca) o madres con restricción proteínica durante la lactación (grupo CR, barra gris claro), gestación (grupo RC, barra gris intenso) o ambas (grupo RR, barra negra). Los datos se presentan como promedio  $\pm$  DE. n= por lo menos 6 ratas por grupo. \* $p < 0.05$  vs cada barra de las ratas control de cada grupo (CC, CR, RC y RR).

### **5.1.5. Los grupos de las crías con RPM (RC y RR) mostraron menor daño del epitelio tubular renal inducido por isquemia/reperfusión evaluado por biomarcadores urinarios e histopatología.**

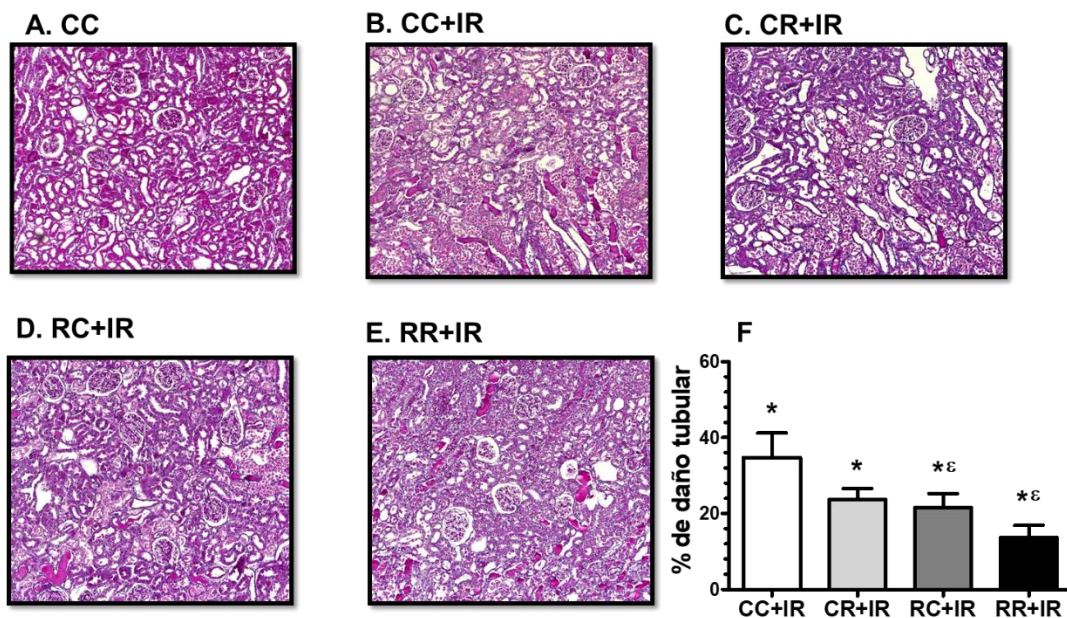
Hasta el momento conocemos que los grupos de RPM mostraron claramente una mejor respuesta hemodinámica renal y que esto podría influir de forma determinante en la magnitud de la LRA. Para confirmar este supuesto evaluamos por una análisis de Western Blot, los biomarcadores urinarios de daño renal: HSP72 y KIM-1, los cuales son indicadores específicos de daño tubular renal. La presencia de HSP72 no fue detectada en ninguno de los grupos control, en cambio, los niveles urinarios de HSP72 incrementaron significativamente en todos los grupos después de inducir daño por IR, sin embargo, el incremento de los grupos RC+IR y RR+IR fue significativamente menor que el grupo CC+IR (Fig. 10A). Lo mismo ocurrió para los niveles urinarios de KIM-1 con excepción del grupo RR+IR que a pesar de su incremento no fue significativamente diferente comparado con su control (Fig. 10B). En el % de cambio de los grupos con RPM, el incremento fue significativamente menor comparado con el grupo CC+IR (Fig. 10B). Estos resultados indican que el daño tubular renal, aunque se presenta en todos los grupos, es menor en los grupos con RPM, particularmente RC y RR.

El estudio histopatológico es el estándar de oro para evaluar el daño tubular renal, por lo cual se cuantificó el porcentaje de los túbulos dañados en el grupo control sin IR (Fig. 11A) y en los grupos de RPM únicamente aquellos que recibieron IR, debido a que los grupos controles no presentaban ningún tipo de lesión. El daño tubular se caracterizó por muerte celular, desprendimiento de células epiteliales hacia la luz del túbulo, así como, la presencia de cilindros tubulares (Fig 11B). En concordancia con nuestras observaciones previas, todos los grupos de RPM mostraron menor porcentaje de daño tubular comparado con el grupo CC+IR, pero la diferencia solo fue estadísticamente significativa en los grupos RC+IR y RR+IR (Fig. 11 C-F).

Con base en este resultado y en concordancia con los experimentos previamente mostrados, podemos concluir que en los grupos de RPM, en particular RC y RR, la magnitud de la LRA inducida por IR fue menor que el grupo control con IR.



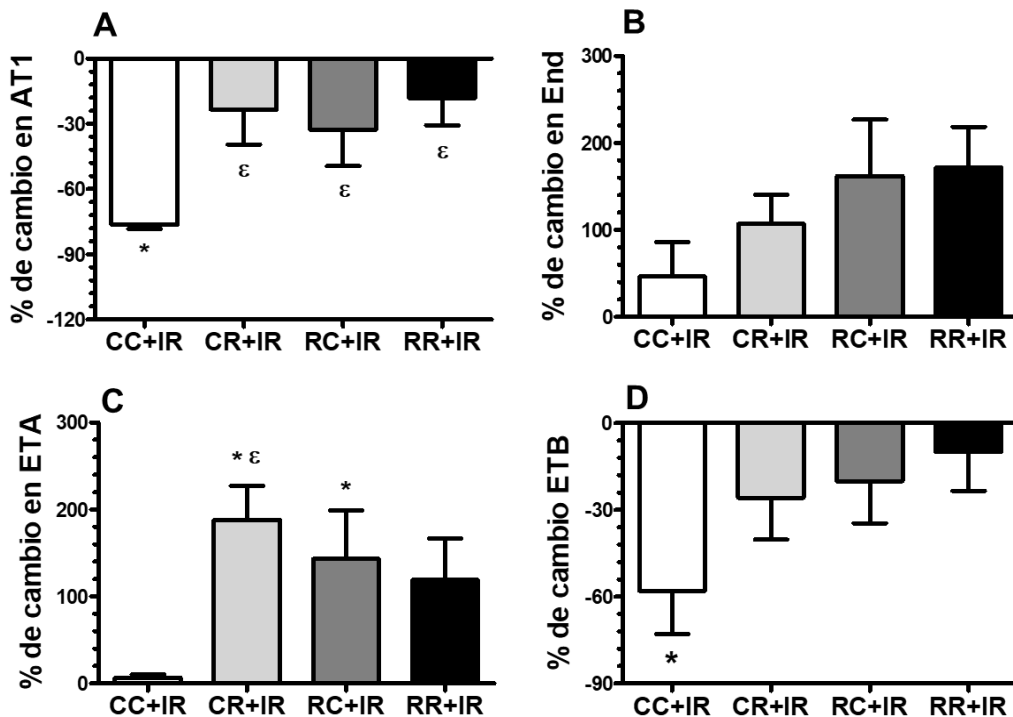
**Figura 10.** Los grupos de RPM mostraron menor daño del epitelio tubular renal evaluado por Western Blot de biomarcadores urinarios, después de isquemia reperusión (IR) en crías provenientes de madres alimentadas con dieta control (grupo CC, barra blanca) o madres con restricción proteínica durante la lactación (grupo CR, barra gris claro), gestación (grupo RC, barra gris intenso) o ambas (grupo RR, barra negra). A) HSP72 (Heat shock protein 72), B) KIM-1 (Kidney Injury Molecule). Los resultados se presentan como promedio  $\pm$  EE del porcentaje de cambio con base en el control de cada grupo sin IR. n=por lo menos 5 ratas por grupo. \*p<0.05 vs. el control de cada grupo sin IR. ε p<0.05, comparan el porcentaje de cambio vs el control (CC+IR).



**Figura 11.** Los grupos de restricción proteínica materna mostraron menor daño tubular renal, después de isquemia reperusión (IR) en crías provenientes de madres alimentadas con dieta control (grupo CC, barra blanca) o madres con restricción proteínica durante la lactación (grupo CR, barra gris claro), gestación (grupo RC, barra gris intenso) o ambas (grupo RR, barra negra). A-E) Imágenes representativas de los cortes histopatológicos teñidos con PAS de los diferentes grupos, F) Cuantificación del porcentaje de daño tubular. Los resultados se presentan como promedio  $\pm$  EE del porcentaje de daño tubular. n=por lo menos 5 ratas por grupo \* p<0.05 vs el control de cada grupo. ε p<0.05 vs el control (CC+IR).

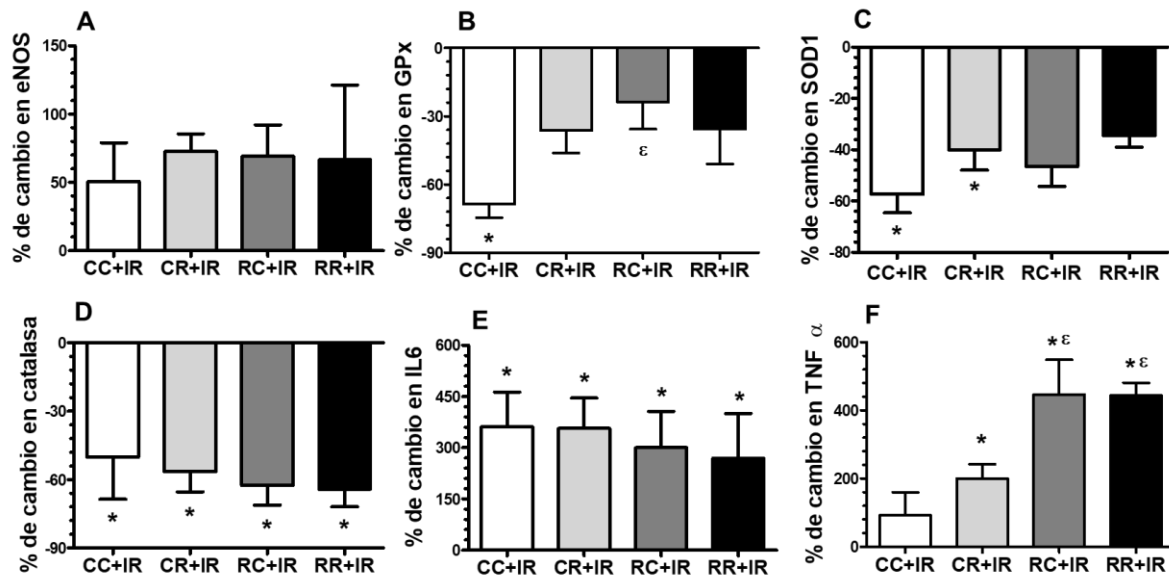
### 5.1.6 Los grupos de RPM presentaron una mejor respuesta antioxidante y ante la hipoxia después del daño renal causado por isquemia/reperfusión.

En los experimentos anteriores hemos determinado que los grupos de RPM, en particular RC y RR mostraron una mejor respuesta hemodinámica y como consecuencia una menor magnitud de daño renal que el grupo control (CC+IR). Para tratar de dilucidar el mecanismo se decidió evaluar la expresión de genes de moléculas que participan de manera importante en la fisiopatología de la lesión renal y que están involucrados en la respuesta vascular, el proceso inflamatorio, la protección contra el daño oxidante o que se inducen en respuesta a la hipoxia renal.



**Figura 12.** Niveles de RNAm de moléculas vasoactivas en tejido renal, después de isquemia/reperfusión renal (IR) en crías provenientes de madres alimentadas con dieta control (grupo CC, barra blanca) o madres con restricción proteínica durante la lactación (grupo CR, barra gris claro), gestación (grupo RC, barra gris intenso) o ambas (grupo RR, barra negra). A) Receptor de angiotensina II tipo 1 (AT1), B) Pre-pro-endoxetelina, C) Receptor de endotelina tipo A (ET<sub>A</sub>), D) Receptor de endotelina tipo B (ET<sub>B</sub>). Los resultados se presentan como promedio  $\pm$  EE del porcentaje de cambio con base en el control de cada grupo sin IR. n=por lo menos 5 ratas por grupo. \* p<0.05, vs. control sin IR de cada grupo.  $\epsilon$  p<0.05 vs. el control (CC+IR).

Con el objetivo de explicar la mejor respuesta hemodinámica renal, se determinaron los niveles de RNAm del receptor AT1, pre-proendotelina y sus receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub>, ya que son moléculas que modulan la respuesta vasoactiva en las arteriolas glomerulares y por ende la función renal. El daño renal por IR se asoció con una reducción significativa en el receptor de AT1 en el grupo CC+IR, mientras que en los grupos de RPM la reducción fue significativamente menor comparado con el grupo CC+IR (Fig. 12A). En el porcentaje de cambio de endotelina no hubo diferencias entre los grupos estudiados (Fig. 12B). En contraste, los niveles de RNAm del receptor ET<sub>A</sub> incrementaron significativamente en las crías de los grupos con RPM, comparado contra su propio grupo con excepción del grupo RR+IR. Este efecto no se observó en el grupo CC+IR (Fig. 12C). Con respecto al receptor ET<sub>B</sub>, los niveles del RNAm disminuyeron significativamente en el grupo CC+IR, lo cual no se observó en el resto de los grupos de RPM (Fig. 12D). Estos resultados no fueron suficientes para poder establecer con precisión la causa de la respuesta hemodinámica.



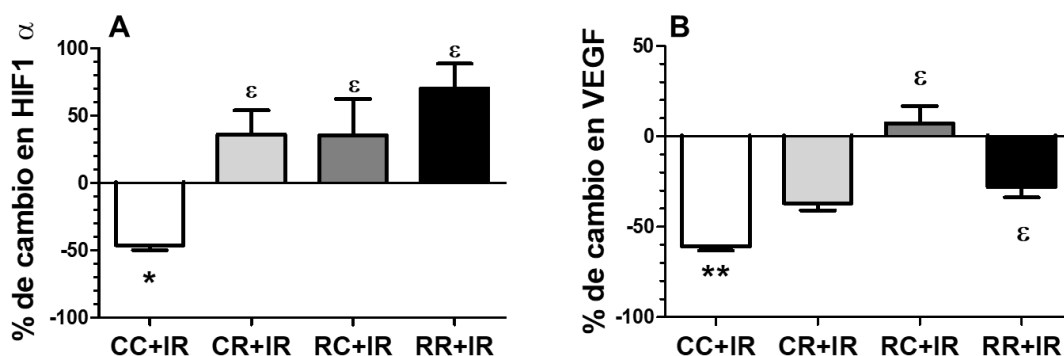
**Figura 13.** Los grupos de RPM mostraron una mejor respuesta antioxidante después de isquemia/reperfusión renal (IR) en crías provenientes de madres alimentadas con dieta control (grupo CC, barra blanca) o madres con restricción proteínica durante la lactación (grupo CR, barra gris claro), gestación (grupo RC, barra gris intenso) o ambas (grupo RR, barra negra). A) Óxido Nítrico Sintasa endotelial (eNOS), B) Glutación peroxidasa (Gpx), C) Superóxido dismutasa 1 (SOD1), D) Catalasa, E) IL6, F) TNF- $\alpha$ . Los resultados se presentan como promedio  $\pm$  EE del porcentaje de cambio de los niveles de RNAm, con base en el control de cada grupo sin IR. n= por lo menos 5 ratas por grupo. \*P<0.05, vs. control de cada grupo sin IR.  $\epsilon$  p<0.05 vs. el control (CC+IR).

Los niveles de RNAm de eNOS no se alteraron en ningún grupo de estudio (Fig. 13A). Con respecto a las moléculas antioxidantes, en el caso de Gpx, el grupo CC+IR mostró reducción significativa con respecto a su grupo control (sin isquemia), la cual no se observó en el resto de los grupos con RPM (Fig. 13B), de forma similar en SOD1 los niveles de RNAm se encontraron significativamente reducidos en los grupos CC+IR y CR+IR, lo cual fue menos marcado en el grupo RR+IR (Fig. 13C). En el caso de catalasa en todos los grupos estudiados hubo reducción significativa y de la misma magnitud (Fig. 13D). Los niveles de RNAm de IL6 incrementaron significativamente en todos los grupos comparado con su respectivo control (Fig. 13E). Los niveles de RNAm de TNF- $\alpha$  incrementaron en todos los grupos de RPM, pero no así, en el grupo CC+IR (Fig. 13F). En particular los resultados encontrados en los RNAm de las enzimas antioxidantes de SOD1 y de Gpx sugieren una mejor respuesta antioxidante ante el daño renal por IR en los grupos provenientes de madres con RPM.

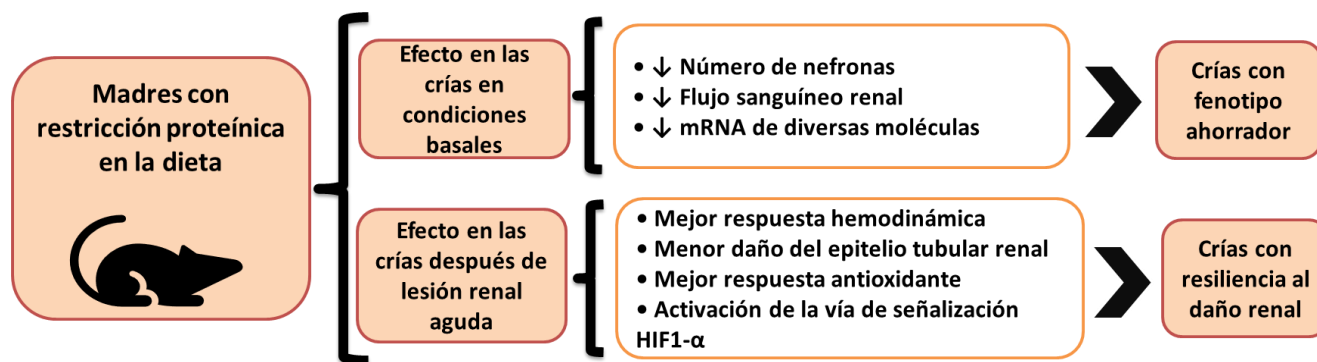
Debido a que la hipoxia es el mecanismo inicial de daño al epitelio tubular renal, se decidió evaluar los niveles de RNAm de HIF-1 $\alpha$  y su gen blanco VEGF (Fig. 14A-B). De forma interesante se observó reducción significativa en HIF-1 $\alpha$  en el grupo CC+IR, mientras que en el resto de los grupos el resultado fue opuesto, ya que, los niveles de RNAm incrementaron significativamente en todos los grupos con RPM. El impacto de esta diferencia se hizo evidente en los niveles de RNAm de VEGF en el cual se encontró reducción significativa en el grupo CC+IR, lo cual no se observó en ningún grupo con RPM. Este resultado nos sugiere que ante la hipoxia inducida por la IR, la vía de señalización de HIF-1 $\alpha$  podría ser uno de los mecanismos de renoprotección en las crías provenientes de madres con RPM.

En resumen, los resultados más importantes de este primer modelo experimental fue que las crías con RPM en condiciones basales (sin IR) mostraron un menor número de nefronas y como consecuencia menor flujo sanguíneo renal, así como, un incremento en la fracción de filtración como compensación fisiológica para mantener la función renal normal. Posterior al daño renal inducido por IR, las crías con RPM (RC y RR) tuvieron una mejor respuesta hemodinámica al recuperar de forma más rápida el FSR y permitir una perfusión sanguínea y un aporte de oxígeno más adecuado, lo cual pudo haber impactado en el menor daño epitelial tubular que mostraron estos grupos. Otros mecanismos explorados que pudieron conferir cierto grado de renoprotección incluyen la mejor respuesta antioxidante y la activación de la vía de señalización de HIF1- $\alpha$ .





**Figura 14.** Los grupos de restricción proteínica materna tuvieron una mejor respuesta a la hipoxia evaluada por los niveles de RNAm de la vía de señalización de HIF1- $\alpha$ , después de isquemia/reperfusión renal (IR), de crías provenientes de madres alimentadas con dieta control (grupo CC, barra blanca) o madres con restricción proteínica durante la lactación (grupo CR, barra gris claro), gestación (grupo RC, barra gris intenso) o ambas (grupo RR, barra negra). A) HIF (factor inducible por hypoxia) 1- $\alpha$ , B) Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). Los resultados se presentan como promedio  $\pm$  EE del porcentaje de cambio con base en el control de cada grupo sin IR. n= por lo menos 5 ratas por grupo. \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs. control de cada grupo sin IR.  $\epsilon$  p<0.05 vs. el control (CC+IR).



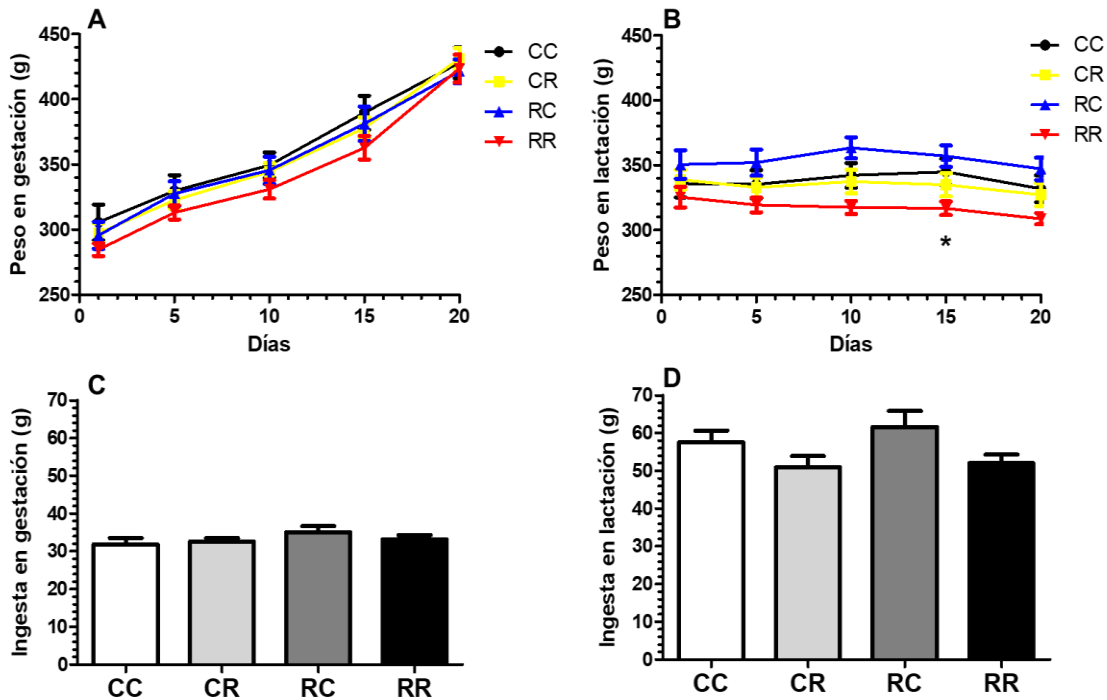
**Figura 15.** Resumen de los hallazgos más importantes encontrados en las crías provenientes madres con restricción proteínica materna durante la gestación (RC) y durante gestación y lactancia (RR).

## **5.2 Resultados preliminares del impacto de la restricción proteínica materna en condiciones basales y en la transición de lesión renal aguda a enfermedad renal crónica.**

Derivado de estos resultados previamente descritos en donde los grupos de RPM mostraron resiliencia a la LRA, la pregunta de investigación que nos planteamos es si esta renoprotección se mantiene a lo largo del tiempo, para lo cual decidimos explorar el impacto de la RPM a largo plazo (5 meses post IR) después de la inducción de daño renal por IR, es decir, en la transición de la LRA a la ERC. En el modelo experimental anterior surgieron cuestionamientos interesantes con respecto a la influencia de la restricción proteínica en la condición corporal y comportamiento alimenticio, tanto de las madres como de las crías previo al procedimiento de IR renal, que nos permitiera caracterizar de forma más detallada el modelo.

### **5.2.1 La restricción proteínica en la dieta no afecta el peso corporal o la ingesta de alimento durante gestación o lactancia de las ratas madres.**

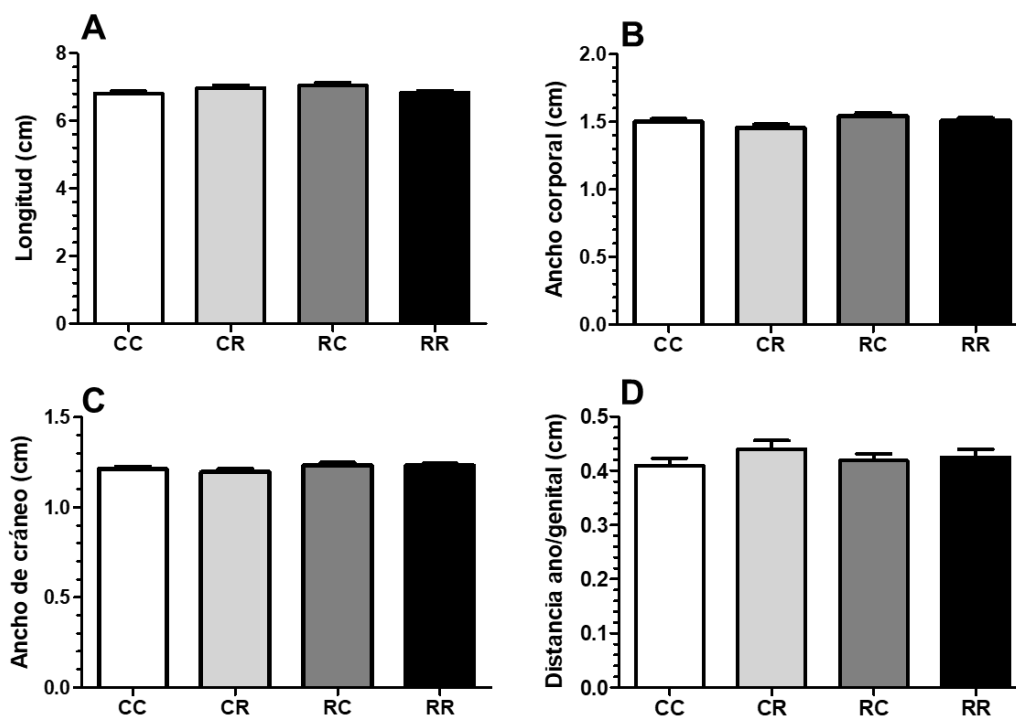
Este experimento se realizó para descartar que la modificación de proteína en la dieta en las diferentes etapas fisiológicas de gestación y lactancia tuviera algún efecto en la condición corporal o ingesta de alimento en las ratas madres y de esa forma corroborar que las diferencias en el desarrollo fetal sería exclusivamente influenciado por la restricción proteínica. En las ratas madres de los diferentes grupos, se determinó el peso corporal y la ingesta de alimento diariamente, desde el primer día de gestación, hasta el último día de lactación. En general no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el peso corporal, ni en la ingesta de alimento entre los grupos estudiados, con la excepción del grupo RR para el día 15 de lactación, en el cual se observó un peso estadísticamente menor comparado con el grupo CC (Fig. 15A-D). Estos resultados indican que la modificación de la dieta durante la gestación o lactancia no influye en la condición corporal de la rata madre.



**Figura 15.** Las diferentes dietas no afectan el peso corporal o ingesta de alimento en las ratas madres alimentadas con dieta control (grupo CC, barra blanca) o madres con restricción proteínica durante la lactación (grupo CR, barra gris claro), gestación (grupo RC, barra gris intenso) o ambas (grupo RR, barra negra). A) peso corporal durante gestación, B) peso corporal durante lactación, C) ingesta de alimento durante gestación, D) ingesta de alimento durante lactación. Los resultados se presentan como promedio  $\pm$  EE. n= por lo menos 4 ratas por grupo. \*P<0.05, RR vs. CC.

### 5.2.2 La restricción proteínica materna no influyó en las determinaciones morfométricas al nacimiento las crías.

Un hallazgo documentado en la literatura principalmente en humanos corresponde al baja talla al nacimiento como consecuencia de desnutrición durante la gestación. Para corroborar si existen diferencias en la condición corporal en las crías con RPM al nacimiento, se realizaron las mediciones morfométricas de ancho corporal, ancho de cráneo, longitud corporal y distancia ano/genital. En ninguno de los parámetros se observaron diferencias estadísticas significativas entre grupos (Fig. 16A-D).

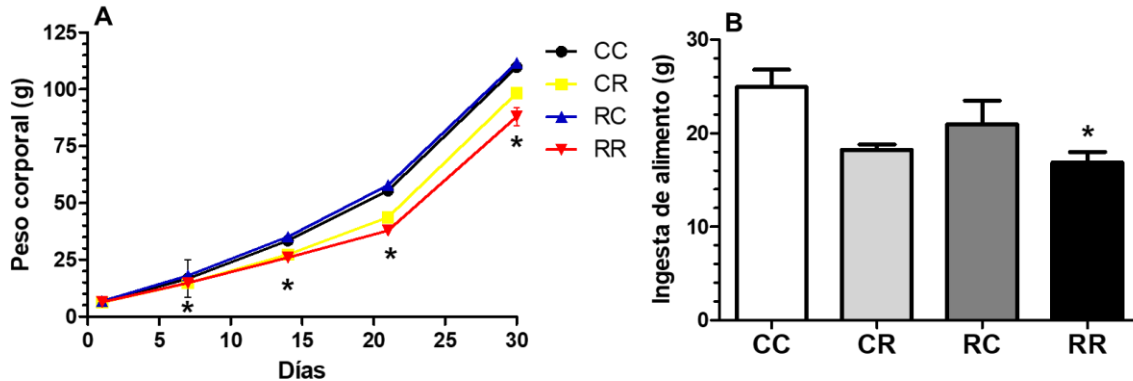


**Figura 16.** La restricción proteínica materna no influyó en la medición de los parámetros morfométricos determinados al nacimiento en las crías provenientes de madres alimentadas con dieta control (grupo CC, barra blanca) o madres con restricción proteínica durante la lactación (grupo CR, barra gris claro), gestación (grupo RC, barra gris intenso) o ambas (grupo RR, barra negra). A) longitud corporal, B) ancho corporal, C) ancho de cráneo, D) distancia ano/genital. Los resultados se presentan como promedio  $\pm$  EE. n= por lo menos 16 ratas por grupo.

### 5.2.3 Las crías de los grupos de RPM (CR y RR) mostraron un menor peso corporal durante los primeros 30 días de vida.

El peso al nacimiento es un dato clínico indicativo de eventos adversos intrauterinos durante el desarrollo fetal. Con el objetivo de conocer si existen diferencias en la condición corporal en las crías de los diferentes grupos de RPM se determinó el peso corporal al nacimiento, así como en los días 7, 14, 21 y 30. Al día de nacimiento no se encontraron diferencias estadísticas significativas, sin embargo, en los días 7, 14, 21 y 30 se observó disminución significativa en los grupos CR y RR comparado con el grupo control CC (Fig. 17A). De igual forma se midió la ingesta de alimento a los 30 días de edad, en donde, los grupos con RPM tienden a comer menos, pero solo el grupo RR presentó reducción

estadísticamente significativa, comparado con el grupo control (Fig. 17B). Estos resultados confirman que la doble restricción proteínica (durante la gestación y la lactancia) y exclusivamente durante la lactancia influyó en el desarrollo fetal modificando la constitución corporal y el comportamiento alimenticio, esto último en el grupo RR en particular.



**Figura 17.** Las crías de RPM (CR y RR) mostraron reducción del peso corporal los primeros 30 días de vida. Medición del peso corporal e ingesta de alimento en las crías provenientes de madres alimentadas con dieta control (grupo CC, barra blanca) o madres con restricción proteínica durante la lactación (grupo CR, barra gris claro), gestación (grupo RC, barra gris intenso) o ambas (grupo RR, barra negra). A) peso corporal medido al día de nacimiento y los días 7, 14, 21 y 30, B) ingesta de alimento medido al día 30 de edad. Los resultados se presentan como promedio  $\pm$  EE.  $n =$  por lo menos 16 ratas por grupo. En A) \*  $P < 0.05$  de los grupos CR y RR vs. CC. En B) \*  $P < 0.05$  vs. CC.

#### 5.2.4 Todos los grupos experimentales presentan el mismo grado de disfunción renal y las crías con RPM menor producción de $H_2O_2$ urinario evaluados 24 h post-isquemia renal.

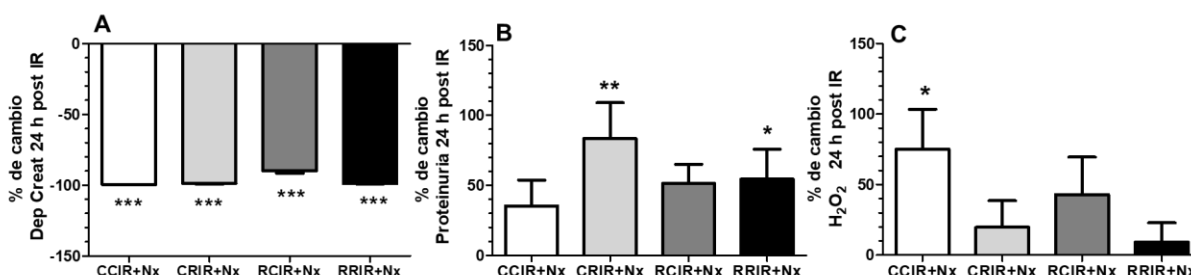
Una vez que las crías provenientes de madres con RPM durante la gestación, lactancia o ambas, o las crías control alcanzaron un peso entre 280 – 330 g, se sometieron al procedimiento de isquemia/reperfusión renal o cirugía falsa más nefrectomía (para acelerar el daño renal). El objetivo de este experimento es evaluar el impacto de la RPM sobre la transición de la LRA a ERC, para lo cual se realizaron evaluaciones 24 h post isquemia y posteriormente seguimientos mensuales de proteinuria hasta 5 meses post-IR para evaluar la progresión de la enfermedad renal.

Después de 24 h posteriores a la IR renal se determinaron los parámetros de Dep Creat, proteinuria y peróxidos urinarios para evaluar la magnitud de la lesión renal.

Con respecto a la Dep Creat, de acuerdo con lo esperado se encontró una reducción significativa en todos los grupos cuando se compararon contra su propio control sin IR, lo cual indica disfunción renal. Comparando los %C entre grupos el comportamiento fue similar (Fig. 18A).

En proteinuria se observó un incremento en todos los grupos, sin embargo, solo fue significativamente diferente en el grupo CRIR+Nx y RRIR+Nx cuando se comparó contra su propio control, de igual forma entre grupos no hubo diferencias (Fig. 18B).

Un resultado interesante se encontró en el peróxido urinario como marcador de estrés oxidante, ya que, en el grupo CCIR+Nx hubo incremento significativo, a diferencia de los grupos con RPM, en donde el incremento fue menor y no estadísticamente significativo cuando se comparó con su propio grupo. Este hallazgo indica que el daño oxidante después de la IR fue mayor en el grupo CCIR+Nx, en comparación con los grupos de RPM, lo cual, podría tener consecuencias a largo plazo en la progresión de la ERC (Fig. 18C).

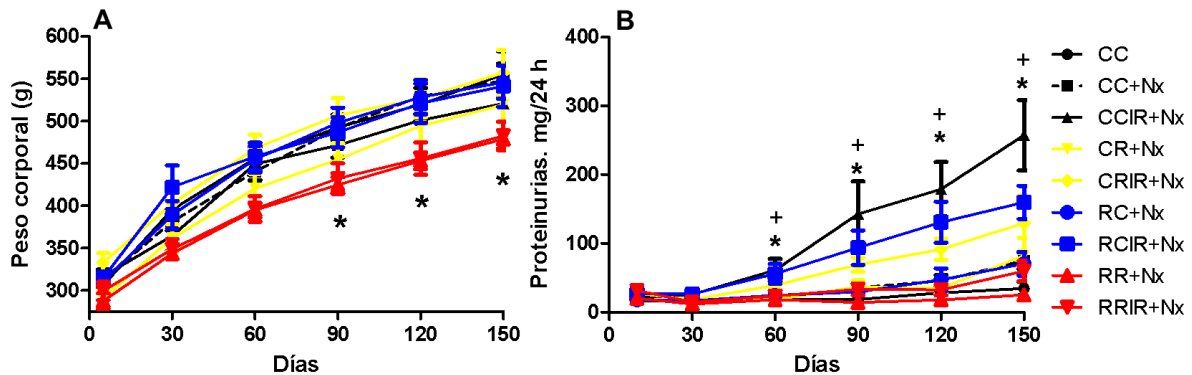


**Figura 18.** Los diferentes grupos experimentales mostraron el mismo grado de disfunción renal y los grupos de restricción proteínica materna mayor daño oxidante 24 h posterior a isquemia /reperfsión (IR) más nefrectomía (Nx) en crías provenientes de madres alimentadas con dieta control (grupo CC, barra blanca) o madres con restricción proteínica durante la lactación (grupo CR, barra gris claro), gestación (grupo RC, barra gris intenso) o ambas (grupo RR, barra negra). A) Depuración de creatinina (Dep Creat), B) Proteinuria, C) Peróxidos urinarios (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Los resultados se presentan como promedio ± EE del porcentaje de cambio con base en el control sin IR de cada grupo. n= por lo menos 7 ratas por grupo. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\* P<0.001 vs. control de cada grupo sin IR.

### 5.2.5 Seguimiento mensual de peso corporal y proteinuria durante la transición de la LRA a ERC en las crías con RPM.

Con el objetivo de comprobar si las diferencias detectadas en el peso en los primeros 30 días de edad de las crías del grupo CR y RR se mantienen a largo plazo, se dio seguimiento al peso corporal desde el primero hasta el quinto mes posterior a la IR+Nx. En el 3º, 4º y 5º mes, solo se observó reducción significativa en el peso corporal del grupo RR+Nx (sin isquemia) comparado con el grupo control CC+Nx (Fig. 19A).

Con la finalidad de evaluar la transición de la LRA a ERC se evaluó la proteína urinaria mensualmente. De forma interesante, a partir de los dos meses posteriores a la IR+Nx se observó incremento significativo en el grupo CCIR+Nx en comparación con el grupo CC+Nx. El mismo comportamiento se presentó en el grupo RCIR+Nx en comparación con el grupo RC+Nx. Hasta el momento estos resultados indican cierta resiliencia a la transición de la LRA a ERC en los grupos CR+Nx y RR+Nx (Fig. 19B).



**Figura 19.** Seguimiento mensual del peso corporal y proteinuria en las crías con isquemia/reperfusión renal más nefrectomía (IR+Nx) provenientes de madres alimentadas con dieta control (grupo CC) o madres con restricción proteínica durante la lactación (grupo CR), gestación (grupo RC) o ambas (grupo RR). A) Peso corporal, B) Proteinuria. Los resultados se presentan como promedio  $\pm$  EE.  $n =$  por lo menos 7 ratas por grupo. En A) \* $P < 0.05$  del grupo RR+Nx vs. CC+Nx. En B) \* $P < 0.05$  CC+Nx vs CCIR+Nx, +.  $P < 0.05$  RC+Nx vs. RCIR+Nx.

### **5.2.6 Determinación de condición corporal e ingesta de alimento en las crías con restricción proteínica materna al quinto mes.**

Para ampliar el conocimiento con respecto a la condición corporal, al 5º mes (final del estudio) posterior a la IR+Nx y previo a la eutanasia de las crías, se determinó ingesta de alimento, peso corporal y el porcentaje de grasa y músculo, a través de resonancia magnética.

En la mayoría de los parámetros no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos (Fig. 20A-D). Las excepciones fueron en el peso corporal que, como demostramos anteriormente, fue menor con diferencia estadísticamente significativa en el grupo RR+Nx en comparación con el grupo CC+Nx (Fig. 19B). Con respecto al % de grasa, el grupo CRIR+Nx fue significativamente mayor en comparación con el grupo CCIR+Nx (Fig. 20C). Este resultado del peso corporal en conjunto con los observados desde los primeros días de nacimiento de las crías y en el transcurso de los meses, indican que en particular el grupo RR+Nx sin isquemia presentó una reducción en su condición corporal, a pesar de no existir diferencias estadísticas en el consumo de alimento, lo cual se le puede atribuir a características fenotípicas programadas durante el desarrollo fetal o a que este grupo tiene mayor movilidad y gasto energético.

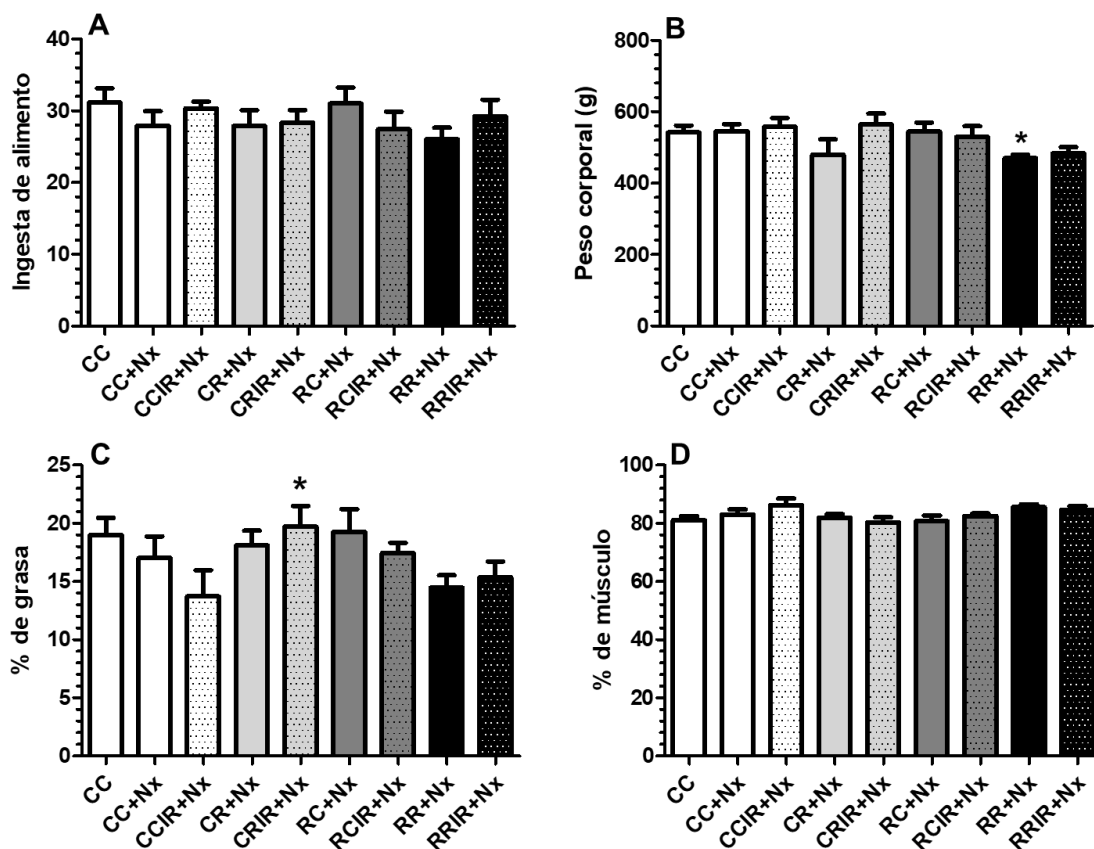
En resumen, los resultados más importantes de este modelo de estudio indican que las crías del grupo RR previo a la inducción del daño renal, mostraron de forma significativa menor peso corporal desde el día 7 de nacimiento hasta el día 30, lo cual indica una programación metabólica distinta durante el desarrollo fetal. De igual forma se observó una menor ingesta de alimento medida en el día 30 post-cirugía.

Después de 24 h del daño renal inducido por IR, todos los grupos mostraron el mismo grado de disfunción renal medida por la depuración de creatinina. La proteinuria, aunque fue evidente en todos los grupos únicamente hubo diferencias estadísticamente significativas en los grupos CRIR+Nx y RRIR+Nx. Un dato interesante en la excreción de peróxidos urinario es que el incremento fue únicamente significativo en el grupo control con isquemia (CCIR+Nx), lo cual es indicativo de menor daño oxidante que concuerda con lo que reportamos en el estudio anterior en donde los grupos de las crías con RPM mostraron mayor protección antioxidante.

En la evaluación durante los 5 meses posteriores al daño renal. El grupo RR+Nx fue el único que mantuvo un peso corporal significativamente menor a pesar de tener una



ingesta de alimento similar a los otros grupos. Uno de los resultados hasta el momento más importante es que el grupo CC+IR mostró una proteinuria significativamente mayor desde el 2º mes hasta el 5º comparado con el resto de los grupos de RPM, lo cual indica que nuevamente los grupos de RPM tienen cierta resiliencia al daño renal a largo plazo, sin embargo, es necesario hacer énfasis en que estos resultados hasta el momento son de carácter preliminar debido a que el estudio está en curso.



**Figura 20.** Determinación de ingesta de alimento y condición corporal al 5º mes post isquemia/reperfusión renal (IR) más nefrectomía (Nx) en las crías provenientes de madres alimentadas con dieta control (grupo CC, barra blanca) o madres con restricción proteínica durante la lactación (grupo CR, barra gris claro), gestación (grupo RC, barra gris intenso) o ambas (grupo RR, barra negra). Las barras punteadas indican los grupos con isquemia. A) ingesta de alimento, B) peso corporal, C) %de grasa, D) % de músculo. Los resultados se presentan como promedio  $\pm$  EE. n= por lo menos 7 ratas por grupo. En B) \*P<0.05 del grupo RR+Nx vs. CC+Nx. En C) \*P<0.05 CRIR+Nx vs. CCIR+Nx.

## 6.0 DISCUSIÓN.

### 6.1 La restricción proteínica materna en ratas confiere resiliencia en las crías ante un episodio de la lesión renal aguda.

La nutrición materna juega un papel fundamental en el crecimiento adecuado y en el desarrollo del feto. La falta de nutrientes durante la gestación puede producir alteraciones permanentes tanto estructurales, como, funcionales. En México, el alto porcentaje de personas en situación de pobreza e inseguridad alimentaria influye negativamente en las mujeres en edad reproductiva, las embarazadas y durante la lactación.

El objetivo de este estudio fue evaluar el impacto de la RPM durante la gestación, la lactación o ambas, después de un episodio de lesión renal aguda en ratas crías macho.

Antes de explicar el efecto de la lesión renal aguda, fue necesario conocer la influencia de la RPM sobre las características fisiológicas renales de todas las crías de los grupos estudiados.

Uno de los resultados importantes fue la confirmación de la reducción del número de nefronas en las crías de los grupos de RPM durante la gestación, como estaba previamente descrito.<sup>104 118 125 126 127 128</sup> Sin embargo, en todos esos estudios no evaluaron el efecto de la RPM durante la lactación. En este estudio se describe por primera vez que la RPM durante la lactación (grupo CR) también tiene un efecto negativo en la nefrogénesis y se reduce el número de nefronas, aunque este efecto es menos importante, que cuando se compara la RPM durante gestación (grupo RC) o la doble restricción (grupo RR). Vale la pena hacer énfasis en que la nefrogénesis en ratas continúa por 2 semanas después del nacimiento, a diferencia con humanos en donde se detiene después del nacimiento.<sup>129</sup>

La importancia clínica del número de nefronas al nacimiento está dada por la clara evidencia en humanos y en estudios experimentales en donde se ha demostrado que, mientras menor es el número de nefronas, mayor es el riesgo de padecer enfermedades renales crónicas y cardiovasculares en la vida adulta.<sup>98 104 118 125 126 127 128 130</sup>

Un hallazgo de particular interés fue la reducción significativa del flujo sanguíneo renal, en las crías de RPM, el cual pudo ser resultado del reducido número de nefronas. Este hallazgo también ha sido descrito recientemente en un modelo murino con restricción calórica más RPM y la causa se asoció con disfunción endotelial y una reducida densidad vascular.<sup>19 131</sup>

A pesar de que no hubo diferencias en la presión arterial media, la depuración de creatinina y la proteinuria, el incremento de la fracción de filtración particularmente en los grupos RC y RR indican un estado de hiperfiltración, lo cual permitió el mantenimiento de la función renal dentro de los parámetros normales. Si bien inicialmente este es un mecanismo fisiológico compensatorio, se ha demostrado en humanos y animales que a la larga puede ser deletéreo, debido a que induce alteraciones hemodinámicas que conllevan a glomeruloesclerosis, pérdida progresiva de nefronas y culminan en enfermedad renal crónica en la vida adulta.<sup>98 104 132 133 134</sup>

La regulación del FSR, es compleja y está determinada por el tono vascular de las arteriolas pre y post glomerulares, las cuales son controladas por diversos factores vasoactivos.<sup>135</sup> En este estudio se evaluaron los RNAm de los principales factores vasoactivos que influyen en riñón, (eNOS, pre-pro endotelina1 y sus receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> y el receptor ATI), enzimas antioxidantes (catalasa, SOD1 y Gpx) y las moléculas proinflamatorias (TNF- $\alpha$  e IL6).

En ratas se ha demostrado<sup>108</sup> que la RPM induce reducción significativa en las concentraciones de renina y Angiotensina II en tejido renal de crías recién nacidas. Estos hallazgos coinciden con nuestros resultados, ya que, en nuestro estudio se encontró que todas las crías con RPM mostraron reducción significativa en los niveles de RNAm de la mayoría de las moléculas estudiadas. Esto podría explicarse con la teoría denominada “fenotipo ahorrador” propuesta por Hales y Baker<sup>136</sup> en donde se ha demostrado en fetos humanos con desnutrición durante la gestación que existen adaptaciones metabólicas asociadas a una estrategia de supervivencia para ahorrar energía.<sup>137 138</sup> La respuesta fetal a la desnutrición materna está dada principalmente para la protección de los órganos vitales como el corazón y el cerebro, aunado a esto se inducen adaptaciones metabólicas ventajosas para la sobrevivencia después del nacimiento. Por lo tanto, el fenotipo ahorrador (tanto en la vida pre y postnatal) es eficiente en la conservación de nutrientes y adaptaciones metabólicas hasta después del nacimiento.<sup>139</sup> Este proceso conduce al organismo postnatal a adaptarse para sobrevivir a condiciones de adversidad.<sup>140</sup> Este fenómeno se ha descrito también con respecto a la exposición al frío. Las crías de borregos expuestos al frío durante la gestación se encuentran en el momento del parto mejor adaptados para responder a condiciones de frío adversas después del nacimiento.<sup>141 142</sup> Vale la pena mencionar que no se puede excluir la posibilidad de que los menores niveles de RNAm estudiados puedan ser resultado de un menor número de nefronas observado en las crías con RPM.

Inicialmente hipotetizamos que, debido a la conocida reducción en el número de nefronas en los grupos con RPM, las crías deberían ser más susceptibles a un segundo reto como el daño renal inducido por IR. Sin embargo, nuestros resultados demostraron lo contrario. A pesar de que las crías de los grupos de RPM presentaron una disfunción renal similar a la del grupo control, el daño estructural inducido por IR fue menor particularmente en el grupo RC+IR y RR+IR, comparado con el grupo CC+IR. Estos resultados también fueron confirmados por la presentación de menor proteinuria, menor concentración de biomarcadores urinarios de daño renal (HSP72 y KIM-1) y menor peso renal (indicador indirecto de inflamación). Estos datos sugieren también que la RPM durante la gestación tiene un impacto profundo en el desarrollo renal y su capacidad para adaptarse que aquellos observados con la RPM durante la lactación.

Aquí proponemos que las crías con RPM durante la gestación o la gestación y lactación son resilientes al daño renal comparadas con el grupo control. La resiliencia puede ser considerada como la capacidad de un organismo para adaptarse adecuadamente después de la exposición a algunas circunstancias adversas o estresantes.<sup>143 144</sup>

De acuerdo con nuestros resultados, una primera explicación de la menor severidad de LRA, es que estos animales tienen mejor habilidad para recuperarse del FSR, lo cual no fue únicamente evidente en la medición directa de este parámetro, sino estructuralmente en la evaluación del área de los penachos glomerulares, en donde se observó que después de la IR hubo reducción en el diámetro del penacho glomerular en el grupo CC+IR, indicando vasoconstricción glomerular e hipoperfusión renal, un efecto que no se observó en los grupos experimentales después de 24 h post IR. Esta rápida recuperación del FSR en las crías de los grupos de RPM marcó una importante diferencia debido a que la perfusión renal y la oxigenación juega un papel central en el establecimiento y extensión del daño renal.<sup>13 15 18 20 145</sup>

Nosotros exploramos algunos mecanismos que pueden influir en la baja severidad de la LRA observada en las crías de RPM. El daño isquémico en el grupo control (CC+IR) fue asociado con la reducción significativa en los niveles del RNAm del receptor AT<sub>1</sub> y el receptor ET<sub>B</sub> comparado con el grupo control sin IR. En contraste, estos efectos no fueron observados en los grupos de RPM. En los grupos de RPM se observó incremento significativo en los niveles de RNAm del receptor ET<sub>A</sub>. Este patrón diferencial encontrado en las moléculas vasoactivas en los grupos de RPM y no en el grupo control promovieron una rápida recuperación del FSR, sin embargo, sería de ayuda estudios de micropunción

para evaluar la hemodinámica renal y en particular determinar la resistencia de las arteriola aferente y eferente; y de esa forma contribuir al entendimiento del comportamiento diferenciado del FSR.

La LRA inducida por IR se caracteriza por un persistente estado de hipoxia que contribuye de manera importante al mecanismo fisiopatológico del daño tubular y endotelial.<sup>146</sup> Los riñones y en particular los túbulos renales son altamente demandantes de oxígeno, lo cual los hace más vulnerables a la hipoxia.<sup>147</sup> Una de las respuestas celulares a la hipoxia es la inducción de HIF1- $\alpha$ , que es un factor de transcripción maestro que al activarse por hipoxia induce una variedad de respuestas adaptativas incluyendo la expresión de genes que controlan la liberación de oxígeno, vascularización y metabolismo de la glucosa (eritropoyetina, VEGF y transportador de glucosa 1, entre otros). Estos genes están a cargo de restaurar la homeostasis, estimular la eritropoyesis, la angiogénesis, la glucólisis anaeróbica y otros procesos de reparación.<sup>61 146 148 149 150</sup> Por lo tanto, la inducción de HIF1- $\alpha$  tiene un papel fundamental durante el proceso de reparación y tiene un efecto protector en la LRA.<sup>61 148</sup>

En el presente estudio evaluamos la vía de HIF1- $\alpha$  como posible mecanismo responsable del menor daño renal observado en los grupos RC+IR y RR+IR. Nuestros resultados indican que HIF1- $\alpha$  tiene una clara respuesta diferencial a la isquemia renal en las crías de los grupos de RPM, comparado con el grupo control (CC+IR), evidenciado por la reducción significativa en los niveles de RNAm en el grupo CC+IR, lo cual no fue visto en los grupos de RPM. Para confirmar la activación de la vía de señalización HIF1- $\alpha$ , decidimos determinar RNAm de VEGF como uno de sus genes blanco y su implicación en la LRA. La respuesta que observamos en VEGF coincide con los resultados en HIF1- $\alpha$ , puesto que hubo disminución significativa de VEGF en el grupo CC+IR, lo cual tampoco se observó en los grupos de RPM. Estos resultados sugieren que esta mejor respuesta de HIF1- $\alpha$  en los grupos de RPM después de la lesión renal podría ser otro mecanismo por el cual estos grupos se protegieron del daño isquémico. En apoyo a esta hipótesis, diferentes estudios han demostrado que el incremento de HIF1- $\alpha$  confiere renoprotección en contra de la lesión renal por isquemia. La estabilización de HIF1- $\alpha$  a través de la inhibición de las proli-hidroxilasas demostró una atenuación en el daño renal inducido por IR asociado con disminución en la apoptosis, menor infiltración de macrófagos, así como, incremento en la regulación de genes blancos de HIF.<sup>151 152 153</sup> Resultados similares se encontraron en un modelo de daño renal inducido por cisplatino.<sup>154</sup> Contrariamente cuando utilizaron ensayos

de silenciamiento (siRNA) contra HIF1- $\alpha$ <sup>155</sup> o cuando se estudiaron ratones knockout de HIF1 y HIF2, el daño renal se exacerbó.<sup>156</sup> Aunado a esto, se conoce también que la activación de HIF1- $\alpha$  durante la fase de reperfusión favorece la regeneración del epitelio tubular proximal promoviendo la expresión de genes de reparación de tejido.<sup>155</sup>

Las ERO en condiciones fisiológicas se requieren para mantener funciones de señalización celular, sin embargo, la sobreproducción anormal juegan papel importante en la mediación del daño renal.<sup>28 29</sup> Se ha descrito que las ERO alteran la hemodinámica renal, promueve inflamación, incrementan la absorción de sodio en el túbulo distal de la nefrona provocando la expansión de volumen.<sup>19</sup> Los niveles de RNAm de SOD1 y Gpx, enzimas que protegen contra el daño oxidante disminuyeron en todos los grupos después de la IR, pero la reducción de ambas enzimas fue significativamente menor en los grupos de RPM comparados con el control, por lo tanto, la defensa antioxidante puede ser un factor adicional que explique el menor daño renal en estos grupos. Aunque no se pudo establecer el mecanismo de este efecto protector, recientemente se demostró que bajo condiciones de hipoxia, la activación de HIF1- $\alpha$  y la inhibición de las proteínas proil-hidroxilasas pueden activar el factor de transcripción FOXO3 (Forkhead box O3) que confiere protección renal, modulando la respuesta al estrés oxidante, autofagia, metabolismo celular, apoptosis y diferenciación celular.<sup>157</sup>

Tanto la IL6 y el TNF- $\alpha$  son moléculas producidas principalmente por leucocitos que tienen una participación importante durante el proceso inflamatorio y que por lo tanto se usan frecuentemente como biomarcadores de inflamación. Con respecto a las concentraciones de RNAm de IL-6 hubo un incremento significativo que ocurrió en todos los grupos sin presentar diferencias entre ellos, sin embargo, para TNF- $\alpha$ , el incremento fue solamente significativo en el grupo RC y RR. Este es un resultado inesperado, puesto que estos grupos tuvieron un menor daño renal, sin embargo, otros mediadores inflamatorios que no se determinaron pudieron participar también.

En resumen, bajo condiciones basales, la RPM impacta negativamente a la nefrogénesis induciendo menor número de nefronas al nacimiento. Las nefronas que permanecen tienen una respuesta compensatoria a través de hiperfiltración glomerular que mantiene la función renal normal. Otro importante hallazgo de este estudio fue la disminución de la mayoría de los niveles de RNAm estudiados, lo cual sugiere que la RPM, durante la gestación, lactación o ambas induce un fenotipo ahorrador en las crías.

Después de la lesión renal inducida por isquemia las crías de los grupos de RPM y particularmente RC+IR y RR+IR tuvieron menor daño renal, el cual puede ser atribuido a la rápida recuperación del FSR. La causa de esta respuesta no pudo ser clarificada, sin embargo, los cambios en el patrón de los RNAm de las moléculas vasoactivas comparadas con el grupo control pudieron contribuir a la temprana recuperación del FSR.

Dentro de los resultados que explican los mecanismos de resiliencia renal a la IR encontramos mejor respuesta de HIF1- $\alpha$  (medido por RNAm y WB), así como mejor respuesta antioxidante.

## 6.2 La resiliencia al daño renal se mantiene en la transición de LRA a ERC principalmente en los grupos de doble restricción proteínica materna (RR).

En el estudio anterior, una de las conclusiones importantes es que las crías con RPM en particular los grupos RC+IR y RR+IR mostraron resiliencia a la LRA inducida por IR.

Con base en lo discutido previamente, podemos inferir en términos generales que las crías generaron un fenotipo que estableció mecanismos que favorecieron la resiliencia cuando se expusieron a un segundo reto como la IR. La plasticidad de los organismos durante el desarrollo promueven la supervivencia, lo cual evita la muerte o alteraciones severas inmediatas a pesar de que esto pueda tener consecuencias negativas a largo plazo.<sup>94</sup>

La pregunta que nos interesaba responder con el modelo transición de LRA a ERC era si ¿la resiliencia detectada de forma aguda podía sostenerse a largo plazo?.

De acuerdo con los resultados preliminares, cuando evaluamos la proteinuria mensualmente como un marcador de progresión de daño renal, encontramos que el grupo control más IR (CCIR+Nx) presentó proteinuria progresiva indicativa de daño renal, la cual se observó también aunque en menor magnitud en el grupo RCIR+Nx. Este hallazgo no fue observado en los demás grupos de RPM. Este resultado por el momento sugiere que en particular el grupo RR+Nx podrían conservar los mismos mecanismos que confirieron la resiliencia de forma aguda (24 h pos-I/R).

Diversos factores son determinantes para que se presente la progresión de LRA a ERC, dentro de los que se encuentran la naturaleza, la magnitud y la duración de la lesión, así como, los mecanismos de reparación que pueden ser adaptativos (eficientes) o mal-adaptativos (ineficientes).<sup>40</sup> Con base en los resultados del estudio de LRA en donde se observó menor daño renal en los grupos de RPM (particularmente RC+IR y RR+IR) una primera hipótesis para explicar la renoprotección a largo plazo se puede fundamentar en diversos estudios en donde demostraron que mientras mayor es la intensidad de la lesión renal, existe mayor riesgo y probabilidad de progresión a ERC,<sup>35 37 158</sup> sin embargo, es necesario concluir el estudio para poder evaluar de forma más exhaustiva las diferencias en la magnitud del daño renal y los mecanismo de la renoprotección.



## 7.0 CONCLUSIÓN.

En este estudio se muestran las alteraciones que un ambiente intrauterino adverso puede inducir en la fisiología renal de las crías. Específicamente hemos demostrado que la restricción proteínica materna (RPM) durante gestación o gestación más lactancia, resulta en la reducción del número de nefronas en las crías, las cuales, cuando se sometieron al procedimiento de daño renal por isquemia-reperfusión (IR) exhibieron una respuesta más eficiente y por lo tanto resiliencia al daño renal. Esta respuesta de renoprotección se mantuvo a largo plazo por lo cual se confirma que la severidad de la lesión de la lesión renal aguda determina la progresión de la enfermedad renal crónica.

Inicialmente la hipótesis propuesta era que las crías provenientes de madres con RPM serían más susceptibles al daño renal inducido por IR, sin embargo, nuestros resultados demostraron una respuesta distinta, esto significa que dependiendo del tipo de evento adverso intrauterino, la programación durante el desarrollo fetal no siempre es negativa, puesto que puede generar fenotipos que resulten con mayor capacidad o que estén mejor adaptados para responder favorablemente a un segundo reto en la vida adulta (fenotipo resiliente). Aunado a esto, la inducción del daño renal como segundo reto se llevó a cabo en ratas jóvenes (3 meses de edad), por lo cual existe la posibilidad de que esta respuesta será diferente si el daño renal se induce en ratas adultas o de mayor edad por lo cual merece futuras investigaciones.

Debido a la cada vez mayor prevalencia de enfermedades crónico degenerativas en humanos y a la creciente evidencia de su relación con los eventos adversos durante el desarrollo fetal, estos resultados abren una nueva línea de investigación para estudiar los mecanismos que puedan estar involucrados en la respuesta diferencial exhibida por las crías provenientes de madres con restricción proteínica.

## 8.0 PESPECTIVAS.

Las enfermedades renales con base en su curso se han clasificado en agudas y crónicas. A través de este estudio hemos podido determinar que en las crías con restricción proteínica materna existe resiliencia a la lesión renal aguda (24 h post-isquemia renal), así como dilucidar algunos de los mecanismos probables que podrían estar participando, sin embargo, desconocemos cual será la respuesta fisiopatológica a mediano y largo plazo y si esta renoprotección se mantiene. En el curso de los siguientes modelos experimentales trataremos de establecer si la restricción proteínica materna y su influencia en la nefrogénesis puede tener un efecto en la progresión de la enfermedad renal.

## 9.0 REFERENCIAS.

1. Guyton A. C. *Tratado de Fisiología Médica*. Vol 12.; 2011. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
2. Rennke HG, Denker BM. *Fisiopatología Renal. Fundamentos*. 5a ed. Barcelona: Wolters Kluwer; 2019.
3. Eaton DC, Pooler JPP. *Vanders´s Renal Physiology*. 8th ed. New York: Mc Graw Hill; 2013.
4. Brown S. Physiology of the kidney. In: Bartges J, Polzin DJ, eds. *Nephrology and Urology of Small Animals*. Malaysia; 2011:10-22.
5. Levey AS, James MT. Annals graphic medicine - The problem list. *Ann Intern Med*. 2017;167(9):ITC65-ITC79. doi:10.7326/AITC201711070
6. Takaori K, Yanagita M. Insights into the Mechanisms of the Acute Kidney Injury-to-Chronic Kidney Disease Continuum. *Nephron*. 2016;134(3):172-176. doi:10.1159/000448081
7. Bellomo R, Kellum JA, Ronco C. Acute kidney injury. *Lancet*. 2012;380(9843):756-766. doi:10.1016/S0140-6736(11)61454-2
8. Kellum J a, Lameire N, Aspelin P, et al. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. *Kidney Int Suppl*. 2012;2(1):1-138. doi:10.1038/kisup.2012.7
9. Lameire NH, Bagga A, Cruz D, et al. Acute kidney injury: An increasing global concern. *Lancet*. 2013;382(9887):170-179. doi:10.1016/S0140-6736(13)60647-9
10. Rewa O, Bagshaw SM. Acute kidney injury—epidemiology, outcomes and economics. *Nat Rev Nephrol*. 2014;10(4):193-207. doi:10.1038/nrneph.2013.282
11. Mehta RL, Cerdá J, Burdmann EA, et al. International Society of Nephrology's Oby25 initiative for acute kidney injury (zero preventable deaths by 2025): A human rights case for nephrology. *Lancet*. 2015;385(9987):2616-2643. doi:10.1016/S0140-6736(15)60126-X
12. Lewington A, Cerdá J, Mehta R. Raising awareness of acute kidney injury: a global perspective of a silent killer. *Kidney Int*. 2013;84(3):457-467. doi:10.1038/ki.2013.153.Raising
13. Zuk A, Bonventre J V. Acute Kidney Injury. *Annu Rev Med*. 2016;67(1):293-307. doi:10.1146/annurev-med-050214-013407
14. Sharfuddin A, Molitoris BA. Pathophysiology of ischemic acute kidney. *Nat Rev Nephrol*. 2011;7:189-200.
15. Maringer K, Sims-Lucas S. The multifaceted role of the renal microvasculature during acute kidney injury. *Pediatr Nephrol*. 2016;31(8):1231-1240. doi:10.1007/s00467-015-3231-2
16. Munshi R, Hsu C, Himmelfarb J. Advances in understanding ischemic acute kidney injury. *BMC Med*. 2011;9(1):11. doi:10.1186/1741-7015-9-11

17. García-Ortuño LE, Bobadilla NA. Integrative view of the mechanisms that induce acute kidney injury and its transition to chronic kidney disease. *Rev Investig Clin*. 2018;70(6):261-268. doi:10.24875/RIC.18002546
18. Bonventre J, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest*. 2011;121(11):4210-4221. doi:10.1172/JCI45161.4210
19. Abdulmahdi W, Rabadi MM, Jules E, et al. Kidney dysfunction in the low-birth weight murine adult: Implications of oxidative stress. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2018;315(3):F583-F594. doi:10.1152/ajprenal.00164.2018
20. Tögel F, Westenfelder C. Recent advances in the understanding of acute kidney injury. *F1000Prime Rep*. 2014;6(September):1-6. doi:10.12703/P6-83
21. Sancho-Martínez SM, López-Novoa JM, López-Hernández FJ. Pathophysiological role of different tubular epithelial cell death modes in acute kidney injury. *Clin Kidney J*. 2015;8(5):548-559. doi:10.1093/ckj/sfv069
22. Malek M, Nematbakhsh M. Renal ischemia/reperfusion injury; from pathophysiology to treatment. *J Ren Inj Prev*. 2015;4(2):20-27. doi:10.12861/jrip.2015.06
23. Lee SA, Noel S, Sadasivam M, Hamad ARA, Rabb H. Role of Immune Cells in Acute Kidney Injury and Repair. *Nephron*. 2017;21205(0):1-5. doi:10.1159/000477181
24. Pavlakou P, Liakopoulos V, Eleftheriadis T, Mitsis M, Dounousi E. Review Article Oxidative Stress and Acute Kidney Injury in Critical Illness: Pathophysiologic Mechanisms — Biomarkers — Interventions , and Future Perspectives. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:1-11. doi:10.1155/2017/6193694
25. Kinsey GR, Li L, Okusa MD. Inflammation in acute kidney injury. *Nephron - Exp Nephrol*. 2008;109(4). doi:10.1159/000142934
26. Ratliff BB, Rabadi MM, Vasko R, Yasuda K, Goligorsky MS. Messengers without borders: mediators of systemic inflammatory response in AKI. *J Am Soc Nephrol*. 2013;24(4):529-536. doi:10.1681/ASN.2012060633
27. Okamura DM, Pennathur S. The balance of powers: Redox regulation of fibrogenic pathways in kidney injury. *Redox Biol*. 2015;6(2):495-504. doi:10.1016/j.redox.2015.09.039
28. Ratliff BB, Abdulmahdi W, Pawar R, Wolin MS. Oxidant Mechanisms in Renal Injury and Disease. *Antioxid Redox Signal*. 2016;25(3):119-146. doi:10.1089/ars.2016.6665
29. Sureshbabu A, Ryter SW, Choi ME. Oxidative stress and autophagy: Crucial modulators of kidney injury. *Redox Biol*. 2015;4:208-214. doi:10.1016/j.redox.2015.01.001
30. Hosohata K. Role of oxidative stress in drug-induced kidney injury. *Int J Mol Sci*. 2016;17(11). doi:10.3390/ijms17111826
31. Agarwal A, Dong Z, Harris R, et al. Cellular and Molecular Mechanisms of AKI. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(5):1288-1299. doi:10.1681/ASN.2015070740
32. Gorin Y. The Kidney: An Organ in the Front Line of Oxidative Stress-Associated Pathologies. *Antioxid Redox Signal*. 2016;25(12):639-641.

doi:10.1089/ars.2016.6804

33. Bonventre J V., Zuk A. Ischemic acute renal failure: An inflammatory disease? *Kidney Int.* 2004;66(2):480-485. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.761
34. Pannu N. Bidirectional relationships between acute kidney injury and chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2013;22(3):351-356. doi:10.1097/MNH.0b013e32835fe5c5
35. Chawla LS, Eggers PW, Star RA, Kimmel PL. Acute Kidney Injury and Chronic Kidney Disease as Interconnected Syndromes. *N Engl J Med.* 2014;371(1):58-66. doi:10.1056/NEJMra1214243
36. Coca SG, Singanamala S, Parikh CR. Chronic kidney disease after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Kidney Int.* 2012;81(5):442-448. doi:10.1038/ki.2011.379
37. Chawla LS, Kimmel PL. Acute kidney injury and chronic kidney disease: an integrated clinical syndrome. *Kidney Int.* 2012;82(5):516-524. doi:10.1038/ki.2012.208
38. Ishani A, Xue JL, Himmelfarb J, et al. Acute Kidney Injury Increases Risk of ESRD among Elderly. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(1):223-228. doi:10.1681/ASN.2007080837
39. Mammen C, Abbas A Al, Skippen P, et al. Long-term Risk of CKD in Children Surviving Episodes of Acute Kidney Injury in the Intensive Care Unit : A Prospective. *YAJKD.* 2012;59(4):523-530. doi:10.1053/j.ajkd.2011.10.048
40. Basile DP, Bonventre J V., Mehta R, et al. Progression after AKI: Understanding Maladaptive Repair Processes to Predict and Identify Therapeutic Treatments. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(3):687-697. doi:10.1681/ASN.2015030309
41. Barrera-Chimal J, Pérez-Villalva R, Ortega JA, et al. Mild ischemic injury leads to long-term alterations in the kidney: Amelioration by spironolactone administration. *Int J Biol Sci.* 2015;11(8):892-900. doi:10.7150/ijbs.11729
42. Barrera-Chimal J, Pérez-Villalva R, Rodríguez-Romo R, et al. Spironolactone prevents chronic kidney disease caused by ischemic acute kidney injury. *Kidney Int.* 2013;83(1):93-103. doi:10.1038/ki.2012.352
43. Lima-posada I, Portas-cortés C, Pérez-villalva R. Gender Differences in the Acute Kidney Injury to Chronic Kidney Disease Transition. 2017;(July):1-38. doi:10.1038/s41598-017-09630-2
44. Rodríguez-Romo R, Benítez K, Barrera-Chimal J, et al. AT1 receptor antagonism before ischemia prevents the transition of acute kidney injury to chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2016;89(2):363-373. doi:10.1038/ki.2015.320
45. Bonventre J V. Maladaptive proximal tubule repair: Cell cycle arrest. *Nephron - Clin Pract.* 2014;127(1-4):61-64. doi:10.1159/000363673
46. Chevalier RL. The proximal tubule is the primary target of injury and progression of kidney disease: role of the glomerulotubular junction. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 2016;311(1):F145-F161. doi:10.1152/ajprenal.00164.2016
47. Humphreys BD, Valerius MT, Kobayashi A, et al. Intrinsic Epithelial Cells Repair the

- Kidney after Injury. *Cell Stem Cell*. 2008;2(3):284-291. doi:10.1016/j.stem.2008.01.014
48. Yang L, Besschetnova TY, Brooks CR, Shah J V., Bonventre J V. Epithelial cell cycle arrest in G2/M mediates kidney fibrosis after injury. *Nat Med*. 2010;16:535-143. doi:1528.Toll-like
  49. Venkatachalam MA, Weinberg JM, Kriz W, Bidani AK. Failed Tubule Recovery, AKI-CKD Transition, and Kidney Disease Progression. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(8):1765-1776. doi:10.1681/ASN.2015010006
  50. Koesters R, Kaissling B, LeHir M, et al. Tubular Overexpression of Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Induces Autophagy and Fibrosis but Not Mesenchymal Transition of Renal Epithelial Cells. *Am J Pathol*. 2010;177(2):632-643. doi:10.2353/ajpath.2010.091012
  51. Grgic I, Campanholle G, Bijol V, et al. Targeted proximal tubule injury triggers interstitial fibrosis and glomerulosclerosis. *Kidney Int*. 2012;82(2):172-183. doi:10.1038/ki.2012.20
  52. Kramann R, Humphreys BD. Kidney pericytes: Roles in regeneration and fibrosis. *Semin Nephrol*. 2014;34(4):374-383. doi:10.1007/s11103-011-9767-z.Plastid
  53. Bábíčková J, Klinkhammer BM, Buhl EM, et al. Regardless of etiology, progressive renal disease causes ultrastructural and functional alterations of peritubular capillaries. *Kidney Int*. 2017;91(1):70-85. doi:10.1016/j.kint.2016.07.038
  54. Basile DP, Donohoe D, Roethe K, Osborn JL. Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillaries and influences long-term function. *Am J Physiol Ren Physiol*. 2001;281(5):F887-99. doi:10.1152/ajprenal.0050.2001
  55. Hörbelt M, Lee S-Y, Mang HE, et al. Acute and chronic microvascular alterations in a mouse model of ischemic acute kidney injury. *Am J Physiol Ren Physiol*. 2007;293(3):F688-95. doi:10.1152/ajprenal.00452.2006.
  56. Tanaka S, Tanaka T, Nangaku M. Hypoxia as a key player in the AKI-to-CKD transition. *AJP Ren Physiol*. 2014;307(11):F1187-F1195. doi:10.1152/ajprenal.00425.2014
  57. Leonard EC, Friedrich JL, Basile DP. VEGF-121 preserves renal microvessel structure and ameliorates secondary renal disease following acute kidney injury. *AJP Ren Physiol*. 2008;295(6):F1648-F1657. doi:10.1152/ajprenal.00099.2008
  58. Nangaku M. Hypoxia and tubulointerstitial injury: A final common pathway to end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17:17-25. doi:10.1159/000079927
  59. Mimura I, Nangaku M. The suffocating kidney: Tubulointerstitial hypoxia in end-stage renal disease. *Nat Rev Nephrol*. 2010;6(11):667-678. doi:10.1038/nrneph.2010.124
  60. Kong T, Eltzschig HK, Karhausen J, Colgan SP, Shelley CS. Leukocyte adhesion during hypoxia is mediated by HIF-1-dependent induction of beta2 integrin gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(28):10440-10445. doi:10.1073/pnas.0401339101
  61. Tanaka S, Tanaka T, Nangaku M. Hypoxia and Dysregulated Angiogenesis in Kidney Disease. *Kidney Dis*. 2015;1(1):80-89. doi:10.1159/000381515

62. Grgic I, Duffield JS, Humphreys BD. The origin of interstitial myofibroblasts in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol.* 2012;27(2):183-193. doi:10.1007/s00467-011-1772-6.The
63. Lin SL, Chang FC, Schrimpf C, et al. Targeting endothelium-pericyte cross talk by inhibiting VEGF receptor signaling attenuates kidney microvascular rarefaction and fibrosis. *Am J Pathol.* 2011;178(2):911-923. doi:10.1016/j.ajpath.2010.10.012
64. Ferenbach DA, Bonventre J V. Mechanisms of maladaptive repair after AKI leading to accelerated kidney ageing and CKD. *Nat Rev Nephrol.* 2015;11(5):264-276. doi:10.1038/nrneph.2015.3
65. Schrimpf C, Xin C, Campanholle G, et al. Pericyte TIMP3 and ADAMTS1 Modulate Vascular Stability after Kidney Injury. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23(5):868-883. doi:10.1681/ASN.2011080851
66. Duffield JS. Review series Cellular and molecular mechanisms in kidney fibrosis. *J Clin Invest.* 2014;124(6):2299-2306. doi:10.1172/JCI72267.a
67. Humphreys BD, Lin S-L, Kobayashi A, et al. Fate Tracing Reveals the Pericyte and Not Epithelial Origin of Myofibroblasts in Kidney Fibrosis. *Am J Pathol.* 2010;176(1):85-97. doi:10.2353/ajpath.2010.090517
68. Meng X-M, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. Inflammatory processes in renal fibrosis. *Nat Rev Nephrol.* 2014;10(9):493-503. doi:10.1038/nrneph.2014.114
69. Cao Q, Harris DCH, Wang Y. Macrophages in Kidney Injury, Inflammation, and Fibrosis. *Physiology.* 2015;30(3):183-194. doi:10.1152/physiol.00046.2014
70. Nijjar JK, Stafford D. Undernutrition and growth in the developing world. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2019;26(1):32-38. doi:10.1097/MED.0000000000000461
71. Kepple A, Kafiero C, Grunberger K, et al. *El Estado de La Seguridad Alimentaria y La Nutrición En El Mundo.* Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura; 2018. <http://www.fao.org/3/a-I7695s.pdf>.
72. Hayashy C, Krasevec J, Kumapley R, et al. Levels and trends in child malnutrition. *UNICEF-WHO-The World Bank.* 2017:1-16. [https://data.unicef.org/wp-content/uploads/2017/06/JME-2017\\_brochure\\_June-25.pdf](https://data.unicef.org/wp-content/uploads/2017/06/JME-2017_brochure_June-25.pdf).
73. Abay A, Alderman H, Areetey R, et al. The 2016 Global Nutrition Report. 2016:1-156.
74. Mundo-Rosas V, Shamah-Levy T, Rivera-Dommarco JA, et al. Epidemiología de la inseguridad alimentaria en México. *Salud Publica Mex.* 2013;55(SUPPL.2):206-213. doi:10.21149/spm.v55s2.5117
75. Mundo-Rosas V, Unar-Munguía M, Hernández-F M, Pérez-Escamilla R, Shamah-Levy T. La seguridad alimentaria en los hogares en pobreza de México: una mirada desde el acceso, la disponibilidad y el consumo. *Salud Publica Mex.* 2019;61(6, nov-dic):866. doi:10.21149/10579
76. Cuevas-Nasu L, Gaona-Pineda EB, Rodríguez-Ramírez S, et al. Desnutrición crónica en población infantil de localidades con menos de 100 000 habitantes en México. *Salud Publica Mex.* 2019;61(6, nov-dic):833. doi:10.21149/10642
77. Mejía-Rodríguez F, Mundo-Rosas V, Rodríguez-Ramírez S, et al. Alta prevalencia de

- anemia en mujeres mexicanas en pobreza, Ensanut 100k. *Salud Publica Mex.* 2019;61(6, nov-dic):841. doi:10.21149/10558
78. Black RE, Allen LH, Bhutta ZA, et al. Maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences. *Lancet.* 2008;371(9608):243-260. doi:10.1016/S0140-6736(07)61690-0
  79. Wood-Bradley RJ, Barrand S, Giot A, Armitage JA. Understanding the role of maternal diet on kidney development; an opportunity to improve cardiovascular and renal health for future generations. *Nutrients.* 2015;7(3):1881-1905. doi:10.3390/nu7031881
  80. Sutton E, Glimore A, Dunger D, et al. Developmental programming:state-of-the-science and future directions. *Obesity.* 2016;24:1018-1026. doi:10.1038/ki.2012.263.Apolipoprotein
  81. Ramírez-Vélez R. Programación Fetal in utero y su impacto en la salud del adulto. *Endocrinol y Nutr.* 2012;59(6):383-393. doi:10.1016/j.endonu.2012.02.002
  82. Penkler M, Hanson M, Biesma R, Müller R. DOHaD in science and society: Emergent opportunities and novel responsibilities. *J Dev Orig Health Dis.* 2019;10(3):268-273. doi:10.1017/S2040174418000892
  83. Zohdi V, Lim K, Pearson JT, Jane Black M. Developmental programming of cardiovascular disease following intrauterine growth restriction: Findings utilising a rat model of maternal protein restriction. *Nutrients.* 2015;7(1):119-152. doi:10.3390/nu7010119
  84. Barker DJP. Developmental origins of adult health and disease. *J Epidemiol Community Heal.* 2004;58:114-115. doi:10.1136/jech.58.2.114
  85. Hanson MA, Gluckman PD. Early developmental conditioning of later health and disease: physiology or pathophysiology? *Physiol Rev.* 2014;94(4):1027-1076. doi:10.1152/physrev.00029.2013
  86. Bianco-Miotto T, Craig JM, Gasser YP, Van Dijk SJ, Ozanne SE. Epigenetics and DOHaD: From basics to birth and beyond. *J Dev Orig Health Dis.* 2017;8(5):513-519. doi:10.1017/S2040174417000733
  87. Luyckx VA, Brenner BM. Birth weight, malnutrition and kidney-associated outcomes - A global concern. *Nat Rev Nephrol.* 2015;11(3):135-149. doi:10.1038/nrneph.2014.251
  88. Reyes RB, Carrocera LAF. Programación metabólica fetal. *Perinatol y Reprod Humana.* 2015;29(3):99-105. doi:10.1016/j.rprh.2015.12.003
  89. Chien-Ning H, Tain Y-L. The good, the bad and the ugly of pregnancy nutrients and developmental programming of adult disease. *Nutrients.* 2019;11(894):1-21.
  90. Painter RC, Roseboom TJ, Bleker OP. Prenatal exposure to the Dutch famine and disease in later life: An overview. *Reprod Toxicol.* 2005;20(3):345-352. doi:10.1016/j.reprotox.2005.04.005
  91. Efeyan A, Comb WC, Sabatini DM. Nutrient-sensing mechanisms and pathways. *Nature.* 2015;517(7534):302-310. doi:10.1038/nature14190



92. Dennery PA. Oxidative stress in development: Nature or nurture? *Free Radic Biol Med.* 2010;49(7):1147-1151. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.07.011
93. Chu DM, Meyer KM, Prince AL, Aagaard KM. Impact of maternal nutrition in pregnancy and lactation on offspring gut microbial composition and function. *Gut Microbes.* 2016;7(6):459-470. doi:10.1080/19490976.2016.1241357
94. Lea AJ, Tung J, Archie EA, Alberts SC. Bridging research in evolution and human health. *Evol Med Public Heal.* 2017;2017(1):162-175. doi:10.1093/emph/eox019
95. Coats LE, Davis GK, Newsome AD, Ojeda NB, Alexander BT. Low Birth Weight, Blood Pressure and Renal Susceptibility. *Curr Hypertens Rep.* 2019;21(8). doi:10.1007/s11906-019-0969-0
96. Blencowe H, Krasevec J, de Onis M, et al. National, regional, and worldwide estimates of low birthweight in 2015, with trends from 2000: a systematic analysis. *Lancet Glob Heal.* 2019;7(7):e849-e860. doi:10.1016/S2214-109X(18)30565-5
97. Knop MR, Geng TT, Gorny AW, et al. Birth weight and risk of type 2 diabetes mellitus, cardiovascular disease, and hypertension in adults: A meta-analysis of 7 646 267 participants from 135 studies. *J Am Heart Assoc.* 2018;7(23). doi:10.1161/JAHA.118.008870
98. Puelles VG, Hoy WE, Hughson MD, Diouf B, Douglas-Denton RN, Bertram JF. Glomerular number and size variability and risk for kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2011;20(1):7-15. doi:10.1097/MNH.0b013e3283410a7d
99. Working G. The Impact of Kidney Development on the Life Course: A Consensus Document for Action. *Nephron.* 2017;136(1):3-49. doi:10.1159/000457967
100. White SL, Perkovic V, Cass A, et al. Is Low Birth Weight an Antecedent of CKD in Later Life? A Systematic Review of Observational Studies. *Am J Kidney Dis.* 2009;54(2):248-261. doi:10.1053/j.ajkd.2008.12.042
101. Manalich R, Reyes L, Herrera M, Melendi C, Fundora I. Relationship between weight at birth and the number and size of renal glomeruli in humans: A histomorphometric study. *Kidney Int.* 2000;58(2):770-773. doi:10.1046/j.1523-1755.2000.00225.x
102. Tain Y-L, Hsu C-N. Developmental Origins of Chronic Kidney Disease: Should We Focus on Early Life? *Int J Mol Sci.* 2017;18(2). doi:10.3390/ijms18020381
103. Brenner BM, Garcia DL, Anderson S. Glomeruli and Blood Pressure. Less of one, more the other? *AJH.* 1988;1(4):335-347.
104. Luyckx VA, Brenner BM. The Clinical Importance of Nephron Mass. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(6):898-910. doi:10.1681/ASN.2009121248
105. Mesquita FF, Gontijo JAR, Boer PA. Maternal undernutrition and the offspring kidney: From fetal to adult life. *Brazilian J Med Biol Res.* 2010;43(11):1010-1018. doi:10.1590/S0100-879X2010007500113
106. Kett MM, Denton KM. Renal programming : cause for concern ? *Am J physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2011:791-803. doi:10.1152/ajpregu.00791.2010.
107. Zeman FJ. Effects of maternal protein restriction on the kidney of the newborn young of rats. *J Nutr.* 1968;94(2):111-116. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4230019>.

108. Woods LL, Ingelfinger JR, Nyengaard JR, Rasch R. Maternal Protein Restriction Suppresses the Newborn Renin-Angiotensin System and Programs Adult Hypertension in Rats. *Pediatr Res*. 2001;49(4):460-467. doi:10.1203/00006450-200104000-00005
109. Boubred F, Daniel L, Buffat C, et al. The magnitude of nephron number reduction mediates intrauterine growth-restriction-induced long term chronic renal disease in the rat. A comparative study in two experimental models. *J Transl Med*. 2016;14(1):331. doi:10.1186/s12967-016-1086-3
110. Welham SJM, Wade A, Woolf AS. Protein restriction in pregnancy is associated with increased apoptosis of mesenchymal cells at the start of rat metanephrogenesis. *Kidney Int*. 2002;61(4):1231-1242. doi:10.1046/j.1523-1755.2002.00264.x
111. Mesquita FF, Gontijo JAR, Boer PA. Expression of renin-angiotensin system signalling compounds in maternal protein-restricted rats: Effect on renal sodium excretion and blood pressure. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25(2):380-388. doi:10.1093/ndt/gfp505
112. Abdel-Hakeem AK, Henry TQ, Magee TR, et al. Mechanisms of impaired nephrogenesis with fetal growth restriction: altered renal transcription and growth factor expression. *Am J Obstet Gynecol*. 2008;199(3). doi:10.1016/j.ajog.2008.05.018
113. Henry TQ, Mansano RZ, Nast CC, et al. GDNF and MAPK–ERK pathway signaling is reduced during nephrogenesis following maternal under-nutrition. *J Dev Orig Health Dis*. 2010;1(1):67-74. doi:10.1017/S2040174409990134
114. Sene L de B, Mesquita FF, de Moraes LN, et al. Involvement of Renal Corpuscle microRNA Expression on Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Maternal Low Protein Diet in Adult Programmed Rats. *PLoS One*. 2013;8(8):e71310. doi:10.1371/journal.pone.0071310
115. Welham SJM, Riley PR, Wade A, Hubank M, Woolf AS. Maternal diet programs embryonic kidney gene expression. *Physiol Genomics*. 2005;22(1):48-56. doi:10.1152/physiolgenomics.00167.2004
116. Magee TR, Tafti SA, Desai M, Liu Q, Ross MG, Nast CC. Maternal undernourished fetal kidneys exhibit differential regulation of nephrogenic genes including downregulation of the notch signaling pathway. *Reprod Sci*. 2011;18(6):563-576. doi:10.1177/19337191110393025
117. Alwasel SH, Kaleem I, Sahajpal V, Ashton N. Maternal Protein Restriction Reduces Angiotensin II AT1 and AT2 Receptor Expression in the Fetal Rat Kidney. *Kidney Blood Press Res*. 2010;33(4):251-259. doi:10.1159/000317739
118. Maria Pereira Pires K, Barbosa Aguila M, Alberto Mandarim-de-Lacerda C. Early renal structure alteration in rat offspring from dams fed low protein diet. *Life Sci*. 2006;79(22):2128-2134. doi:10.1016/j.lfs.2006.07.006
119. Villar-Martini VC, Carvalho JJ, Neves MF, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda C a. Hypertension and kidney alterations in rat offspring from low protein pregnancies. *J Hypertens Suppl*. 2009;27(6):S47-S51. doi:10.1097/01.hjh.0000358838.71675.5e
120. Zambrano E, Rodríguez-González GL, Guzmán C, et al. A maternal low protein diet

- during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. *J Physiol.* 2005;563(1):275-284. doi:10.1113/jphysiol.2004.078543
121. Zambrano E, Martínez-Samayoá PM, Bautista CJ, et al. Sex differences in transgenerational alterations of growth and metabolism in progeny (F<sub>2</sub>) of female offspring (F<sub>1</sub>) of rats fed a low protein diet during pregnancy and lactation. *J Physiol.* 2005;566(1):225-236. doi:10.1113/jphysiol.2005.086462
  122. Cheung CK, Mak YT, Swaminathan R. Automated trichloroacetic acid precipitation method for urine total protein. *Ann Clin Biochem.* 1987;24 ( Pt 2):140-144.
  123. Sanchez-Pozos K, Barrera-Chimal J, Garzon-Muvdi J, et al. Recovery from ischemic acute kidney injury by spironolactone administration. *Nephrol Dial Transplant.* 2012;27(8):3160-3169. doi:10.1093/ndt/gfs014
  124. Morales-Buenrostro LE, Salas-Nolasco OI, Barrera-Chimal J, et al. Hsp72 Is a Novel Biomarker to Predict Acute Kidney Injury in Critically Ill Patients. *PLoS One.* 2014;9(10):e109407. doi:10.1371/journal.pone.0109407
  125. Grob M-L, Amann K, Ritz E. Nephron Number and Renal Risk in Hypertension and Diabetes. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(3\_suppl\_1):S27-S29. doi:10.1681/ASN.2004110967
  126. Boubred F, Buffat C, Feuerstein J-M, et al. Effects of early postnatal hypernutrition on nephron number and long-term renal function and structure in rats. *AJP Ren Physiol.* 2007;293(6):F1944-F1949. doi:10.1152/ajprenal.00141.2007
  127. Hoy WE. Nephron Number, Hypertension, Renal Disease, and Renal Failure. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(9):2557-2564. doi:10.1681/ASN.2005020172
  128. Keller G, Gisela Z, Mall G, Ritz E, Amann K. Nephron number in patients with primary hypertension. *N Engl J Med.* 2003;Vol.348(2):101-108. doi:10.1056/NEJMoa1611594
  129. Cherñawsky D, Sequeira ML, Gómez A. Bases moleculares del desarrollo renal. *Arch Lat Nefr Ped.* 2002;2(1):13-29.
  130. Wlodek ME, Westcott K, Siebel AL, Owens JA, Moritz KM. Growth restriction before or after birth reduces nephron number and increases blood pressure in male rats. *Kidney Int.* 2008;74(2):187-195. doi:10.1038/ki.2008.153
  131. Barnett C, Nnoli O, Abdulmahdi W, et al. Low birth weight is associated with impaired murine kidney development and function. *Pediatr Res.* 2017;82(2):340-348. doi:10.1038/pr.2017.53
  132. Hughson MD, Puelles VG, Hoy WE, Douglas-Denton RN, Mott SA, Bertram JF. Hypertension, glomerular hypertrophy and nephrosclerosis: The effect of race. *Nephrol Dial Transplant.* 2014;29(7):1399-1409. doi:10.1093/ndt/gft480
  133. Kanzaki G, Tsuboi N, Haruhara K, et al. Factors associated with a vicious cycle involving a low nephron number, hypertension and chronic kidney disease. *Hypertens Res.* 2015;38(10):633-641. doi:10.1038/hr.2015.67
  134. Luyckx VA, Brenner BM. Low birth weight, nephron number, and kidney disease. *Kidney Int Suppl.* 2005;68(97):68-77. doi:10.1111/j.1523-1755.2005.09712.x

135. Burke M, Pabbidi MR, Farley J, Roman RJ. Molecular Mechanisms of Renal Blood Flow Autoregulation. *Curr Vasc Pharmacol.* 2013;845-858. doi:10.2174/15701611113116660149
136. Hales C.N., Barker DJP. The thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia.* 2001;60:5-20. doi:10.1007/s00125-012-2589-y
137. Prentice AM. Nutrition and chronic disease: Lessons from the developing and developed world. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser.* 2014;78:155-160. doi:10.1159/000354957
138. Prentice AM, Rayco-Solon P, Moore SE. Insights from the developing world: thrifty genotypes and thrifty phenotypes. *Proc Nutr Soc.* 2005;64(02):153-161. doi:10.1079/PNS2005421
139. Bateson P, Gluckman P, Hanson M. The biology of developmental plasticity and the Predictive Adaptive Response hypothesis. *J Physiol.* 2014;592(11):2357-2368. doi:10.1113/jphysiol.2014.271460
140. Qasem RJ, Yablonski E, Li J, Tang HM, Pontiggia L, D'mello AP. Elucidation of thrifty features in adult rats exposed to protein restriction during gestation and lactation. *Physiol Behav.* 2012;105(5):1182-1193. doi:10.1016/j.physbeh.2011.12.010
141. Fagundes ATS, Moura EG, Passos MCF, et al. Maternal low-protein diet during lactation programmes body composition and glucose homeostasis in the adult rat offspring. *Br J Nutr.* 2007;98(05):922-928. doi:10.1017/S0007114507750924
142. Godfrey KM, Forrester T, Barker DJP, et al. Maternal nutritional status in pregnancy and blood pressure in childhood. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol.* 1994;101(5):398-403. doi:10.1111/j.1471-0528.1994.tb11911.x
143. Aburn G, Gott M, Hoare K. What is resilience? An Integrative Review of the empirical literature. *J Adv Nurs.* 2016;72(5):980-1000. doi:10.1111/jan.12888
144. Bowes L, Jaffee SR. Biology, Genes, and Resilience: Toward a Multidisciplinary Approach. *Trauma, Violence, Abus.* 2013;14(3):195-208. doi:10.1177/1524838013487807
145. Jingsong Ou, Ou Z, Ackerman AW, Oldham KT, Pritchar K. Inhibition of heat shock protein 90 (HSP90) in proliferating endothelial cells uncouples endothelial nitric oxide synthase activity. 2003;34(2):269-276.
146. Andringa KK, Agarwal A. Role of hypoxia-inducible factors in acute kidney injury. *Nephron - Clin Pract.* 2014;127(1-4):70-74. doi:10.1159/000363669
147. Shu S, Wang Y, Zheng M, et al. Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factors in Kidney Injury and Repair. *Cells.* 2019;8(3):207. doi:10.3390/cells8030207
148. Nangaku M, Rosenberger C, Heyman SN, Eckardt KU. Regulation of hypoxia-inducible factor in kidney disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2013;40(2):148-157. doi:10.1111/1440-1681.12005
149. Semenza G. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol.* 2000;88:1474-1480. doi:10.1016/j.envpol.2004.10.021
150. Sethi K, Rao K, Bolton D, Patel O, Ischia J. Targeting HIF-1  $\alpha$  to Prevent Renal

- Ischemia-Reperfusion Injury: Does It Work? *Int J Cell Biol.* 2018;2018. doi:10.1155/2018/9852791
151. Kapitsinou PP, Jaffe J, Michael M, et al. Preischemic targeting of HIF prolyl hydroxylation inhibits fibrosis associated with acute kidney injury. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 2012;302(9). doi:10.1152/ajprenal.00667.2011
  152. Wang Z, Schley G, Türkoglu G, et al. The protective effect of prolyl-hydroxylase inhibition against renal ischaemia requires application prior to ischaemia but is superior to EPO treatment. *Nephrol Dial Transplant.* 2012;27(3):929-936. doi:10.1093/ndt/gfr379
  153. Wu MJ, Wen MC, Chiu YT, Chiou YY, Shu KH, Tang MJ. Rapamycin attenuates unilateral ureteral obstruction-induced renal fibrosis. *Kidney Int.* 2006;69(11):2029-2036. doi:10.1038/sj.ki.5000161
  154. Yang Y, Yu X, Zhang Y, et al. *Hypoxia-Inducible Factor Prolyl Hydroxylase Inhibitor Roxadustat (FG-4592) Protects against Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury.* Vol 132.; 2018. doi:10.1042/CS20171625
  155. Conde E, Alegre L, Blanco-Sánchez I, et al. Hypoxia inducible factor 1-alpha (hif-1 alpha) is induced during reperfusion after renal ischemia and is critical for proximal tubule cell survival. *PLoS One.* 2012;7(3). doi:10.1371/journal.pone.0033258
  156. Hill P, Shukla D, Tran MGB, et al. Inhibition of hypoxia inducible factor hydroxylases protects against renal ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19(1):39-46. doi:10.1681/ASN.2006090998
  157. Li L, Kang H, Zhang Q, D'Agati VD, Al-Awqati Q, Lin F. FoxO3 activation in hypoxic tubules prevents chronic kidney disease. *J Clin Invest.* 2019;129(6):2374-2389. doi:10.1172/JCI122256
  158. Ishani A, Nelson D, Clothier B, et al. The magnitude of acute serum creatinine increase after cardiac surgery and the risk of chronic kidney disease, progression of kidney disease, and death (Archives of Internal Medicine (2011) 171, 3 (226-233)). *Arch Intern Med.* 2011;171(3):226-233. doi:10.1001/archinternmed.2011.527

## 10.0 ANEXOS.

### 10.1 Artículos publicados.

- García-Ortuño LE, Bobadilla NA. Integrative view of the mechanisms that induce acute kidney injury and its transition to chronic kidney disease. *Rev Invest Clin.* 2018; 70:261-68.
- García-Ortuño LE, Barrera-Chimal J, Pérez-Vilalva R, Ortega -Trejo JA, Luna-Bolaños E, Lima-Posada I, Sánchez-Navarro A, Reyes-Castro L, Gamba G, Zambrano E, Bobadilla NA. Resilience to acute kidney injury in male offspring of maternal protein restriction” *Am J Physiol Renal Physiol.* 2019. 1637-1648.

# INTEGRATIVE VIEW OF THE MECHANISMS THAT INDUCE ACUTE KIDNEY INJURY AND ITS TRANSITION TO CHRONIC KIDNEY DISEASE

LUIS ENRIQUE GARCÍA-ORTUÑO<sup>1,2</sup> AND NORMA ARACELI BOBADILLA<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Molecular Physiology Unit, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, and Department of Nephrology and Mineral Metabolism, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán; <sup>2</sup>Department of Pathology, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. Mexico City, Mexico

## ABSTRACT

There is ample evidence showing that acute kidney injury (AKI) increases the risk of developing chronic kidney disease (CKD). Although considerable efforts have been undertaken in recent years to elucidate the mechanisms responsible for the AKI to CKD transition, many questions remain to be answered. In this review, we address most of the latest studies elucidating the mechanisms involved in this transition. Based on recent studies, the consensus to date is that endothelial and proximal tubular epithelium injury along with the activation of inflammatory processes occurring after an AKI episode, not only establish a close interrelation but also trigger a series of signaling pathways that culminate in the generation of tubulointerstitial fibrosis and chronic hypoxia, which lead to the progressive deterioration of functional tissue. These events highlight that the tubular epithelium does not appear to be the same after cell damage occurs. In this review, we present the advances aimed at elucidating the mechanisms that lead to a maladaptive response and how sex hormones seem to be involved in a positive or negative adaptive response. Elucidating and characterizing the mechanisms responsible for the AKI to CKD transition are an indispensable preliminary step that will help to identify the most important actors in this process. (REV INVEST CLIN. 2018;70:261-8)

**Key words:** Renal fibrosis. Hypoxia. Inflammation. Oxidative stress. Maladaptive repair. Tubular cells.

### Corresponding author:

\*Norma Araceli Bobadilla  
Unidad de Fisiología Molecular  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas  
y Nutrición Salvador Zubirán  
Vasco de Quiroga, 15  
Col. Belisario Domínguez, Del. Tlalpan  
C.P.14080, México City, México  
E-mail: nab@biomedicas.unam.mx

Received for publication: 26-03-2018  
Approved for publication: 03-07-2018  
doi: 10.24875/RIC.18002546

## ACUTE KIDNEY INJURY (AKI)

AKI is generally defined as a clinical syndrome caused by an abrupt reduction in renal blood flow that culminates in the decrease of urine production and the accumulation of toxic compounds. These alterations are observed within several hours or days once the event has occurred<sup>1-3</sup>. AKI is a serious public health problem with high morbidity and mortality, associated with an increased long-term risk of developing chronic kidney disease (CKD)<sup>4</sup>. Moreover, this condition generates an additional cost to health systems and longer hospital stays<sup>5,6</sup>. Unfortunately, the interventions to prevent AKI or to improve prognosis have not been efficient enough. Another difficult issue that clinicians around the world face is the definition and classification of AKI, limiting its precise diagnosis. The current classification is included in the Clinical Practice Guidelines for Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO), which maintained the definition and staging of AKI based on the previous criteria of risk, injury, failure, loss, end-stage renal disease (ESRD), and AKI network. This new classification considers the elevation of creatinine  $\geq 0.3$  mg/dL in 48 h, or a greater increase of  $\geq 1.5$  times of the basal values in the past 7 days, or decrease in the urinary output to  $< 0.5$  mL/kg/h during 6 h, categorizing the episodes in three stages in relation to the severity of the renal damage (KDIGO 1, 2, or 3)<sup>3</sup>.

Despite these barriers to diagnosis, it has been estimated that AKI occurs in 13.3 million people each year worldwide, 85% of whom live in countries with medium or low income, and the disease contributes to approximately 1.7 million deaths yearly. In a recently published meta-analysis that included 700 million hospitalized patients, 21% were found to have suffered from an AKI episode<sup>5-7</sup>. It is important to consider that AKI incidence is substantially higher in critically ill patients on the intensive care unit, i.e., 30-70%. In a study that included 49 million patients, it was observed that AKI occurred in one of five adults and one of every three hospitalized children<sup>5,8</sup>. Similarly, AKI etiology may vary depending on geographic region and socioeconomic conditions<sup>5,9</sup>, but the most frequent causes of AKI are associated with generalized or localized ischemic damage due to surgeries, sepsis, trauma, infections, dehydration, and toxic drug damage<sup>4</sup>. In particular, several widely used agents,

such as radiocontrast media or nonsteroidal anti-inflammatory drugs, can cause direct renal tissue damage, ischemic injury, or both.

## Vascular endothelium in the AKI

The kidney has one of the most abundant populations of endothelial cells compared with other organs<sup>10,11</sup>. The energy demand in this organ is high, and the partial pressure of oxygen is relatively low with fluctuating values between 40 and 60 mmHg in the cortex and 10 and 20 mmHg in the renal medulla<sup>12</sup>. Therefore, the vascular architecture is highly susceptible to blood perfusion and oxygenation<sup>4,13</sup>. Endothelial cells physiologically contribute to the maintenance of vascular tone, regulation of blood flow, and vascular permeability<sup>14</sup>. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is required for the maintenance of the peritubular capillaries' homeostasis. VEGF is expressed in podocytes, proximal tubule, and thick ascending loop, while the VEGF receptors 1 and 2 are located in endothelial cells, and peritubular and glomerular capillaries<sup>15,16</sup>. AKI is accompanied by endothelium cell damage, which is characterized by the alteration of the actin cytoskeleton, causing the detachment of endothelial monolayer cells and affecting the tight intercellular junctions which, in turn, increase vascular permeability and the production of edema. Microvascular damage induces endothelial activation together with the expression of cell surface markers, such as intercellular adhesion molecules, which promote adhesion and recruitment of leukocytes and platelets<sup>4</sup>. The arterioles, particularly in the post-ischemic area, undergo intense vasoconstriction in response to an increase in tissue concentrations of endothelin, angiotensin II, thromboxane A<sub>2</sub>, prostaglandin H<sub>2</sub>, leukotrienes C<sub>4</sub> and D<sub>4</sub>, and adenosine (Fig. 1). In addition, vasodilatation is limited in response to decreased acetylcholine, bradykinin, nitric oxide, and other vasodilator molecules<sup>17</sup>. The imbalance in the vasoactive release contributes to the decrease in renal blood flow and the maintenance of renal hypoperfusion after several hours.

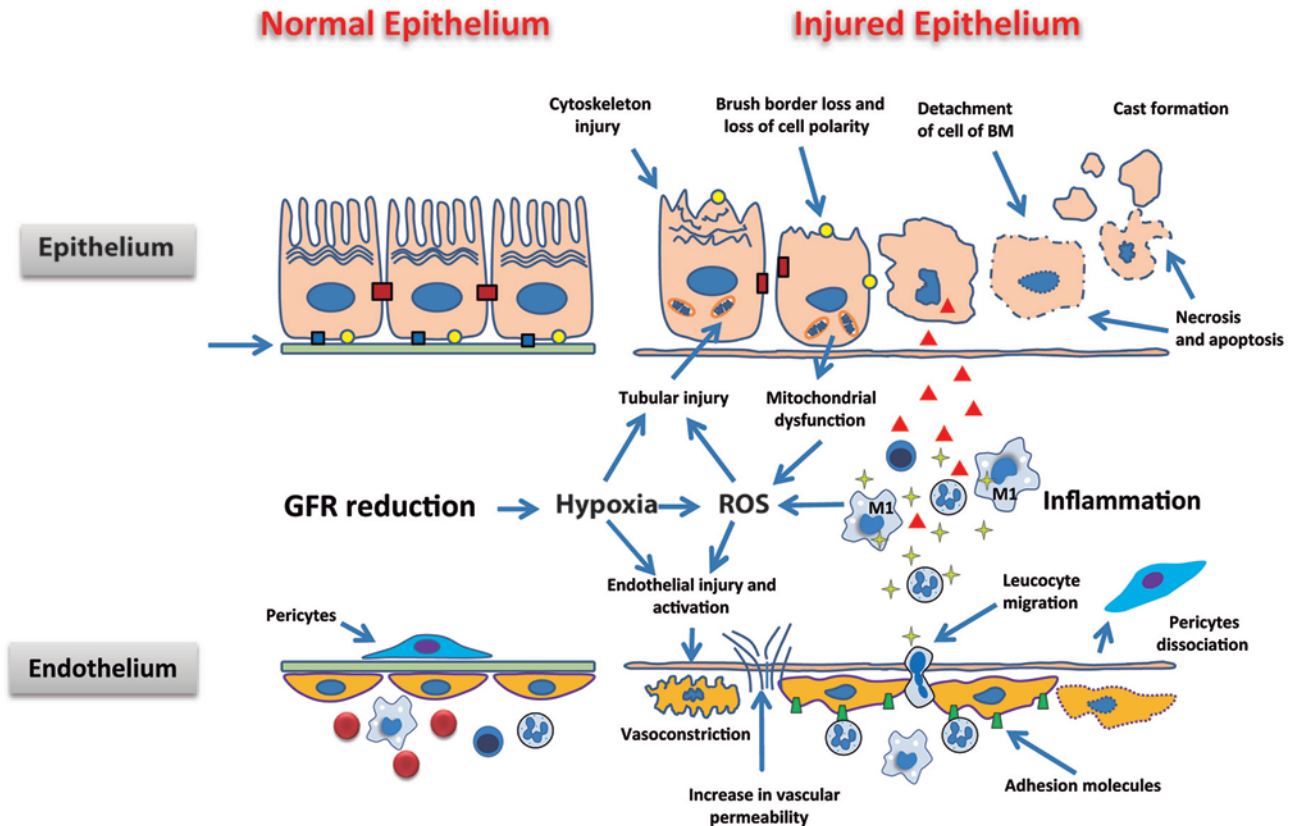
## Tubular epithelium in AKI

Once the hypoxic state occurs, tubular epithelial cells are unable to maintain adequate levels of adenosine triphosphate (ATP); therefore, they suffer damage and death, primarily by necrosis and apoptosis<sup>17-19</sup>.



Figure 1. Integration of the mechanisms involved in acute kidney injury.

- ▲ Pro-inflammatory factors produced by the epithelium: tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-1, IL-6, CXCL8, MCP-1, CCL5, and ENA 78.
- ✦ Pro-inflammatory factors produced by inflammatory cells: TNF- $\alpha$ , IL-1, CXCL8, MCP-1, and eicosanoids.
- ▲ Endothelial adhesion molecules: intercellular adhesion molecules, P and E selectins.
- Tight junctions.
- Adhesion molecules ( $\beta$ -integrin).
- Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. M1: type 1 macrophages.



The proximal tubular epithelium is particularly more sensitive to hypoxic states than the rest of the tubular segments because it has a higher energy metabolic demand and a limited capacity for anaerobic glycolysis. It is well-known that the cytoskeleton has an integral role in cell function and structure through maintaining polarity, endocytosis, signal transduction, motility, organelle movement, exocytosis, cell division, and cell-matrix adhesion. Therefore, the damage to the tubular cytoskeleton has diverse effects on cellular function<sup>14</sup>. The ATP reduction also leads to the loss of the brush border of the proximal tubule, change in cell polarity, and alteration in the location of adhesion molecules and membrane proteins such as the Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPase pump and  $\beta$ -integrins. The

relocation of the  $\beta$ -integrins and the lack of adhesion of the epithelial cells results in the exfoliation of these cells into the tubular lumen. The cellular debris combined with the Tamm-Horsfall protein and fibronectin promotes the distinctive cast formation in this disease, which may obstruct the tubules and later increase the intratubular pressure (Fig. 1)<sup>17</sup>.

### Inflammatory process in AKI

During AKI, an inflammatory cascade is initiated, where chemokines are the main mediators of inflammation, promoting the expression of adhesion molecules, and the activation and infiltration of leukocytes<sup>20</sup>. This inflammatory response involves cells of

the immune system such as neutrophils, monocytes/macrophages, dendritic cells, and natural killer lymphocytes<sup>21,22</sup>. Initially, the inflammatory process is characterized by the marginalization of the leukocytes to the activated vascular endothelium. Subsequently, there is a transmigration of the leukocytes to the inflammatory site<sup>14</sup>. Neutrophils and monocytes regulate the inflammatory process in the acute phase within the first 24 h<sup>4</sup>. The renal tubular epithelium also contributes to the exacerbation of the inflammatory process, since it synthesizes proinflammatory and chemoattractant molecules (Fig. 1). Several studies have shown that the prevention of the inflammatory process through the inhibition of neutrophils and monocytes/macrophages or by blocking endothelial cell-leukocyte interactions has a renoprotective effect<sup>23,24</sup>. T-lymphocytes are also involved in the development and maintenance of AKI. Accordingly, nude mice that are deficient in T-cells are protected from ischemia/reperfusion injury. Further studies, however, are warranted to elucidate in greater detail the participation and interaction of inflammatory cells with the resident neighboring immune cells<sup>22</sup>.

### Oxidative stress in AKI

Oxidative stress is also involved in the pathophysiology of both AKI and CKD<sup>25-27</sup>, since it can affect renal hemodynamics by reducing the vasodilatory capacity of nitric oxide or by injuring the endothelial cells. Likewise, oxidative stress can also induce tubular epithelial damage by promoting cell death by apoptosis or necrosis<sup>26</sup>. The superoxide anion is the primary reactive oxygen species (ROS) that participates in injuring the kidney. There are also antioxidants that serve to protect the cellular integrity induced by ROS<sup>25,26</sup>. It is widely known that during renal injury, the intracellular antioxidants are reduced contributing to exacerbate the renal injury<sup>25</sup>. Particularly, the proximal tubular cells have abundant mitochondria; therefore, these cells are highly vulnerable to damage by the oxidative stress generated by hypoxia<sup>28</sup>. This organelle normally produces small amounts of ROS<sup>29</sup>. Under pathological conditions, the decoupling of oxidative phosphorylation and the loss to the integrity of the mitochondrial membrane induce an excessive amount of ROS coming from the respiratory chain, particularly complex I and III (Fig. 1). Mitochondrial dysregulation is also characterized by a decrease in cellular

respiration and by a lower production of ATP as well as by the release of proapoptotic factors<sup>25</sup>. Another frequent source of ROS in AKI corresponds to the infiltration of inflammatory cells, primarily neutrophils, and macrophages that, in addition to releasing a large number of pro-inflammatory cytokines, suffer the so-called respiratory burst, generating free radicals (Fig. 1)<sup>26,27,30</sup>.

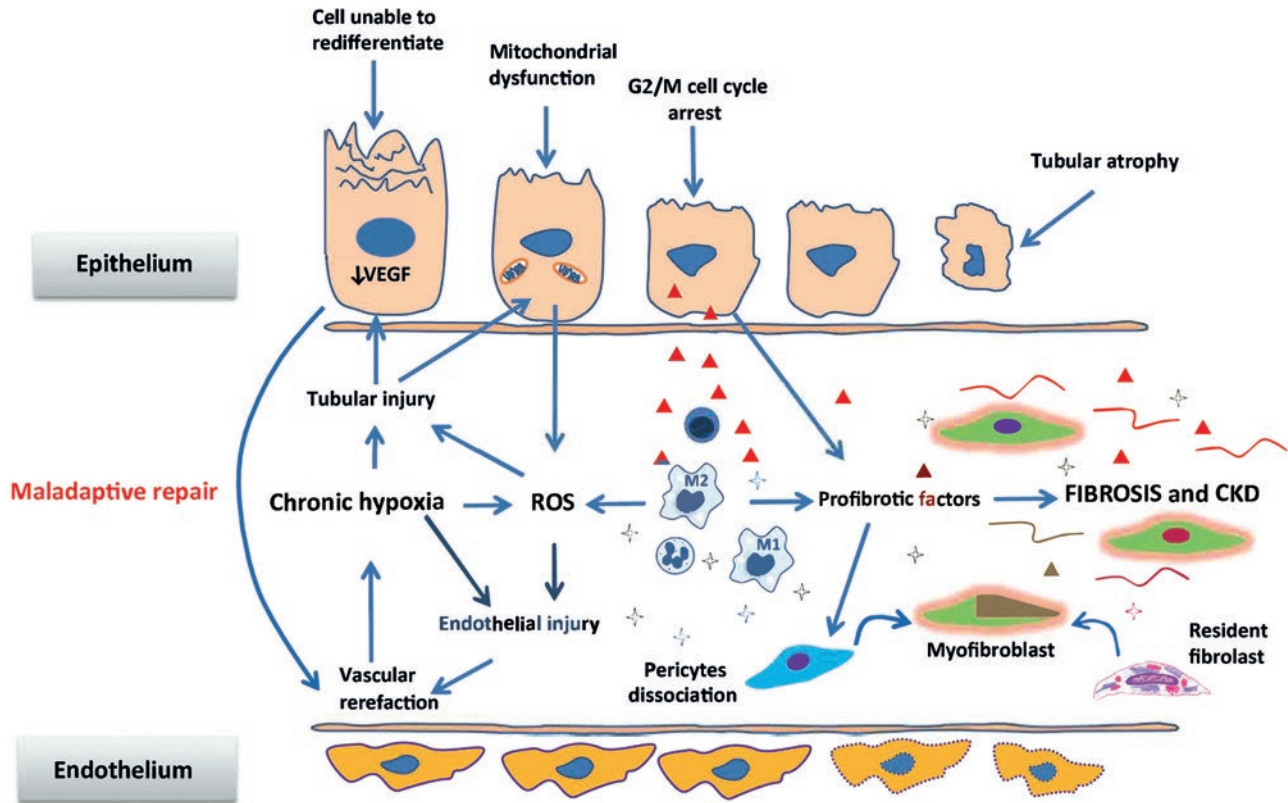
### MECHANISMS INVOLVED IN THE TRANSITION OF AKI TO CKD

Several years ago, it was thought that patients who survived an episode of AKI and who had a recovery of renal function would not have long-term consequences<sup>31</sup>. However, in recent years, this concept has changed based on several experimental and epidemiological studies demonstrating that AKI is a risk factor, leading to progressive kidney disease<sup>7,32-44</sup>. In a recent meta-analysis that included 13 previously reported studies in patients who survived an AKI episode, the incidence of CKD and ESRD was 25.8% and 8.6%, respectively<sup>34,35</sup>. In addition, it has been reported that patients with greater AKI severity have a higher risk of a more rapid progression to CKD<sup>36-38</sup>. In older adults, the risk of ESRD after an AKI episode increases from 2 to 13 times<sup>45</sup>. However, in another study carried out in 126 children who presented with AKI without any other condition, 10% developed CKD in a period between 1 and 3 years<sup>46</sup>.

The AKI to CKD transition has attracted the attention of several researchers, including those in our group, who have attempted to elucidate the mechanisms responsible for this transition. After an AKI episode, a complete repair of the function and renal structure, known as an adaptive response, would be expected; however, in most cases, this repair does not occur, since the repair seems to be incomplete or defective, known as a maladaptive response<sup>4,47-49</sup>. The working group of the 13<sup>th</sup> conference of the acute dialysis quality initiative has defined adaptive repair as the resolution of renal structure and function without long-term sequelae in a period of 90 days. Conversely, maladaptive repair was defined as a process that results from structural damage, such as renal fibrosis, and with consequent progressive reduction of renal function<sup>49</sup>.

Figure 2. Integration of the mechanisms involved in the acute kidney injury to chronic kidney disease transition.

- ▲ Profibrotic factors produced by the epithelium: transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1 and connective tissue growth factor.
- + Profibrotic factors produced by inflammatory cells: TGF- $\beta$ , platelet-derived growth factor-B, and fibroblast growth factor-2.
- ~ Extracellular matrix: fibronectin and collagen. M2: type 2 macrophages.



Several studies have shown that one hallmark of maladaptive repair is the persistence of the inflammatory process, proliferation of fibroblasts, and excessive deposition of extracellular matrix<sup>43,44,50-56</sup>. Therefore, the understanding of the mechanisms involved in the AKI to CKD transition will undoubtedly have an impact on the subsequent management of patients who suffered AKI.

### Tubular epithelium in the transition of AKI to CKD

The renal tubular epithelium plays a central role in the fibrotic response that leads to progressive CKD<sup>49,57-59</sup>. The mechanism by which tubular cells promote renal fibrosis is complex; however, it has been described as a maladaptive repair because the epithelial cells lose the ability to redifferentiate and recover their normal structure; therefore, there is a pathological arrest in

the G2/M phase of the cell cycle (Fig. 2)<sup>54</sup>. These abnormal epithelial cells have an intense signaling activity and express cytokines and profibrotic peptides that promote interstitial infiltration with inflammatory cells and the proliferation of fibroblasts<sup>54,57,60</sup>. The arrested cells in G2/M synthesize profibrotic factors: transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1 and connective tissue growth factor (CTGF)<sup>49,54</sup>. The specific and isolated lesion of the proximal tubule is sufficient to induce the activation of the inflammatory response, vascular rarefaction, and renal fibrosis<sup>60,61</sup>.

### Vasculature in the AKI to CKD transition

Basile et al.<sup>62</sup>, Babickova et al.<sup>63</sup>, and Hörbelt et al.<sup>64</sup> have shown that capillary density is reduced up to 45%, 4 weeks after inducing AKI in murine models. This finding indicates that unlike the tubular

epithelium, the vascular epithelium has less regeneration potential<sup>10</sup>. The absence of vascular repair is due to the reduction in the expression of VEGF<sup>12,60,63</sup>. In fact, it has been shown that administration of VEGF after ischemia preserves capillary density in the rat<sup>65</sup>. Vascular rarefaction may be a key element in the development of fibrosis, since it maintains renal tissue in a chronic hypoxic state, which initiates the activation of hypoxia-induced signaling pathways. Accordingly, the reduction of renal capillary density correlates with the severity of fibrosis<sup>62</sup>.

Chronic renal hypoxia has been considered a therapeutic target for the AKI to CKD transition<sup>12,66</sup>. Hypoxia also has other deleterious effects, since it is the cause of apoptosis in renal epithelial cells and may activate local fibroblasts that contribute to fibrogenesis<sup>62</sup>. Renal fibrosis aggravates hypoxia, further reducing the efficiency of oxygen diffusion by increasing the distance between capillaries and tubules<sup>59</sup>. In addition, *in vitro* studies have linked hypoxia to the inflammatory process because it induces leukocyte adhesion to the endothelium through the activation of  $\beta 2$  integrin<sup>67</sup>. It is not entirely clear how vascular rarefaction and chronic hypoxia persist because hypoxia-inducible factor (HIF) must be activated and initiates the induction of multiple angiogenic factors to stimulate a vascular compensatory response; however, this mechanism is not well activated and almost always is not sufficient to avoid vascular rarefaction<sup>15</sup>.

### Origin of cells that induce fibrosis (myofibroblasts)

The origin of myofibroblasts is under debate and has stimulated intense research in this field<sup>13,49,53,60,62,68</sup>. Several studies have reported that pericytes are the primary cells that contribute to the accumulation of myofibroblasts through the transdifferentiation of pericyte-myofibroblast<sup>69-72</sup>. Pericytes are specialized cells that are attached to endothelial cells and maintain vascular stability and integrity. The loss of pericytes of the vascular endothelium together with its participation in renal fibrosis causes instability in the capillaries, thereby contributing to vascular rarefaction<sup>13</sup>. It has also been reported that this process is accompanied by the upregulation of platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)- $\beta$  and PDGFR- $\alpha$ , while pharmacological blockade of these receptors prevents the dissociation of pericytes<sup>69</sup>. The vascular stability

is also reduced after renal damage by alterations in the regulation of the tissue inhibitor of metalloproteinases 3 and disintegrin, and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1, which are genes that regulate proteolysis and angiogenesis in the pericyte<sup>73,74</sup>. Other cells that could be involved in the origin of myofibroblasts are resident fibroblasts, cells derived from the bone marrow, endothelial cells, and erythropoietin-producing cells<sup>75</sup>. It has been suggested that myofibroblasts may also have their origin derived from the damaged tubular epithelium, due to the process of epithelial-mesenchymal transdifferentiation; however, several studies question this statement<sup>70,75</sup>.

### Inflammatory process in the AKI to CKD transition

Macrophages, in particular, play a central role in both the injured cells and in the repair of the affected tissue<sup>4</sup>. The sustained infiltration of macrophages can induce fibrosis and progression to CKD by generating profibrotic cytokines including TGF- $\beta$ , PDGF-B, and fibroblast growth factor 2, which promote proliferation and survival of myofibroblasts. After AKI, the presence of two subtypes of macrophages that may differentiate under the influence of the local microenvironment has been demonstrated<sup>22,76</sup>. Type 1 (M1) macrophages (induced by interferon and lipopolysaccharides) migrate immediately after renal injury and are responsible for the production of pro-inflammatory molecules, while macrophages Type 2 (M2) (stimulated by interleukin [IL]-4 and IL-13) arise in the recovery phase of AKI and synthesize factors that help in the proliferation of tubular cells and the repair of renal damage<sup>76</sup>.

### Sexual dimorphism in the AKI to CKD transition

A rarely investigated aspect in the pathophysiological course, clinical presentation, and prognosis of kidney disease is the marked differences that exist between men and women. Several studies in different renal pathologies have shown that men are more susceptible than women<sup>77</sup>; however, the mechanisms have not been fully elucidated. Our laboratory has been interested in this phenomenon, particularly in what occurs in the AKI to CKD transition, considering that by deepening the mechanisms of renoprotection in females or susceptibility in males, new therapeutic

targets might be identified. Female and male rats underwent a period of bilateral renal ischemia for 45 min and were evaluated after 24 h, 1, 2, 3, and 4 months after ischemia. In addition, oophorectomized rats were also used. As we previously reported<sup>43,55,78</sup>, male rats experienced the AKI to CKD transition 4 months after renal ischemia, unlike female rats that did not have this transition. The mechanisms of renoprotection in female rats were associated to an increase in antioxidant enzymes and, therefore, less oxidative damage. Moreover, it was observed that the female rats had a significant increase in mRNA levels of eNOS, TGF- $\beta$ , and HIF-1 $\alpha$ . A particularly interesting finding was the fact that female oophorectomized rats behaved similarly to male rats; in other words, this group developed CKD<sup>44</sup>. These results strongly suggest the participation of sex hormones in the transition from AKI to CKD.

In summary, the growing evidence in the close relationship and dependence between AKI and CKD has stimulated the interest of several research groups that have made important contributions to the body of knowledge regarding the mechanisms that bridge these two pathologies. However, given the great complexity, the different cell types and the diversity of factors involved, there are still many questions to answer.

## ACKNOWLEDGMENTS

Studies in the authors' laboratory cited in the review were supported by grants from the Mexican Council of Science and Technology (CONACyT) (235855, 235964, and 272390 to NAB) and from the National University of Mexico (IN223915 to NAB). This review was performed in partial fulfillment of the requirements for the PhD degree of Luis Enrique García-Ortuño, who is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received a fellowship from Dirección General de Asuntos del Personal Académico UNAM.




## REFERENCES

1. Takaori K, Yanagita M. Insights into the mechanisms of the acute kidney injury-to-chronic kidney disease continuum. *Nephron*. 2016;134:172-6.
2. Bellomo R, Kellum JA, Ronco C. Acute kidney injury. *Lancet*. 2012;380:756-66.
3. Kellum JA, Lameire N, Group KA. Diagnosis, evaluation, and management of acute kidney injury: a KDIGO summary (Part 1). *Crit Care*. 4;17:204.
4. Zuk A, Bonventre JV. Acute kidney injury. *Annu Rev Med*. 2016;67:293-307.
5. Lameire NH, Bagga A, Cruz D, et al. Acute kidney injury: an increasing global concern. *Lancet*. 2013;382:170-9.
6. Rewa O, Bagshaw SM. Acute kidney injury-epidemiology, outcomes and economics. *Nat Rev Nephrol*. 2014;10:193-207.
7. Lewington AJ, Cerdá J, Mehta RL. Raising awareness of acute kidney injury: a global perspective of a silent killer. *Kidney Int*. 2013;84:457-67.
8. Susantitaphong P, Cruz DN, Cerdá J, et al. World incidence of AKI: a meta-analysis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2013;8:1482-93.
9. Feehally J. The ISN Oby25 global snapshot study. *Ann Nutr Metab*. 2016;68 Suppl 2:29-31.
10. Maringer K, Sims-Lucas S. The multifaceted role of the renal microvasculature during acute kidney injury. *Pediatr Nephrol*. 2016;31:1231-40.
11. Verma SK, Molitoris BA. Renal endothelial injury and microvascular dysfunction in acute kidney injury. *Semin Nephrol*. 2015;35:96-107.
12. Tanaka S, Tanaka T, Nangaku M. Hypoxia as a key player in the AKI-to-CKD transition. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2014;307:F1187-95.
13. Ferenbach DA, Bonventre JV. Mechanisms of maladaptive repair after AKI leading to accelerated kidney ageing and CKD. *Nat Rev Nephrol*. 2015;11:264-76.
14. Sharfuddin AA, Molitoris BA. Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol*. 2011;7:189-200.
15. Tanaka S, Tanaka T, Nangaku M. Hypoxia and dysregulated angiogenesis in kidney disease. *Kidney Dis (Basel)*. 2015;1:80-9.
16. Dimke H, Sparks MA, Thomson BR, Frische S, Coffman TM, Quaggin SE. Tubulovascular cross-talk by vascular endothelial growth factor maintains peritubular microvasculature in kidney. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26:1027-38.
17. Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest*. 2011;121:4210-21.
18. Bonventre JV. Pathophysiology of AKI: injury and normal and abnormal repair. *Contrib Nephrol*. 2010;165:9-17.
19. Sancho-Martínez SM, López-Novoa JM, López-Hernández FJ. Pathophysiological role of different tubular epithelial cell death modes in acute kidney injury. *Clin Kidney J*. 2015;8:548-59.
20. Malek M, Nematbakhsh M. Renal ischemia/reperfusion injury; from pathophysiology to treatment. *J Renal Inj Prev*. 2015;4:20-7.
21. Tögel F, Westenfelder C. Recent advances in the understanding of acute kidney injury. *F1000Prime Rep*. 2014;6:83.
22. Lee SA, Noel S, Sadasivam M, Hamad AR, Rabb H. Role of immune cells in acute kidney injury and repair. *Nephron*. 2017;137:282-6.
23. Kinsey GR, Li L, Okusa MD. Inflammation in acute kidney injury. *Nephron Exp Nephrol*. 2008;109:e102-7.
24. Ratliff BB, Rabadi MM, Vasko R, Yasuda K, Goligorsky MS. Messengers without borders: mediators of systemic inflammatory response in AKI. *J Am Soc Nephrol*. 2013;24:529-36.
25. Okamura DM, Pennathur S. The balance of powers: redox regulation of fibrogenic pathways in kidney injury. *Redox Biol*. 2015;6:495-504.
26. Ratliff BB, Abdulmahdi W, Pawar R, Wolin MS. Oxidant mechanisms in renal injury and disease. *Antioxid Redox Signal*. 2016;25:119-46.
27. Sureshbabu A, Ryter SW, Choi ME. Oxidative stress and autophagy: crucial modulators of kidney injury. *Redox Biol*. 2015;4:208-14.
28. Gorin Y. The kidney: an organ in the front line of oxidative stress-associated pathologies. *Antioxid Redox Signal*. 2016;25:639-41.
29. Agarwal A, Dong Z, Harris R, et al. Cellular and molecular mechanisms of AKI. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27:1288-99.
30. Bonventre JV, Zuk A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? *Kidney Int*. 2004;66:480-5.
31. Pannu N. Bidirectional relationships between acute kidney injury and chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2013;22:351-6.
32. Frossard JL, Quadri R, Hadengue A, Morel P, Pastor CM. Endothelial nitric oxide synthase regulation is altered in pancreas from cirrhotic rats. *World J Gastroenterol*. 2006;12:228-33.
33. Coca SG, Yusuf B, Shlipak MG, Garg AX, Parikh CR. Long-term risk of mortality and other adverse outcomes after acute kidney

- injury: a systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis.* 2009;53:961-73.
34. Coca SG, Singanamala S, Parikh CR. Chronic kidney disease after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Kidney Int.* 2012;81:442-8.
  35. Sanches TR, Volpini RA, Massola Shimizu MH, et al. Sildenafil reduces polyuria in rats with lithium-induced NDI. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012;302:F216-25.
  36. Chawla LS, Amdur RL, Amodeo S, Kimmel PL, Palant CE. The severity of acute kidney injury predicts progression to chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2011;79:1361-9.
  37. Rifkin DE, Coca SG, Kalantar-Zadeh K. Does AKI truly lead to CKD? *J Am Soc Nephrol.* 2012;23:979-84.
  38. Akcay A, Nguyen Q, Edelstein CL. Mediators of inflammation in acute kidney injury. *Mediators Inflamm.* 2009;2009:137072.
  39. Chawla LS, Kimmel PL. Acute kidney injury and chronic kidney disease: an integrated clinical syndrome. *Kidney Int.* 2012;82:516-24.
  40. Moll S, Ebeling M, Weibel F, Farina A, et al. Epithelial cells as active player in fibrosis: findings from an *in vitro* model. *PLoS One.* 2013;8:e56575.
  41. Leung KC, Tonelli M, James MT. Chronic kidney disease following acute kidney injury-risk and outcomes. *Nat Rev Nephrol.* 2013;9:77-85.
  42. Takaori K, Nakamura J, Yamamoto S, et al. Severity and frequency of proximal tubule injury determines renal prognosis. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27:2393-406.
  43. Rodríguez-Romo R, Benítez K, Barrera-Chimal J, et al. AT1 receptor antagonism before ischemia prevents the transition of acute kidney injury to chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2016;89:363-73.
  44. Lima-Posada I, Portas-Cortés C, Pérez-Villalva R, et al. Gender differences in the acute kidney injury to chronic kidney disease transition. *Sci Rep.* 2017;7:12270.
  45. Ishani A, Xue JL, Himmelfarb J, et al. Acute kidney injury increases risk of ESRD among elderly. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20:223-8.
  46. Mammen C, Al Abbas A, Skippen P, et al. Long-term risk of CKD in children surviving episodes of acute kidney injury in the intensive care unit: a prospective cohort study. *Am J Kidney Dis.* 2012;59:523-30.
  47. Bombach AS, Klemmer PJ. The incidence and implications of aldosterone breakthrough. *Nat Clin Pract Nephrol.* 2007;3:486-92.
  48. Liu J, Kumar S, Dolzhenko E, et al. Molecular characterization of the transition from acute to chronic kidney injury following ischemia/reperfusion. *JCI Insight.* 2017;2: pii: 94716.
  49. Basile DP, Bonventre JV, Mehta R, et al. Progression after AKI: understanding maladaptive repair processes to predict and identify therapeutic treatments. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27:687-97.
  50. Basile DP, Leonard EC, Tonade D, Friedrich JL, Goenka S. Distinct effects on long-term function of injured and contralateral kidneys following unilateral renal ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012;302:F625-35.
  51. Basile DP, Friedrich JL, Spahic J, et al. Impaired endothelial proliferation and mesenchymal transition contribute to vascular rarefaction following acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2011;300:F721-33.
  52. Basile DP. Rarefaction of peritubular capillaries following ischemic acute renal failure: a potential factor predisposing to progressive nephropathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2004;13:1-7.
  53. Bechtel W, McGoohan S, Zeisberg EM, et al. Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney. *Nat Med.* 2010;16:544-50.
  54. Yang L, Besschetnova TY, Brooks CR, Shah JV, Bonventre JV. Epithelial cell cycle arrest in G2/M mediates kidney fibrosis after injury. *Nat Med.* 2010;16:535-43, 1p following 143.
  55. Barrera-Chimal J, Pérez-Villalva R, Rodríguez-Romo R, et al. Spirinolactone prevents chronic kidney disease caused by ischemic acute kidney injury. *Kidney Int.* 2013;83:93-103.
  56. Singh AP, Singh N, Singh Bedi PM. Estrogen attenuates renal IRI through PPAR- $\gamma$  agonism in rats. *J Surg Res.* 2016;203:324-30.
  57. Bonventre JV. Maladaptive proximal tubule repair: cell cycle arrest. *Nephron Clin Pract.* 2014;127:61-4.
  58. Chevalier RL. The proximal tubule is the primary target of injury and progression of kidney disease: role of the glomerulotubular junction. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2016;311:F145-61.
  59. Bramlage P, Swift SL, Thoenes M, et al. Non-steroidal mineralocorticoid receptor antagonism for the treatment of cardiovascular and renal disease. *Eur J Heart Fail.* 2016;18:28-37.
  60. Venkatachalam MA, Weinberg JM, Kriz W, Bidani AK. Failed tubule recovery, AKI-CKD transition, and kidney disease progression. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26:1765-76.
  61. Grgic I, Campanholle G, Bijol V, et al. Targeted proximal tubule injury triggers interstitial fibrosis and glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 2012;82:172-83.
  62. Basile DP, Donohoe D, Roethe K, Osborn JL. Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillaries and influences long-term function. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001;281:F887-99.
  63. Bábícková J, Klinkhammer BM, Buhl EM, et al. Regardless of etiology, progressive renal disease causes ultrastructural and functional alterations of peritubular capillaries. *Kidney Int.* 2017;91:70-85.
  64. Hörbelt M, Lee SY, Mang HE, et al. Acute and chronic microvascular alterations in a mouse model of ischemic acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;293:F688-95.
  65. Leonard EC, Friedrich JL, Basile DP. VEGF-121 preserves renal microvessel structure and ameliorates secondary renal disease following acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008;295:F1648-57.
  66. Nangaku M. Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: a final common pathway to end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17:17-25.
  67. Kong T, Eltzschig HK, Karhausen J, Colgan SP, Shelley CS. Leukocyte adhesion during hypoxia is mediated by HIF-1-dependent induction of beta2 integrin gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:10440-5.
  68. Grgic I, Duffield JS, Humphreys BD. The origin of interstitial myofibroblasts in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol.* 2012;27:183-93.
  69. Lin SL, Chang FC, Schrimpf C, et al. Targeting endothelium-pericyte cross talk by inhibiting VEGF receptor signaling attenuates kidney microvascular rarefaction and fibrosis. *Am J Pathol.* 2011;178:911-23.
  70. Humphreys BD, Lin SL, Kobayashi A, et al. Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Am J Pathol.* 2010;176:85-97.
  71. Lin SL, Kisseleva T, Brenner DA, Duffield JS. Pericytes and perivascular fibroblasts are the primary source of collagen-producing cells in obstructive fibrosis of the kidney. *Am J Pathol.* 2008;173:1617-27.
  72. Chen YT, Chang FC, Wu CF, et al. Platelet-derived growth factor receptor signaling activates pericyte-myofibroblast transition in obstructive and post-ischemic kidney fibrosis. *Kidney Int.* 2011;80:1170-81.
  73. Kramann R, Humphreys BD. Kidney pericytes: roles in regeneration and fibrosis. *Semin Nephrol.* 2014;34:374-83.
  74. Schrimpf C, Xin C, Campanholle G, et al. Pericyte TIMP3 and ADAMTS1 modulate vascular stability after kidney injury. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23:868-83.
  75. Duffield JS. Cellular and molecular mechanisms in kidney fibrosis. *J Clin Invest.* 2014;124:2299-306.
  76. Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. Inflammatory processes in renal fibrosis. *Nat Rev Nephrol.* 2014;10:493-503.
  77. Eriksen BO, Ingebretsen OC. The progression of chronic kidney disease: a 10-year population-based study of the effects of gender and age. *Kidney Int.* 2006;69:375-82.
  78. Barrera-Chimal J, Pérez-Villalva R, Ortega JA, et al. Mild ischemic injury leads to long-term alterations in the kidney: amelioration by spirinolactone administration. *Int J Biol Sci.* 2015;11:892-900.

RESEARCH ARTICLE

## Resilience to acute kidney injury in offspring of maternal protein restriction

Luis Enrique García-Ortuño,<sup>1,2,3</sup>  Jonatan Barrera-Chimal,<sup>1,4</sup> Rosalba Pérez-Villalva,<sup>1,2</sup> Juan Antonio Ortega-Trejo,<sup>1,2</sup> Emma Luna-Bolaños,<sup>1,2</sup> Ixchel Lima-Posada,<sup>1,2</sup> Andrea Sánchez-Navarro,<sup>1,2</sup> Luis Reyes-Castro,<sup>5</sup>  Gerardo Gamba,<sup>1,2,6</sup> Elena Zambrano,<sup>5</sup> and  Norma A. Bobadilla<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Molecular Physiology Unit, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico; <sup>2</sup>Department of Nephrology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico; <sup>3</sup>Department of Pathology, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico; <sup>4</sup>Translational Medicine Unit, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Mexico City, Mexico; <sup>5</sup>Reproductive Biology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico; and <sup>6</sup>Tecnológico de Monterrey, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Monterrey, New Lion, Mexico

Submitted 29 July 2019; accepted in final form 4 October 2019

**García-Ortuño LE, Barrera-Chimal J, Pérez-Villalva R, Ortega-Trejo JA, Luna-Bolaños E, Lima-Posada I, Sánchez-Navarro A, Reyes-Castro L, Gamba G, Zambrano E, Bobadilla NA.** Resilience to acute kidney injury in offspring of maternal protein restriction. *Am J Physiol Renal Physiol* 317: F1637–F1648, 2019. First published October 14, 2019; doi:10.1152/ajprenal.00356.2019.—Protein restriction (PR) during pregnancy induces morphofunctional alterations related to deficient nephrogenesis. We studied the renal functional and morphological significance of PR during pregnancy and/or lactation in adult male rat offspring and the repercussions on acute kidney injury (AKI) severity. Female rats were randomly assigned to the following groups: control diet during pregnancy and lactation (CC), control diet during pregnancy and PR diet during lactation (CR), PR during pregnancy and control diet during lactation (RC), and PR during pregnancy and lactation (RR). Three months after birth, at least 12 male offspring of each group randomly underwent either bilateral renal ischemia for 45 min [ischemia-reperfusion (IR)] or sham surgery. Thus, eight groups were studied 24 h after reperfusion: CC, CC + IR, CR, CR + IR, RC, RC + IR, RR, and RR + IR. Under basal conditions, the CR, RC, and RR groups exhibited a significant reduction in nephron number that was associated with a reduction in renal blood flow. Glomerular hyperfiltration was present as a compensatory mechanism to maintain normal renal function. mRNA levels of several vasoactive, antioxidant, and anti-inflammatory molecules were decreased. After IR, renal function was similarly reduced in all of the studied groups. Although all of the offspring from maternal PR exhibited renal injury, the magnitude was lower in the RC and RR groups, which were associated with faster renal blood flow recovery, differential vasoactive factors, and hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  signaling. Our results show that the offspring from maternal PR are resilient to AKI induced by IR that was associated with reduced tubular injury and a differential hemodynamic response.

hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ ; nephron number; renal blood flow; vasoactive factors

### INTRODUCTION

Evidence in animals and in humans has shown that alterations in the uterine environment during pregnancy have an

impact on the development of vertebrate organisms (55, 62). In particular, it has been shown that protein restriction (PR) during pregnancy in rats produces renal morphofunctional alterations, characterized mainly by a decrease in nephron number and number of well-differentiated glomeruli in the offspring (9, 26, 35, 36, 60, 63, 68). In addition, there are ultrastructural changes, such as thickening of the glomerular basement membrane, disorganization of the fenestrated endothelium, and degeneration of podocyte pedicels (58). Although the influence of maternal PR (MPR) during gestation and/or lactation in offspring has been extensively studied in pathologies that include metabolic syndrome (37), glucose metabolism (14), and reproductive physiology (67), among others, little is known about its impact on renal function and against a renal injury hit during adulthood. Moreover, in the rat, nephrogenesis continues up to 10 days after birth, and the impact of the lactation period on renal physiology has not been explored.

The physiological consequences of a reduced number of nephrons in humans were first proposed by Brenner et al. (11) in 1988. After that, it was demonstrated that the reduction of nephrons, whether acquired or congenital, is associated with hypertrophy, hyperfiltration, and glomerular hypertension (32, 45). All of these alterations are observed in the early phase of life as compensatory mechanisms to fight against nephron number reduction and to maintain normal renal function. In the long term, however, they can favor an accelerated, progressive loss of nephrons that leads to chronic kidney disease and cardiovascular injury (31). Nonetheless, the impact of low birth nephron number on how the kidney deals with sudden renal pathological situations that may occur during adulthood remains largely unexplored.

Acute kidney injury (AKI) is a public health concern, and its clinical importance is due to its high morbidity and mortality rates (47). AKI affects 13.3 million people and contributes to ~1.7 million deaths per year (28). The pathophysiological mechanisms by which AKI occurs are complex and involve several factors, such as hypoxia (56), the establishment of an inflammatory process, and the production of reactive oxygen species (39, 46), which are the main mediators that injure the renal epithelium and endothelium (7, 21, 27, 33, 34, 52, 57).

Although the mechanisms by which MPR induces alterations in nephrogenesis and the long-term consequences of low

Address for reprint requests and other correspondence: N. A. Bobadilla, Unidad de Fisiología Molecular, Vasco de Quiroga No. 15, Tlalpan, Mexico City 14080, Mexico (e-mail: nab@iibiomedicas.unam.mx).

nephron numbers at birth have been established, to our knowledge, it has not yet been explored how this could impact the renal response to an AKI episode induced by ischemia-reperfusion (IR). With the consideration of the high worldwide prevalence of both malnutrition and AKI, in the present study, we decided to evaluate the effect of MPR during pregnancy and/or lactation on the severity of ischemic AKI in male offspring.

## METHODS

All experiments involving animals were conducted in accordance with the National Institutes of Health *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* and with the Mexican Federal Regulation for animal reproduction, care, and experimentation (NOM-062-ZOO-2001). The study was approved by the Animal Care and Use Committee of the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (Mexico City, Mexico).

**MPR model.** Twelve female Wistar rats (age: 10–12 wk) were obtained from our animal facility. Rats were kept under controlled 12:12-h light-dark cycles at 21–22°C. Before being bred, female rats were maintained on a standard diet. Female rats were mated with male breeders (16 wk of age) until the day on which spermatozoa were present in the vaginal smear and was designated *day 0* of conception. Only female rats that were pregnant within 5 days of introduction of male rats were retained in the study. Pregnant rats were transferred to individual cages and randomly allocated to be fed either a 20% casein (control diet) or a 10% casein isocaloric diet (restricted diet) during the gestation. In the lactation period, the control diet-fed mother group was divided again into two subgroups: one-half continued to be fed with the control diet (CC group;  $n = 3$ ) and the other half was fed with a restricted diet (CR group;  $n = 3$ ). The restricted diet-fed mother group was also divided into two subgroups: one-half was fed a control diet (RC group;  $n = 3$ ) and the other half was fed a restricted diet (RR group;  $n = 3$ ). All litters studied were adjusted to 10 pups. Control and restricted diets were prepared in our laboratory following the American Institute of Nutrition's recommendation to supplement low-protein diets with L-cystine (Sigma). The components are shown in Table 1, and each diet was provided in the form of flat biscuits, as we have previously reported (66). Food and water were available ad libitum. The offspring were weaned at *postnatal day 21*, and only male offspring were studied and fed a commercial diet during all of their life. Male offspring were allocated to the following groups: CC ( $n = 12$ ), CR ( $n = 12$ ), RC ( $n = 12$ ), and RR ( $n = 12$ ). In turn, each offspring group was subdivided into two groups: one-half underwent IR injury (CC + IR, CR + IR, RC + IR, and RR + IR groups) and the other half underwent sham surgery (CC, CR, RC, and RR groups). Surgeries were induced at 12–14 wk of age.

**Renal injury induced by IR in offspring.** Rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (30 mg/kg) and placed on a heating pad to maintain body temperature at 37°C. A

laparotomy was performed to access the retroperitoneum and to dissect the renal vascular hilum to interrupt blood flow to the kidney by placing a nontraumatic vascular clamp in each renal hilum for 45 min. Ischemia was verified visually by changes in kidney color. Reperfusion was achieved by release of the clamps. Animals were sutured from the abdominal wall with 3-0 Vicryl (muscle) and 3-0 silk (skin). The same procedure was performed in the sham-operated groups with the exception of the placement of the vascular clamp in the renal hilum. After recovery, rats were placed in metabolic cages with free access to water for 16–18 h for urine collection. Urinary protein excretion was determined from the urine collections after the surgery using the turbidimetric method with trichloroacetic acid.

**Renal functional measurements.** Twenty-four hours after surgery, rats were anesthetized again with pentobarbital sodium (30 mg/kg) and placed on a homeothermic table. The femoral arteries were catheterized with polyethylene tubing (PE-50). Mean arterial pressure (MAP) was monitored with a pressure transducer (model P23DB, Gould) and recorded on a polygraph (Grass Instrument, Quincy, MA). To record renal blood flow (RBF), the left kidney artery was dissected, and an ultrasound transit-time flow probe filled with ultrasonic coupling gel (Transonic Flow Probe, Transonic, New York, NY) was placed around the artery (HR Lubricating Jelly, Carter-Wallace, New York, NY). At the end of the experiment, a blood sample was taken from the femoral artery. Urine and serum creatinine concentrations were measured with the QuantiChrom creatinine assay kit (DICT-500, BioAssay Systems) following the manufacturer's instructions. Renal creatinine clearance (CrCl) was calculated according to the following formula:  $CrCl = (U \times V)/P$ , where U is the creatinine concentration in the urine, V is the urine flow rate, and P is the plasma creatinine concentration. The filtration fraction was estimated as the ratio of CrCl and renal plasma flow.

**Urinary biomarkers of ischemic renal injury.** Urinary heat shock protein 72 (HSP72) and urinary kidney injury molecule-1 (KIM-1) levels were detected by Western blot analysis. Briefly, each urine sample was diluted 1:10 in 0.9% saline solution, and 10  $\mu$ L of each dilution was loaded and resolved by 8.5% SDS-PAGE and electroblotted onto PVDF membranes. Membranes were incubated overnight at 4°C with mouse HSP72 antibody (1:5,000 dilution, Enzo Life Sciences) or KIM-1 antibody (1:1,000 dilution, Biorbyt) and then incubated with secondary antibody, namely, horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG for HSP72 (1:5,000, Santa Cruz Biotechnology) and horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG for KIM-1 (1:15,000, Biorbyt), at room temperature for 90 min. Proteins were detected using a commercial chemiluminescence kit (Millipore).

**Light microscopy analysis.** Once the physiological parameters were recorded, the left kidney was perfused through the femoral catheter with 0.9% NaCl and then with 4% neutral-buffered formalin, and perfusion was continued until fixation was completed. Renal tissue was embedded in paraffin, and 3- $\mu$ m sections were stained with periodic acid-Schiff. Twelve cortical fields (magnification:  $\times 100$ ) were recorded from each kidney slide using a digital camera incorporated in a Nikon light microscope. Nephron number was estimated by glomerular counting in 10,000- $\mu$ m<sup>2</sup> field. The glomerular area was measured in at least 10 glomeruli/rat from the microphotographs with the help of Eclipse Net software, as we have previously reported (41, 48). In each microphotograph, injured tubules were counted. Tubular damage was characterized by loss of the brush border, lumen dilation, and detachment of epithelial tubular cells from the basement membrane. All analyses were blinded.

**Gene expression analysis.** The right kidney was removed and quickly frozen. Total renal cortex RNA was isolated from the kidneys using the TRIzol method (Invitrogen, Carlsbad, CA), and RNA integrity was checked by 1% agarose gel electrophoresis. Reverse transcription was carried out with 1  $\mu$ g total RNA and 200 units Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen). mRNA levels of the angiotensin II type 1 (AT<sub>1</sub>) receptor, endothelin,

Table 1. Composition of the two isocaloric diets

Components	Control Diet, %	Restricted Diet, %
Casein	20	10
Cystine	0.3	0.15
Choline	0.165	0.165
Vitamin mix	1	1
Mineral mix	5	5
Cellulose	5	5
Corn oil	5	5
Carbohydrates		
Corn starch	31.76	37.34
Dextrose	31.76	37.34
kcal/g Diet	4	4



endothelin type A (ET<sub>A</sub>) receptor, endothelin type B (ET<sub>B</sub>) receptor, endothelial nitric oxide synthase (eNOS), catalase, glutathione, peroxidase, SOD1, hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , and VEGF were quantified by real-time PCR on an ABI Prism 7300 Sequence Detection System (TaqMan, Applied Biosystems, Foster City, CA). Probes were ordered as the following kits: AT<sub>1</sub> receptor, Rn00561409\_S1; prepro-endothelin-1, Rn00561129\_m1; ET<sub>A</sub> receptor, Rn00561129\_m1; ET<sub>B</sub> receptor, Rn00569139\_m1; eNOS, Rn02132634\_s1; catalase, Rn00560930\_m1; glutathione peroxidase (Gpx), Rn00577994\_g1; SOD1, Rn00566938\_m1; HIF-1 $\alpha$ , Rn00577560\_m1; IL-6, Rn01410330\_m1; TNF- $\alpha$ , Rn99999017\_m1; and VEGF, Rn01511601\_m1. 18S mRNA levels were used to normalize the data.

**Statistics.** Results are presented as means  $\pm$  SE. Data were analyzed by one-way ANOVA, and differences among the groups were determined by the Bonferroni post hoc test for multiple comparisons. Basal parameters in all of the groups, tubular injury, and percent differences between each experimental group and the control group were determined by Dunnett's multiple-comparisons post hoc test. Differences in the distribution of the glomerular areas were evaluated by contingency analysis, and differences were assessed using a  $\chi^2$ -test with the Yates correction. Differences were considered statistically significant at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

**Effect of MPR on kidney physiology and glomerular number of offspring.** First, we studied whether MPR modifies basal renal function parameters in rat male offspring at 12–16 wk of age. A similar body weight was observed among the groups [CC group: 295  $\pm$  13.8 g, CR group: 302  $\pm$  9.1 g, RC group: 307  $\pm$  16.6 g, and RR group: 299  $\pm$  13.9 g,  $P =$  not significant (NS)] as well as in kidney weight (CC group: 1.32  $\pm$  0.09 g, CR group: 1.30  $\pm$  0.05 g, RC group: 1.39  $\pm$  0.05 g, and RR group: 1.31  $\pm$  0.04 g,  $P =$  NS). No significant differences in MAP (Fig. 1A) or proteinuria (Fig. 1B) in the offspring of any of the studied groups were recorded. Interestingly, the CR, RC, and RR groups exhibited a significant decrease in the number of nephrons compared with the control group of 11.2%, 15.7%, and 16.2%, respectively (Fig. 1C). In addition, there was a significant reduction of RBF in all of the offspring from

protein-restricted mothers compared with the control group (Fig. 1D). Nevertheless, CrCl remained within normal values in all of the studied groups (Fig. 1E). It is interesting to note that the reduction of nephrons in the MPR groups induced a state of glomerular hyperfiltration that was revealed by an increased renal filtration fraction (Fig. 1F), which might explain the normal renal function.

**Vasoactive, antioxidant, and inflammatory factors in mRNA levels.** mRNA levels of the AT<sub>1</sub> receptor, prepro-endothelin-1, ET<sub>A</sub> receptor, and ET<sub>B</sub> receptor are shown in Fig. 2. A significant decrease in AT<sub>1</sub> receptor, prepro-endothelin-1, and their receptors was detected in all of the offspring from protein-restricted mothers compared with the control group, except for ET<sub>B</sub> receptor mRNA levels in the CR group.

mRNA levels of eNOS, HIF-1 $\alpha$ , antioxidant enzymes, and proinflammatory cytokines are shown in Fig. 3. eNOS mRNA levels were similar among the studied groups (Fig. 3A). A significant reduction in mRNA levels of GPx, catalase, and HIF-1 $\alpha$  was found in all offspring from protein-restricted mothers (Fig. 3, B–D, respectively). Although IL-6 mRNA levels remained unchanged among the studied groups (Fig. 3E), we observed a statistically significant reduction in TNF- $\alpha$  mRNA levels in male rat offspring from protein-restricted mothers compared with the control group (Fig. 3F).

**Influence of MPR on AKI severity in offspring.** Once the effect of MPR on the basal renal function of the offspring was characterized, we evaluated the impact of the lower nephron number induced by MPR on the severity of an AKI episode. The renal injury induced by renal bilateral ischemia in the studied groups is represented as the percent change relative to the basal value of their respective control groups.

After 24 h of reperfusion, offspring from maternal unrestricted rats showed characteristic renal injury, as we have previously reported (6, 30, 48, 49), that is, a significant increase in proteinuria and a decrease in RBF and CrCl, together with renal inflammation, denoted by a significant increase in kidney weight (Fig. 4, A–D). Although all offspring from

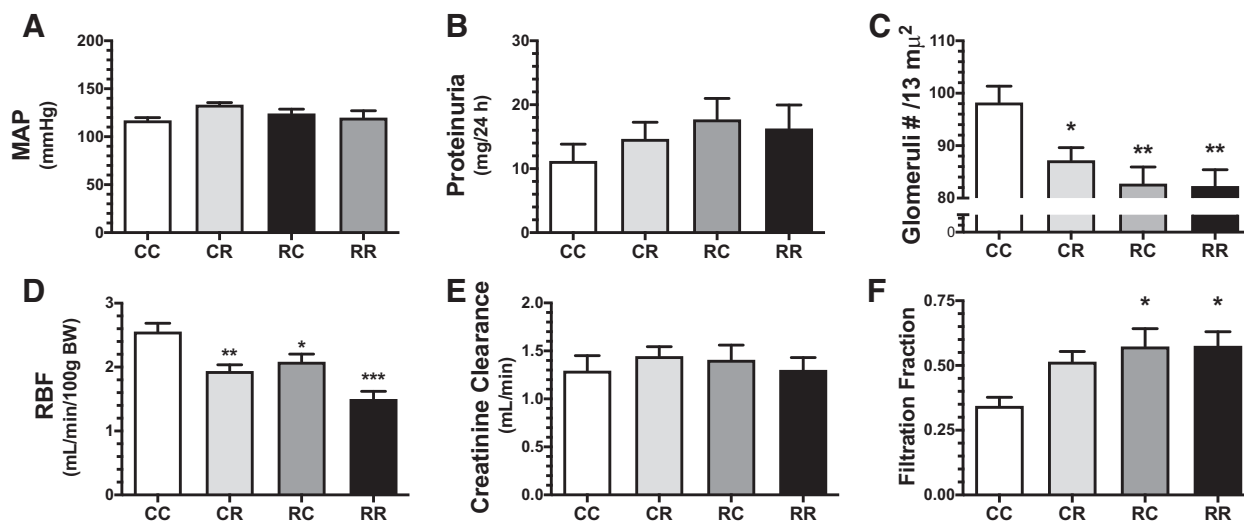
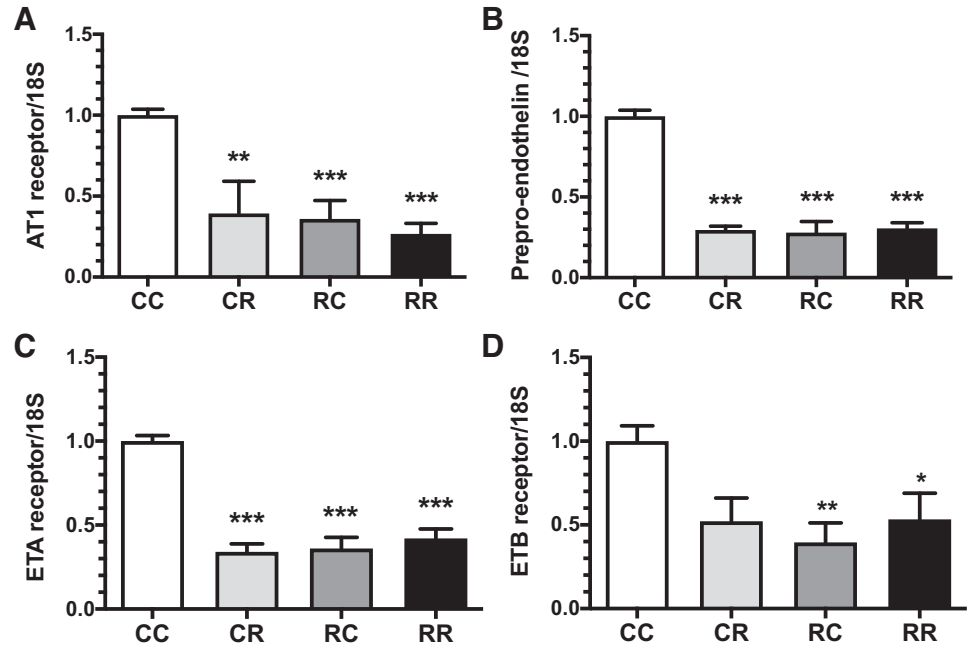


Fig. 1. Renal physiological parameters and glomerular number in offspring from control diet-fed mothers (CC group) or mothers with protein restriction during lactation (CR group), gestation (RC group), or both (RR group). A–F: mean arterial pressure (MAP; A), proteinuria (B), glomeruli number (C), renal blood flow (RBF; D), creatinine clearance (E), and filtration fraction (F). BW, body weight. Data are shown as means  $\pm$  SE,  $n =$  at least 6 rats/group. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$  vs. the CC group.

Fig. 2. mRNA levels of vasoactive molecules in kidney tissue of offspring from control diet-fed mothers (CC group) or mothers with protein restriction during lactation (CR group), gestation (RC group), or both (RR group). A–D: angiotensin II type 1 (AT1) receptor (A), prepro-endothelin (B), endothelin type A (ETA) receptor (C), and endothelin type B (ETB) receptor (D). Data are shown as means ± SE, n = at least 4 rats/group. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, and \*\*\*P < 0.001 vs. the CC group.



protein-restricted mothers exhibited proteinuria, renal dysfunction, and renal inflammation, the magnitude of the changes in proteinuria and kidney weight was significantly lower in the RC + IR and RR + IR groups compared with the control group (Fig. 4, A, B, and D). Proteinuria increased significantly in all groups compared against their respective control groups, except for the RR + IR group (Fig. 4A). CrCl decreased in a similar way in all of the studied groups (Fig. 4B); in other words, the strength of renal dysfunction induced by IR was similar in all of the studied groups. Interestingly, the renal hyperperfusion induced by IR was not observed in all MPR

groups when compared against their respective control groups (Fig. 4C). The increase in renal weight was lower in the RR + IR group (Fig. 4D). In addition, the filtration fraction was calculated as a ratio of glomerular filtration rate to RBF after the ischemic insult, and no statistical differences among the groups were observed: 0.020 ± 0.010 for the CC + IR group, 0.012 ± 0.003 for the CR + IR group, 0.014 ± 0.0036 for the RC + IR group, and 0.022 ± 0.012 for the RR + IR group (P = NS). The improvement in RBF, recorded just 24 h after renal ischemia in MPR offspring, was not evidenced in the

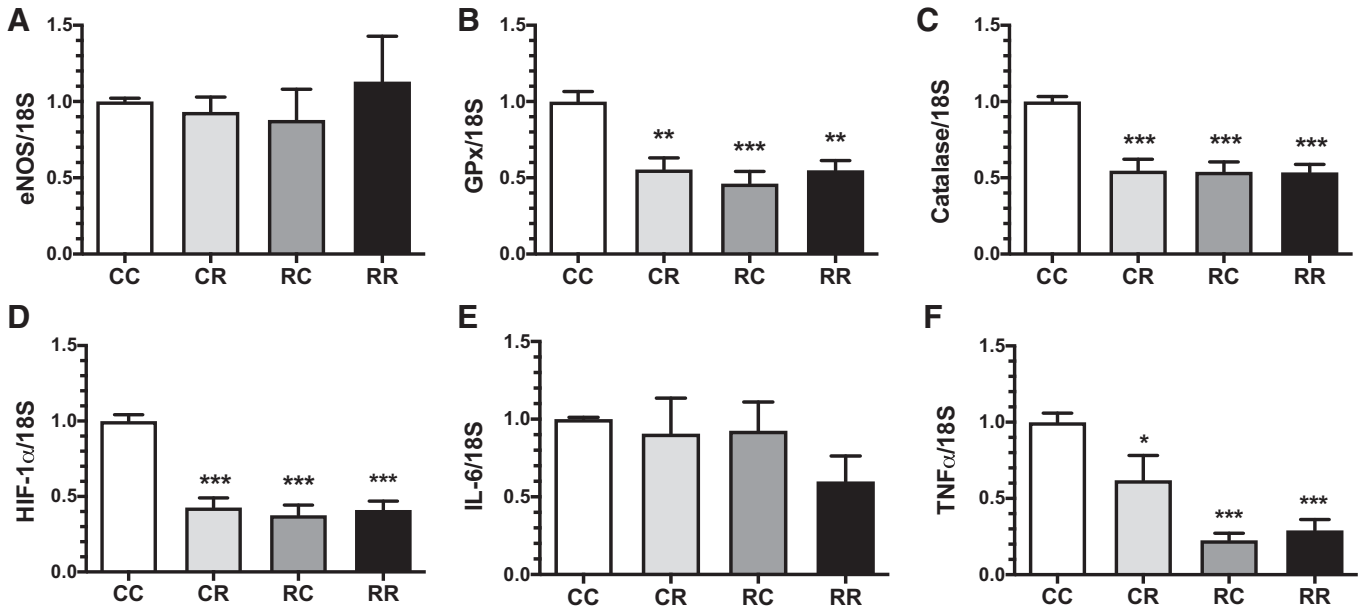


Fig. 3. mRNA levels of anti-inflammatory and antioxidant molecules in kidney tissue of offspring from control diet-fed mothers (CC group) or mothers with protein restriction during lactation (CR group), gestation (RC group), or both (RR group). A–F: endothelial nitric oxide synthase (eNOS; A), glutathione peroxidase (Gpx; B), catalase (C), hypoxia-inducible factor (HIF)-1α (D), IL-6 (E), and TNF-α (F). Data are shown as means ± SE, n = at least 6 rats/group. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, and \*\*\*P < 0.001 vs. the CC group.

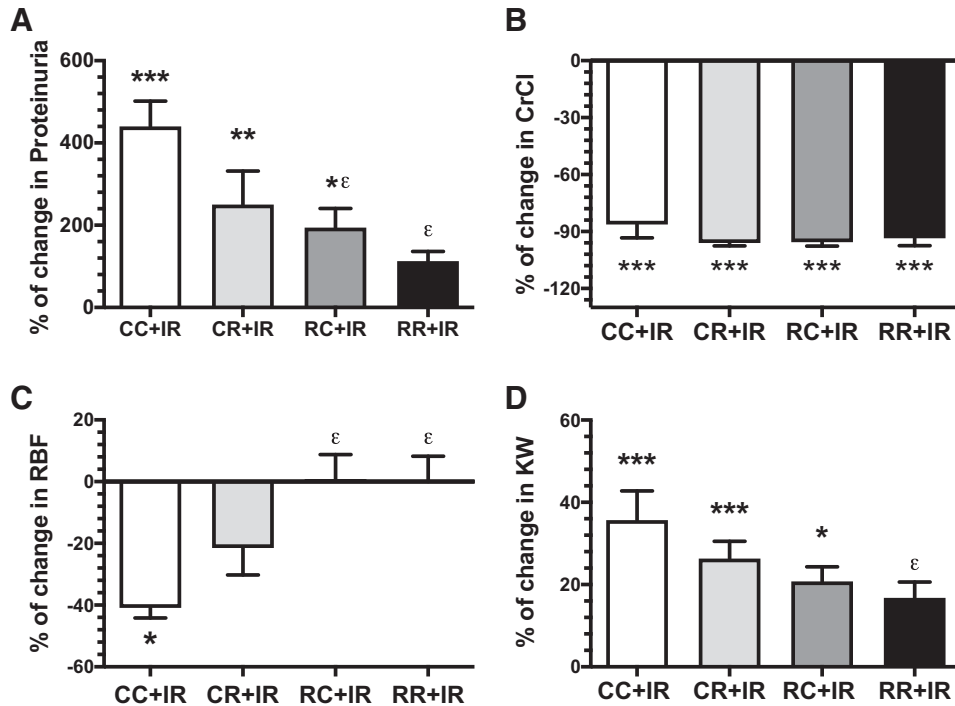


Fig. 4. Severity of acute renal injury induced by ischemia-reperfusion (IR) in offspring from control diet-fed mothers (CC group) or mothers with protein restriction during lactation (CR group), gestation (RC group), or both (RR group). *A–D*: proteinuria (*A*), creatinine clearance (CrCl; *B*), renal blood flow (RBF; *C*), and kidney weight (KW; *D*). Data are shown as means  $\pm$  SE of the percentage of change based on the control group (without ischemia);  $n =$  at least 6 rats/group. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$  vs. control of each group;  $\epsilon P < 0.05$  vs. the CC + IR group.

filtration fraction; perhaps CrCl reflects the renal function along 24 h after ischemia.

*Tubular epithelial injury induced by IR in offspring with MPR.* The tubular epithelium injury induced by IR was evaluated by histopathological analysis and quantification of sen-

sitive urinary biomarkers (HSP72 and KIM-1). To determine the percentage of tubular damage, periodic acid-Schiff-stained sections of the kidney were analyzed. Figure 5 shows representative microphotographs of renal tissue from the control group (Fig. 5A), CC + IR group (Fig. 5B), and MPR groups

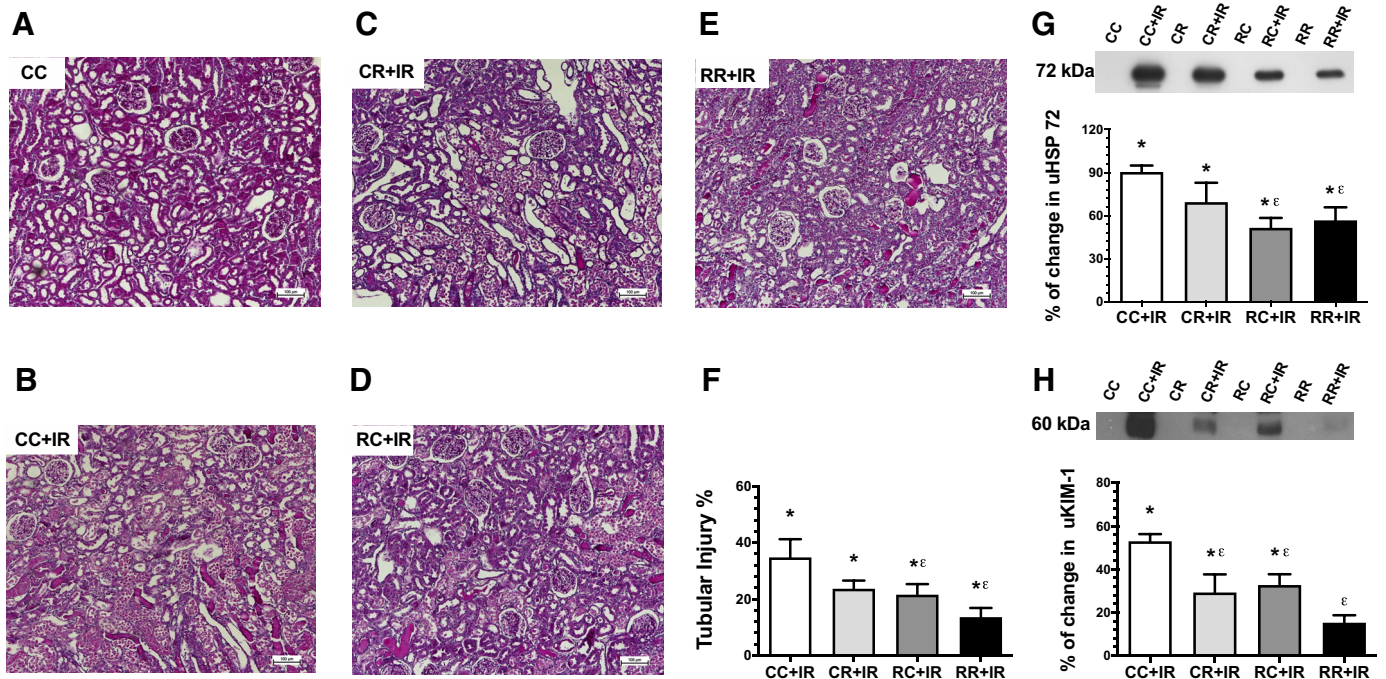


Fig. 5. Tubular epithelial injury induced by ischemia-reperfusion (IR) in offspring from control diet-fed mothers (CC group) or mothers with protein restriction during lactation (CR group), gestation (RC group), or both (RR group). *A–E*: representative images of kidney histological sections stained with periodic acid-Schiff. Magnification:  $\times 100$ . *A*: CC + IR group; *B*: CC + IR group; *C*: CR + IR group; *D*: RC + IR group; *E*: RR + IR group. *F–H*: percentage of tubular injury (*F*), urinary heat shock protein 72 (uHSP72) levels by Western blot analysis (*G*), and urinary kidney injury molecule-1 (uKIM-1) levels by Western blot analysis (*H*). *G* and *H*, top: representative blots; bottom: densitometric analyses. Data are shown as means  $\pm$  SE of the percentage of change based on the control group (without ischemia);  $n =$  at least 5 rats/group. \* $P < 0.05$  vs. control of each group;  $\epsilon P < 0.05$  vs. the CC + IR group.

that underwent ischemia (CR + IR, RC + IR, and RR + IR group; Fig. 5, C–E, respectively). Tubular injury was characterized by cell death, epithelial cell detachment toward the lumen of the tubule, and the presence of tubular casts. Consistent with our observations at the physiological level, the RC + IR and RR + IR groups showed a significantly lower percentage of tubular injury compared with the CC + IR group (Fig. 5F). Urinary HSP72 and KIM-1 was undetectable in all of the sham-operated groups. Urinary HSP72 levels increased significantly in all groups after IR-induced injury; however, the increase in the RC + IR and RR + IR groups was significantly lower than that observed in the CC + IR group (Fig. 5G). A similar behavior was observed for urinary levels of KIM-1, except for the RR + IR group, which despite its increase, was not significantly different compared with its respective sham-operated group. In all of the rats from protein-restricted mothers, the increase in urinary KIM-1 was significantly lower compared with the CC + IR group (Fig. 5H).

*Influence of IR in the area of glomerular tufts in offspring with MPR.* In previous studies from our laboratory using the model of cyclosporine nephrotoxicity, in which renal vasoconstriction is the main player, glomerular constriction was demonstrated by the reduction in glomerular diameter (41), whereas glomerular hypertrophy was evidenced by the increment in glomerular diameter (48). In the present study, we evaluated glomerular contraction by measuring the area of glomerular tufts in offspring with MPR. Figure 6A shows a histogram of glomerular tuft areas for the CC group, in which a Gaussian distribution was observed. In contrast, in the CC + IR group, there was a decrease in the proportion of glomeruli of normal and greater areas corresponding to the intervals of 5,001–7,000 and 7,001–9,000  $\mu\text{m}^2$ , which showed values of 15.9% and 3.9%, respectively, unlike the CC group, which presented percentages of 41.8% and 23.5%, respectively (Fig. 6, A and B). Consequently, there was a significant increase in the percentage of glomeruli with smaller areas of 3,001–5,000

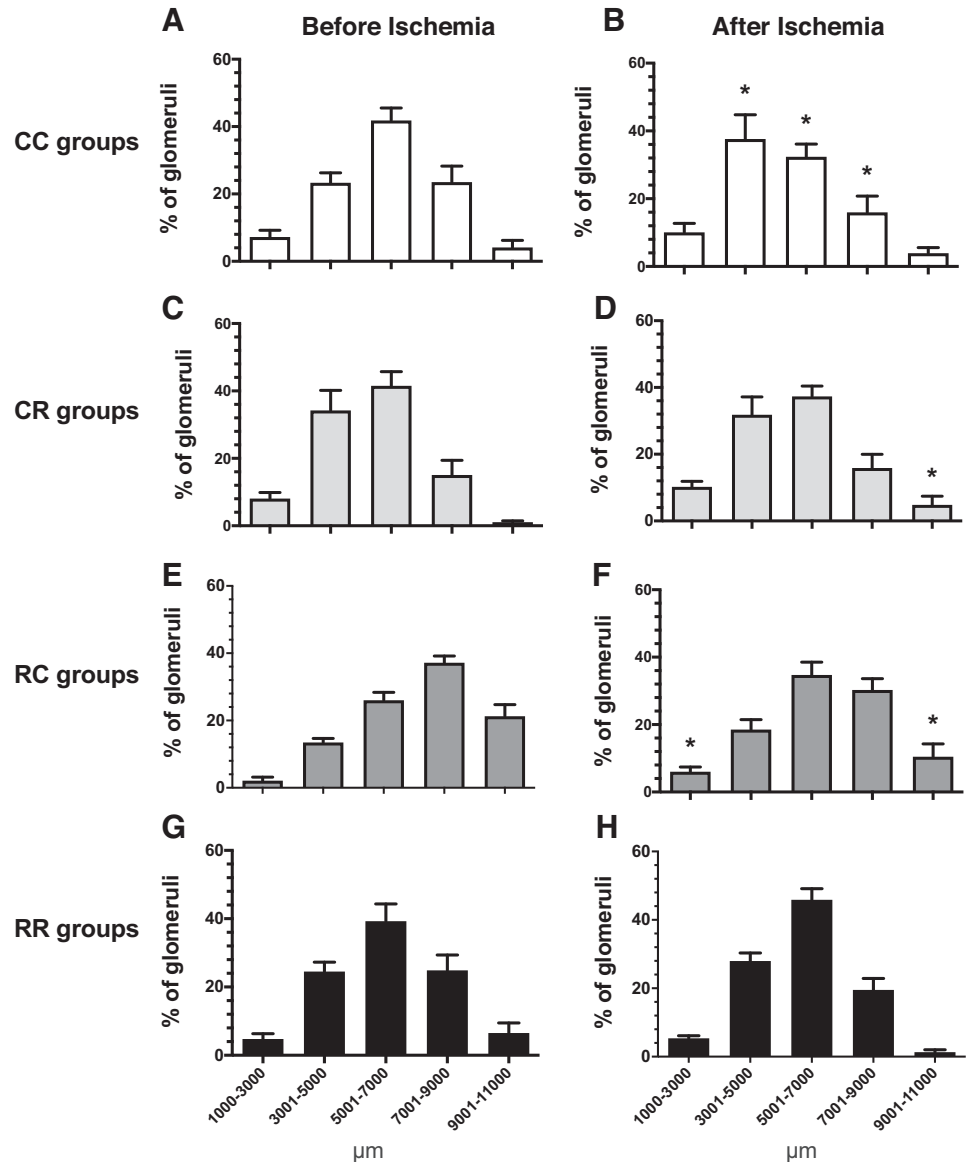


Fig. 6. Influence of acute kidney injury induced by ischemia-reperfusion (IR) in the glomerular tuft area of offspring from control diet-fed mothers (CC group) or mothers with protein restriction during lactation (CR group), gestation (RC group), or both (RR group). A, C, E, and G: CC, CR, RC, and RR groups, respectively, before IR. B, D, F, and H: CC + IR, CR + IR, RC + IR, and RR + IR groups, respectively, after IR. Data are shown as means  $\pm$  SE;  $n =$  at least 6 rats/group. \* $P < 0.05$  vs. rats without ischemia for each group and interval.

$\mu\text{m}^2$  (37.6%) with respect to the control group (23.3%). These results suggest that after IR, the control group exhibited glomerular hypoperfusion. Interestingly, the offspring of protein-restricted mothers (Fig. 6, D, F, and H) showed no relevant alterations in glomerular distribution with respect to their own sham-operated group (Fig. 6, C, E, and G), indicating that these animals have a better adaptation to damage by IR and in accord with the early RBF recovery observed in these groups.

*mRNA levels of vasoactive, antioxidant, and inflammatory factors after AKI in male rat offspring from protein-restricted mothers.* The renal injury induced by IR was associated with a significant reduction in the AT<sub>1</sub> receptor in the CC + IR group (−80%) that was expressed as the percent change relative to its respective sham-operated group (CC group), whereas in the offspring of protein-restricted mothers, the reduction was significantly less than in the CC + IR group at ~40% (Fig. 7A). The percent change in mRNA levels of prepro-endothelin-1 (Fig. 7B) was not different among the studied groups. In contrast, ET<sub>A</sub> receptor mRNA levels increased significantly in the offspring of MPR groups with respect to their respective sham-operated groups, except for the RR + IR group. This effect was not observed in the CC + IR group (Fig. 7C). ET<sub>B</sub> receptor mRNA levels decreased significantly in the CC + IR group. In the rest of the groups, this reduction was not significant (Fig. 7D).

eNOS mRNA levels were not altered in any studied group (Fig. 8A). In the CC + IR group, GPx mRNA levels decreased by 68.7% with respect to its sham-operated group (CC group); this marked decrease was not observed in the rest of the rats from MPR groups (Fig. 8B). Similarly, SOD1 mRNA levels were significantly reduced in the CC + IR and CR + IR groups and to a lesser extent in the RR + IR group (Fig. 8C). Catalase mRNA levels were significantly reduced in all studied groups by the same magnitude (Fig. 8D). IL-6 mRNA levels increased significantly in all groups compared with their respective sham-operated groups (Fig. 8E). TNF- $\alpha$  mRNA levels in-

creased significantly in all MPR groups but not in the CC + IR group (Fig. 8F).

mRNA levels of HIF-1 $\alpha$  and its target gene VEGF were analyzed, as is shown in Fig. 9. In the CC + IR group, a significant decrease in HIF-1 $\alpha$  mRNA levels was observed. Whereas the experimental groups exhibited the opposite behavior, HIF-1 $\alpha$  mRNA levels increased significantly in all offspring from MPR groups (Fig. 9A). The impact of this difference was evidenced in VEGF mRNA levels, which were significantly reduced in the CC + IR group, an effect that was not seen in the CR + IR, RC + IR, and RR + IR groups (Fig. 9B).

## DISCUSSION

The present study was designed to assess the impact of an AKI episode in male rat offspring derived from protein-restricted mothers during gestation and/or lactation. Before the induction of renal injury, it was essential to understand the basal renal physiology of all of the studied offspring groups. First, we confirmed a significant reduction in nephron number in all of the male rat offspring from protein-restricted mothers during gestation, as has been previously reported (8, 16, 19, 24, 25, 32, 42). In all these studies, however, the influence of PR during lactation was not evaluated. Our study is the first to address this issue, finding that the RC and RR groups exhibited a greater reduction in nephron number compared with the CR group, suggesting that MPR, during gestation, affects more nephrogenesis than lactation. The importance of nephron number at birth is based on growing evidence in humans and animals, which emphasizes that the lower the nephron number, the higher the risk of kidney and cardiovascular diseases in adult life (8, 16, 19, 25, 32, 42, 45, 61).

A particularly interesting finding was the significant reduction in RBF in the offspring from protein-restricted mothers, which could result from the reduced nephron number. This finding has also been recently reported in a murine model with

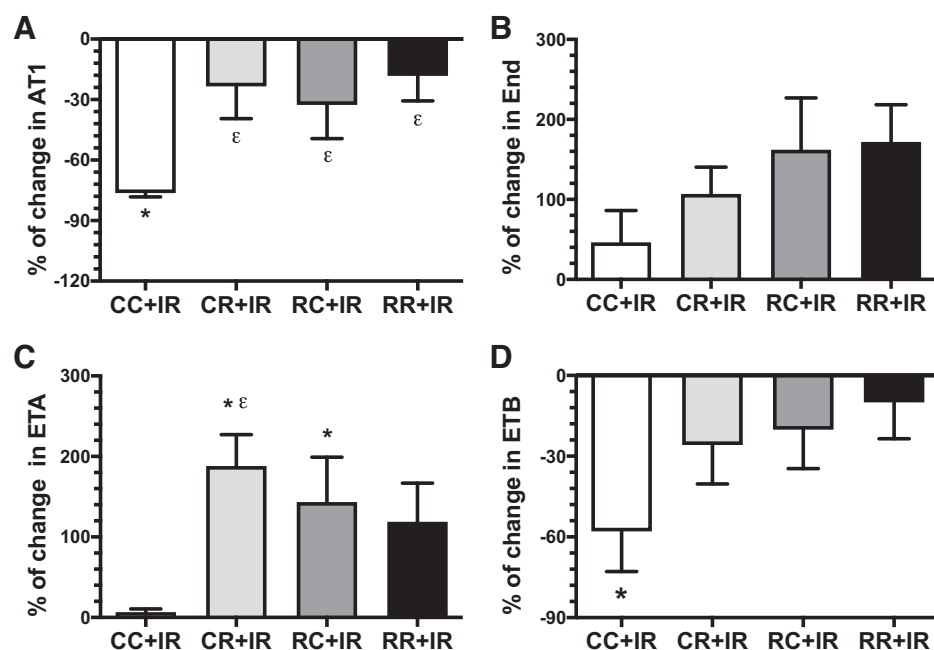


Fig. 7. mRNA levels of vasoactive molecules in kidney tissue of offspring from control diet-fed mothers (CC group) or mothers with protein restriction during lactation (CR group), gestation (RC group), or both (RR group) after acute renal injury induced by ischemia-reperfusion (IR). A–D: angiotensin II type I (AT<sub>1</sub>) receptor (A), prepro-endothelin (End; B), endothelin type A (ET<sub>A</sub>) receptor (C), and endothelin type B (ET<sub>B</sub>) receptor (D). Data are shown as means  $\pm$  SE of the percentage of change based on the control group (without ischemia);  $n$  = at least 5 rats/group. \* $P$  < 0.05 vs. control of each group;  $^{\epsilon}P$  < 0.05 vs. the CC + IR group.

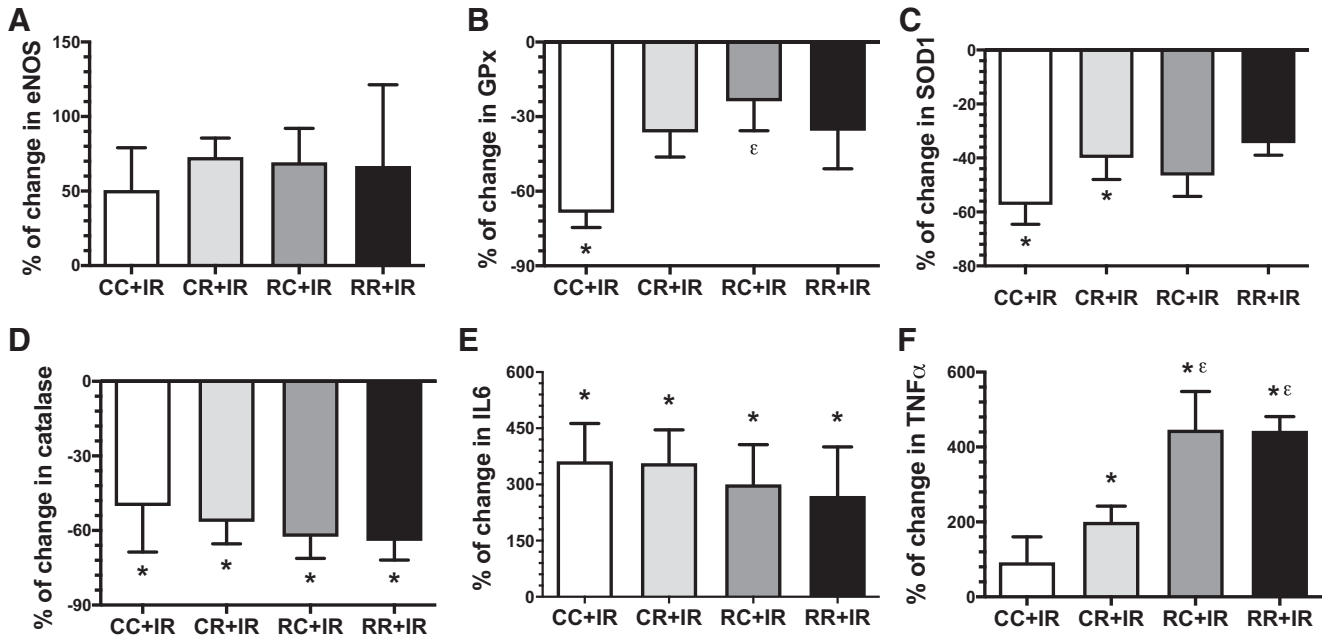


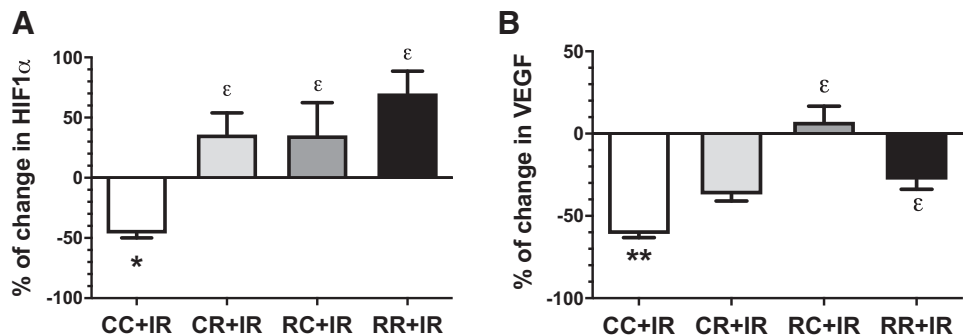
Fig. 8. mRNA levels of anti-inflammatory and antioxidant molecules in kidney tissue of offspring from control diet-fed mothers (CC group) or mothers with protein restriction during lactation (CR group), gestation (RC group), or both (RR group) after acute renal injury induced by ischemia-reperfusion (IR). A–F: endothelial nitric oxide synthase (eNOS; A), glutathione peroxidase (GPx; B), SOD1 (C), catalase (D), IL-6 (E), and TNF- $\alpha$  (F). Data are shown as means  $\pm$  SE of the percentage of change based on the control group (without ischemia);  $n =$  at least 5 rats/group. \* $P < 0.05$  vs. control of each group;  $^{\epsilon}P < 0.05$  vs. the CC + IR group.

caloric restriction and PR and was associated with endothelial dysfunction and reduced vascular density (1, 5). Despite the lack of alterations in MAP, proteinuria, or CrCl, the greater filtration fraction in the experimental groups suggested a hyperfiltration state that allowed for the maintenance of renal function within normal parameters. This glomerular hyperfiltration has been reported as a deleterious hemodynamic mechanism that leads to progressive loss of nephrons in adult life (20, 22, 31, 32, 45).

RBF regulation is complex, and it is determined by the vascular tone of pre- and postglomerular arterioles, which are finely controlled by several vasoactive factors (12). In the present study, we explored main vasoactive factor mRNA levels (eNOS, prepro-endothelin-1 and its receptors, and AT<sub>1</sub> receptor), antioxidant enzymes (catalase, SOD1, and GPx), and proinflammatory molecules (TNF- $\alpha$  and IL-6). In support of our results, Woods et al. (63) have shown that maternal restriction induces a significant reduction in renal renin concentration and renal tissue angiotensin II levels in newborn pups. Thus, a consistent result in this study was that all

offspring from MPR groups exhibited a significant decrease in mRNA levels of most of the studied molecules. This could be explained by the theory of the “thrifty phenotype,” proposed by Hales and Barker (17), which has been demonstrated in human fetuses under malnutrition during pregnancy, where metabolic adaptations occur as a strategy to survive and save energy expenditure (43, 44). It is increasingly evident that the response to fetal malnutrition drives not only the selective preservation of essential organs for life but also induces advantageous metabolic adaptations for postnatal survival. Therefore, the thrifty phenotype is not only thrifty with respect to prenatal life but also in the efficient conservation of all nutritional and metabolic resources after birth. The poorly fed mother provides the fetus with a nutritional environment in which it will be born and will have to adapt to survive in the best way. This is a process that leads to postnatal metabolism adapted to survival in conditions where poor nutrition is in place. Similar observations have been made regarding exposure to cold. The offspring of sheep exposed to cold during pregnancy are, during delivery, better adapted to respond to adverse cold

Fig. 9. Signaling of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  in kidney tissue of offspring from control diet-fed mothers (CC group) or mothers with protein restriction during lactation (CR group), gestation (RC group), or both (RR group) after acute renal injury induced by ischemia-reperfusion (IR). HIF-1 $\alpha$  (A) and VEGF (B) mRNA levels are shown. Data are shown as means  $\pm$  SE of the percentage of change based on the control group (without ischemia);  $n =$  at least 5 rats/group. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  vs. control of each group;  $^{\epsilon}P < 0.05$  vs. the CC + IR group.



conditions after birth (4, 15). However, we cannot exclude the possibility that lesser mRNA levels of the molecules studied could result from the lesser number of nephrons observed in offspring from protein-restricted mothers.

Originally, we hypothesized that due to the known reduction in nephron number of offspring from protein-restricted mothers, there would be more susceptibility to a second challenge, such as kidney damage induced by IR. However, we observed the opposite; although the offspring of MPR groups presented renal dysfunction similar to the control group, the structural damage induced by IR was minor, particularly in the RC + IR and RR + IR groups compared with the CC + IR group. These results were also confirmed by lower proteinuria, lower levels of kidney injury biomarkers (urinary HSP72 and urinary KIM-1), and less inflammation (renal weight). These data suggest that PR during gestation has a deeper impact on kidney development and adaptation than those observed with PR during lactation.

Here, we propose that offspring from protein-restricted mothers during pregnancy or pregnancy and lactation are resilient compared with the control group. Resilience can be considered as the ability of an organism to adapt adequately after exposure to some adverse or stressful circumstances (2, 10). According to our results, a first explanation of the lower severity of AKI is that these animals had a better ability to recover RBF, which was not only evident in the direct measurement of RBF but also structurally. Therefore, after renal IR, there was a reduction in the glomerular tuft diameter in the CC + IR group, indicating glomerular vasoconstriction and renal hypoperfusion, an effect that was not observed in the experimental groups after 24 h of renal ischemia (Fig. 6). This faster recovery of RBF in the offspring of MPR groups makes an important difference, because renal perfusion and oxygenation play a central role in the installation and extent of AKI (7, 34, 40, 57, 69).

We explored some mechanisms that may influence the lower severity of AKI observed in the progeny of protein-restricted mothers. The ischemic injury in the control group (CC + IR group) was associated with a significant reduction in AT<sub>1</sub> receptor and ET<sub>B</sub> receptor mRNA levels compared with the control sham-operated group. In contrast, these effects were not observed in the offspring of MPR groups; instead, there was a significant increase in ET<sub>A</sub> receptor mRNA levels. This differential pattern, found in vasoactive molecule mRNA levels, promoted faster RBF recovery, which was different from the control group. However, studies of renal hemodynamics by micropuncture would be helpful for evaluating the afferent and efferent resistances and their contribution to RBF under these MPR conditions.

Acute renal injury induced by IR is characterized by a persistent state of hypoxia that contributes to the pathophysiological mechanisms of tubular and endothelial damage (3). The kidneys, and particularly the renal tubules, are highly demanding of oxygen, which makes them vulnerable to hypoxia (53). One of the cellular responses to hypoxia corresponds to the induction of HIF-1 $\alpha$ , which is a master transcription factor that, when activated by hypoxia, induces a variety of adaptive responses, including the expression of genes that control the release of oxygen, vascularization, and glucose metabolism (erythropoietin, VEGF, and glucose transporter 1, among others). These genes are in charge of restoring homeo-

stasis and stimulating erythropoiesis, angiogenesis, anaerobic glycolysis, and other reparative processes (3, 38, 50, 51, 56). Therefore, HIF-1 $\alpha$  induction has a key role during the repair process and has a protective effect in AKI (38, 56). In the present study, we explored HIF-1 $\alpha$  as one of the potential mechanisms responsible for the reduced AKI severity observed in the RC + IR and RR + IR groups. We found that HIF-1 $\alpha$  has a clear differential response to renal ischemia in the offspring of MPR groups compared with the control group (CC + IR group). In fact, there was a significant decrease in HIF-1 $\alpha$  mRNA levels in the CC + IR group, which was not observed in the RC + IR, CR + IR, and RR + IR groups. To confirm HIF-1 $\alpha$  signaling activation, we measured VEGF mRNA as one of its target genes and by its implication in AKI. The VEGF response matches with our results in HIF-1 $\alpha$ , since there was a significant decrease in VEGF in the CC + IR group that was not observed in the offspring of MPR groups. These results suggest that the enhanced HIF-1 $\alpha$  signaling after renal injury in the offspring of MPR groups might be another mechanism by which these groups were protected from ischemic injury. In support of this hypothesis, different studies have demonstrated that the increase in HIF-1 $\alpha$  levels confers renoprotection against ischemic AKI. HIF-1 $\alpha$  stabilization through inhibition of prolyl hydroxylases has shown an attenuation of renal damage induced by IR, associated with lower apoptosis, less infiltration of macrophages and vascular adhesion molecules, as well as an increase in the regulation of HIF target genes (23, 59, 64). Similar results were found in a model of renal damage induced by cisplatin (65). Conversely, when siRNA was used against HIF-1 $\alpha$  (13) or when HIF-1 and HIF-2 knockout mice were studied, the renal damage was exacerbated (18). In addition to this, it is also known that the activation of HIF during the reperfusion phase is a key factor in the regeneration of the proximal tubular epithelium, promoting the expression of tissue repair genes (13). Moreover, it was recently demonstrated that under hypoxia conditions, the activation of HIF-1 and inhibition of prolyl hydroxylase proteins can activate the forkhead box O3 transcription factor, conferring renal protection by modulating the oxidative stress response, autophagy, cell metabolism, apoptosis, and cell differentiation (29).

Reactive oxygen species play an important role in mediating renal IR injury (46, 54). SOD1 and GPx mRNA levels that protect against oxidative damage were decreased after renal IR, but the decrement in both enzymes was minor in the MPR groups. Thus, the antioxidant defense could be an additional factor to explain the lower renal damage in these groups.

Regarding IL-6 mRNA levels, there was a significant increase that occurred in all of the groups and without differences among them; however, for TNF- $\alpha$  mRNA levels, the increase was only significant in the RC and RR groups. This is an unexpected result, since these groups exhibited less renal damage; however, other inflammatory mediators might participate.

In summary, under basal conditions, MPR negatively impacts nephrogenesis, inducing a smaller number of nephrons at birth. The remaining nephrons compensatively respond through glomerular hyperfiltration that maintains kidney function. Another important finding of this study was the decrease in most of the mRNA levels studied, which suggests that MPR during pregnancy, lactation, or both induces a thrifty phenotype in the offspring.

After renal injury induced by IR, rats from the MPR groups, and particularly the RC + IR and RR + IR groups, had lower renal damage, which could be attributed to the early recovery of RBF. The cause of this response could not be elucidated, but the changes in the pattern of vasoactive mRNA compared with the control group could contribute to faster RBF recovery. These results open a new line of research for studying the multifactorial mechanisms that are involved in the differential response exhibited by offspring of protein-restricted mothers.

This study highlights the alterations that an adverse intrauterine environment can induce in the renal physiology of the offspring. Specifically, we show that MPR, during pregnancy and/or lactation, resulted in a reduction in nephron number in the offspring, which exhibited renal resilience, allowing an efficient response to an ischemic insult during adulthood. However, this response could be different in the long term, which merits further investigation.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dr. Mariela Contreras for aid with the animal care.

The results presented in this paper have not been previously published in whole or in part, except as an abstract presented at the American Society of Nephrology Kidney Week Meeting 2018 (San Diego, CA).

#### GRANTS

This work was supported by Mexican Council of Science and Technology (CONACyT) Grants A1-S-8715, 235855, and 272390 (to N. A. Bobadilla) and by National University of Mexico Grants IN223915, IN201619, and 00000000030015 (to N. A. Bobadilla). This study was performed in partial fulfillment of the requirements for the PhD degree of L. E. García-Ortuño, a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and was supported by a fellowship from the Programa de Apoyos para la Superación del Personal Académico de la UNAM-DGAPA.

#### DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

N.A.B. conceived and designed research; L.E.G.-O., J.B.-C., R.P.-V., J.A.O.-T., E.L.-B., I.L.-P., A.S.-N., and L.R.-C. performed experiments; L.E.G.-O., E.L.-B., and N.A.B. analyzed data; L.E.G.-O., J.A.O.-T., G.G., E.Z., and N.A.B. interpreted results of experiments; N.A.B. prepared figures; N.A.B. drafted manuscript; L.E.G.-O., G.G., E.Z., and N.A.B. edited and revised manuscript; L.E.G.-O., J.B.-C., R.P.-V., J.A.O.-T., E.L.-B., I.L.-P., A.S.-N., L.R.-C., G.G., E.Z., and N.A.B. approved final version of manuscript.

#### REFERENCES

1. Abdulmahdi W, Rabadi MM, Jules E, Marghani Y, Marji N, Leung J, Zhang F, Siani A, Siskind T, Vedovino K, Chowdhury N, Sekulic M, Ratliff BB. Kidney dysfunction in the low-birth weight murine adult: implications of oxidative stress. *Am J Physiol Renal Physiol* 315: F583–F594, 2018. doi:10.1152/ajprenal.00164.2018.
2. Aburn G, Gott M, Hoare K. What is resilience? An integrative review of the empirical literature. *J Adv Nurs* 72: 980–1000, 2016. doi:10.1111/jan.12888.
3. Andringa KK, Agarwal A. Role of hypoxia-inducible factors in acute kidney injury. *Nephron Clin Pract* 127: 70–74, 2014. doi:10.1159/000363669.
4. Bagby SP. Maternal nutrition, low nephron number, and hypertension in later life: pathways of nutritional programming. *J Nutr* 137: 1066–1072, 2007. doi:10.1093/jn/137.4.1066.
5. Barnett C, Nnoli O, Abdulmahdi W, Nesi L, Shen M, Zullo JA, Payne DL, Azar T, Dwivedi P, Syed K, Gromis J, Lipphardt M, Jules E, Maranda EL, Patel A, Rabadi MM, Ratliff BB. Low birth weight is associated with impaired murine kidney development and function. *Pediatr Res* 82: 340–348, 2017. doi:10.1038/pr.2017.53.
6. Barrera-Chimal J, Pérez-Villalva R, Cortés-González C, Ojeda-Cervantes M, Gamba G, Morales-Buenrostro LE, Bobadilla NA. Hsp72 is an early and sensitive biomarker to detect acute kidney injury. *EMBO Mol Med* 3: 5–20, 2011. doi:10.1002/emmm.201000105.
7. Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest* 121: 4210–4221, 2011. doi:10.1172/JCI45161.
8. Boubred F, Buffat C, Feuerstein JM, Daniel L, Tsimaratos M, Oliver C, Lelièvre-Pégorier M, Simeoni U. Effects of early postnatal hypernutrition on nephron number and long-term renal function and structure in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 293: F1944–F1949, 2007. doi:10.1152/ajprenal.00141.2007.
9. Boubred F, Daniel L, Buffat C, Tsimaratos M, Oliver C, Lelièvre-Pégorier M, Simeoni U. The magnitude of nephron number reduction mediates intrauterine growth-restriction-induced long term chronic renal disease in the rat. A comparative study in two experimental models. *J Transl Med* 14: 331, 2016. doi:10.1186/s12967-016-1086-3.
10. Bowes L, Jaffe SR. Biology, genes, and resilience: toward a multidisciplinary approach. *Trauma Violence Abuse* 14: 195–208, 2013. doi:10.1177/1524838013487807.
11. Brenner BM, Garcia DL, Anderson S. Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other? *Am J Hypertens* 1: 335–347, 1988. doi:10.1093/ajh/1.4.335.
12. Burke M, Pabbidi MR, Farley J, Roman RJ. Molecular mechanisms of renal blood flow autoregulation. *Curr Vasc Pharmacol* 12: 845–858, 2014. doi:10.2174/15701611113116660149.
13. Conde E, Alegre L, Blanco-Sánchez I, Sáenz-Morales D, Aguado-Fraile E, Ponte B, Ramos E, Sáiz A, Jiménez C, Ordoñez A, López-Cabrera M, del Peso L, de Landázuri MO, Liaño F, Selgas R, Sanchez-Tomero JA, García-Bermejo ML. Hypoxia inducible factor 1-alpha (HIF-1 alpha) is induced during reperfusion after renal ischemia and is critical for proximal tubule cell survival. *PLoS One* 7: e33258, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0033258.
14. Fagundes AT, Moura EG, Passos MC, Oliveira E, Toste FP, Bonomo IT, Trevenzoli IH, Garcia RM, Lisboa PC. Maternal low-protein diet during lactation programmes body composition and glucose homeostasis in the adult rat offspring. *Br J Nutr* 98: 922–928, 2007. doi:10.1017/S0007114507750924.
15. Godfrey KM, Forrester T, Barker DJ, Jackson AA, Landman JP, Hall JS, Cox V, Osmond C. Maternal nutritional status in pregnancy and blood pressure in childhood. *Br J Obstet Gynaecol* 101: 398–403, 1994. doi:10.1111/j.1471-0528.1994.tb11911.x.
16. Gross ML, Amann K, Ritz E. Nephron number and renal risk in hypertension and diabetes. *J Am Soc Nephrol* 16, Suppl 1: S27–S29, 2005. doi:10.1681/ASN.2004110967.
17. Hales CN, Barker DJ. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull* 60: 5–20, 2001. doi:10.1093/bmb/60.1.5.
18. Hill P, Shukla D, Tran MG, Aragonés J, Cook HT, Carmeliet P, Maxwell PH. Inhibition of hypoxia inducible factor hydroxylases protects against renal ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol* 19: 39–46, 2008. doi:10.1681/ASN.2006090998.
19. Hoy WE, Hughson MD, Bertram JF, Douglas-Denton R, Amann K. Nephron number, hypertension, renal disease, and renal failure. *J Am Soc Nephrol* 16: 2557–2564, 2005. doi:10.1681/ASN.2005020172.
20. Hughson MD, Puelles VG, Hoy WE, Douglas-Denton RN, Mott SA, Bertram JF. Hypertension, glomerular hypertrophy and nephrosclerosis: the effect of race. *Nephrol Dial Transplant* 29: 1399–1409, 2014. doi:10.1093/ndt/gft480.
21. Kanagasundaram NS. Pathophysiology of ischaemic acute kidney injury. *Ann Clin Biochem* 52: 193–205, 2015. doi:10.1177/0004563214556820.
22. Kanzaki G, Tsuboi N, Haruhara K, Koike K, Ogura M, Shimizu A, Yokoo T. Factors associated with a vicious cycle involving a low nephron number, hypertension and chronic kidney disease. *Hypertens Res* 38: 633–641, 2015. doi:10.1038/hr.2015.67.
23. Kapitsinou PP, Jaffe J, Michael M, Swan CE, Duffy KJ, Erickson-Miller CL, Haase VH. Preischemic targeting of HIF prolyl hydroxylation inhibits fibrosis associated with acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 302: F1172–F1179, 2012. doi:10.1152/ajprenal.00667.2011.
24. Kawazoe N, Eto T, Abe I, Takishita S, Ueno M, Kobayashi K, Uezono K, Muratani H, Kimura Y, Tomita Y, et al. Long-term prognosis of malignant hypertension; difference between underlying diseases such as essential hypertension and chronic glomerulonephritis. *Clin Nephrol* 29: 53–57, 1988.



25. Keller G, Zimmer G, Mall G, Ritz E, Amann K. Nephron number in patients with primary hypertension. *N Engl J Med* 348: 101–108, 2003. doi:10.1056/NEJMoa020549.
26. Kett MM, Denton KM. Renal programming: cause for concern? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300: R791–R803, 2011. doi:10.1152/ajpregu.00791.2010.
27. Lee SA, Noel S, Sadasivam M, Hamad ARA, Rabb H. Role of immune cells in acute kidney injury and repair. *Nephron* 137: 282–286, 2017. doi:10.1159/000477181.
28. Lewington AJ, Cerdá J, Mehta RL. Raising awareness of acute kidney injury: a global perspective of a silent killer. *Kidney Int* 84: 457–467, 2013. doi:10.1038/ki.2013.153.
29. Li L, Kang H, Zhang Q, D'Agati VD, Al-Awqati Q, Lin F. FoxO3 activation in hypoxic tubules prevents chronic kidney disease. *J Clin Invest* 129: 2374–2389, 2019. doi:10.1172/JCI122256.
30. Lima-Posada I, Portas-Cortés C, Pérez-Villalva R, Fontana F, Rodríguez-Romo R, Prieto R, Sánchez-Navarro A, Rodríguez-González GL, Gamba G, Zambrano E, Bobadilla NA. Gender differences in the acute kidney injury to chronic kidney disease transition. *Sci Rep* 7: 12270, 2017. doi:10.1038/s41598-017-09630-2.
31. Luyckx VA, Brenner BM. Birth weight, malnutrition and kidney-associated outcomes—a global concern. *Nat Rev Nephrol* 11: 135–149, 2015. doi:10.1038/nrneph.2014.251.
32. Luyckx VA, Brenner BM. The clinical importance of nephron mass. *J Am Soc Nephrol* 21: 898–910, 2010. doi:10.1681/ASN.2009121248.
33. Malek M, Nematbakhsh M. Renal ischemia/reperfusion injury: from pathophysiology to treatment. *J Renal Inj Prev* 4: 20–27, 2015.
34. Maringer K, Sims-Lucas S. The multifaceted role of the renal microvasculature during acute kidney injury. *Pediatr Nephrol* 31: 1231–1240, 2016. doi:10.1007/s00467-015-3231-2.
35. Mesquita FF, Gontijo JA, Boer PA. Expression of renin-angiotensin system signalling compounds in maternal protein-restricted rats: effect on renal sodium excretion and blood pressure. *Nephrol Dial Transplant* 25: 380–388, 2010. doi:10.1093/ndt/gfp505.
36. Mesquita FF, Gontijo JA, Boer PA. Maternal undernutrition and the offspring kidney: from fetal to adult life. *Braz J Med Biol Res* 43: 1010–1018, 2010. doi:10.1590/S0100-879X2010007500113.
37. Moretto VL, Ballen MO, Gonçalves TS, Kawashita NH, Stoppiglia LF, Veloso RV, Latorraca MQ, Martins MS, Gomes-da-Silva MH. Low-protein diet during lactation and maternal metabolism in rats. *ISRN Obstet Gynecol* 2011: 1, 2011. doi:10.5402/2011/876502.
38. Nangaku M, Rosenberger C, Heyman SN, Eckardt KU. Regulation of hypoxia-inducible factor in kidney disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 40: 148–157, 2013. doi:10.1111/1440-1681.12005.
39. Okamura DM, Pennathur S. The balance of powers: redox regulation of fibrogenic pathways in kidney injury. *Redox Biol* 6: 495–504, 2015. doi:10.1016/j.redox.2015.09.039.
40. Ou J, Ou Z, Ackerman AW, Oldham KT, Pritchard KA Jr. Inhibition of heat shock protein 90 (hsp90) in proliferating endothelial cells uncouples endothelial nitric oxide synthase activity. *Free Radic Biol Med* 34: 269–276, 2003. doi:10.1016/S0891-5849(02)01299-6.
41. Pérez-Rojas JM, Derive S, Blanco JA, Cruz C, Martínez de la Maza L, Gamba G, Bobadilla NA. Renocortical mRNA expression of vasoactive factors during spironolactone protective effect in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F1020–F1030, 2005. doi:10.1152/ajprenal.00166.2005.
42. Pires KM, Aguila MB, Mandarin-de-Lacerda CA. Early renal structure alteration in rat offspring from dams fed low protein diet. *Life Sci* 79: 2128–2134, 2006. doi:10.1016/j.lfs.2006.07.006.
43. Prentice AM. Nutrition and chronic disease: lessons from the developing and developed world. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser* 78: 155–160, 2014. doi:10.1159/000354957.
44. Prentice AM, Rayco-Solon P, Moore SE. Insights from the developing world: thrifty genotypes and thrifty phenotypes. *Proc Nutr Soc* 64: 153–161, 2005. doi:10.1079/PNS2005421.
45. Puelles VG, Hoy WE, Hughson MD, Diouf B, Douglas-Denton RN, Bertram JF. Glomerular number and size variability and risk for kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 20: 7–15, 2011. doi:10.1097/MNH.0b013e3283410a7d.
46. Ratliff BB, Abdulmahdi W, Pawar R, Wolin MS. Oxidant mechanisms in renal injury and disease. *Antioxid Redox Signal* 25: 119–146, 2016. doi:10.1089/ars.2016.6665.
47. Rewa O, Bagshaw SM. Acute kidney injury-epidemiology, outcomes and economics. *Nat Rev Nephrol* 10: 193–207, 2014. doi:10.1038/nrneph.2013.282.
48. Rodríguez-Romo R, Benítez K, Barrera-Chimal J, Pérez-Villalva R, Gómez A, Aguilar-León D, Rangel-Santiago JF, Huerta S, Gamba G, Uribe N, Bobadilla NA. AT1 receptor antagonism before ischemia prevents the transition of acute kidney injury to chronic kidney disease. *Kidney Int* 89: 363–373, 2016. doi:10.1038/ki.2015.320.
49. Sánchez-Pozos K, Barrera-Chimal J, Garzón-Muvidi J, Pérez-Villalva R, Rodríguez-Romo R, Cruz C, Gamba G, Bobadilla NA. Recovery from ischemic acute kidney injury by spironolactone administration. *Nephrol Dial Transplant* 27: 3160–3169, 2012. doi:10.1093/ndt/gfs014.
50. Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol (1985)* 88: 1474–1480, 2000. doi:10.1152/jappl.2000.88.4.1474.
51. Sethi K, Rao K, Bolton D, Patel O, Ischia J. Targeting HIF-1 $\alpha$  to prevent renal ischemia-reperfusion injury: does it work? *Int J Cell Biol* 2018: 1, 2018. doi:10.1155/2018/9852791.
52. Sharfuddin AA, Molitoris BA. Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol* 7: 189–200, 2011. doi:10.1038/nrneph.2011.16.
53. Shu S, Wang Y, Zheng M, Liu Z, Cai J, Tang C, Dong Z. Hypoxia and hypoxia-inducible factors in kidney injury and repair. *Cells* 8: 207, 2019. doi:10.3390/cells8030207.
54. Sureshbabu A, Ryter SW, Choi ME. Oxidative stress and autophagy: crucial modulators of kidney injury. *Redox Biol* 4: 208–214, 2015. doi:10.1016/j.redox.2015.01.001.
55. Sutton EF, Gilmore LA, Dunger DB, Heijmans BT, Hivert MF, Ling C, Martínez JA, Ozanne SE, Simmons RA, Szyf M, Waterland RA, Redman LM, Ravussin E. Developmental programming: state-of-the-science and future directions—Summary from a Pennington Biomedical symposium. *Obesity (Silver Spring)* 24: 1018–1026, 2016. doi:10.1002/oby.21487.
56. Tanaka S, Tanaka T, Nangaku M. Hypoxia and dysregulated angiogenesis in kidney disease. *Kidney Dis (Basel)* 1: 80–89, 2015. doi:10.1159/000381515.
57. Tögel F, Westenfelder C. Recent advances in the understanding of acute kidney injury. *F1000Prime Rep* 6: 83, 2014. doi:10.12703/P6-83.
58. Villar-Martini VC, Carvalho JJ, Neves MF, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Hypertension and kidney alterations in rat offspring from low protein pregnancies. *J Hypertens Suppl* 27, Suppl 6: S47–S51, 2009. doi:10.1097/01.hjh.0000358838.71675.5e.
59. Wang Z, Schley G, Türkoglu J, Burzloff N, Amann KU, Willam C, Eckardt KU, Bernhardt WM. The protective effect of prolyl-hydroxylase inhibition against renal ischaemia requires application prior to ischaemia but is superior to EPO treatment. *Nephrol Dial Transplant* 27: 929–936, 2012. doi:10.1093/ndt/gfr379.
60. Welham SJ, Wade A, Woolf AS. Protein restriction in pregnancy is associated with increased apoptosis of mesenchymal cells at the start of rat metanephrogenesis. *Kidney Int* 61: 1231–1242, 2002. doi:10.1046/j.1523-1755.2002.00264.x.
61. Wlodek ME, Westcott K, Siebel AL, Owens JA, Moritz KM. Growth restriction before or after birth reduces nephron number and increases blood pressure in male rats. *Kidney Int* 74: 187–195, 2008. doi:10.1038/ki.2008.153.
62. Wood-Bradley RJ, Barrant S, Giot A, Armitage JA. Understanding the role of maternal diet on kidney development; an opportunity to improve cardiovascular and renal health for future generations. *Nutrients* 7: 1881–1905, 2015. doi:10.3390/nu7031881.
63. Woods LL, Ingelfinger JR, Nyengaard JR, Rasch R. Maternal protein restriction suppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats. *Pediatr Res* 49: 460–467, 2001. doi:10.1203/00006450-200104000-00005.
64. Wu MJ, Wen MC, Chiu YT, Chiou YY, Shu KH, Tang MJ. Rapamycin attenuates unilateral ureteral obstruction-induced renal fibrosis. *Kidney Int* 69: 2029–2036, 2006. doi:10.1038/sj.ki.5000161.
65. Yang Y, Yu X, Zhang Y, Ding G, Zhu C, Huang S, Jia Z, Zhang A. Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibitor roxadustat (FG-4592) protects against cisplatin-induced acute kidney injury. *Clin Sci (Lond)* 132: 825–838, 2018. doi:10.1042/CS20171625.
66. Zambrano E, Martínez-Samayoá PM, Bautista CJ, Deás M, Guillén L, Rodríguez-González GL, Guzmán C, Larrea F, Nathanielsz PW. Sex differences in transgenerational alterations of growth and metabolism in progeny (F2) of female offspring (F1) of rats fed a low protein diet during pregnancy and lactation. *J Physiol* 566: 225–236, 2005. doi:10.1113/jphysiol.2005.086462.

67. **Zambrano E, Rodríguez-González GL, Guzmán C, García-Becerra R, Boeck L, Díaz L, Menjivar M, Larrea F, Nathanielsz PW.** A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. *J Physiol* 563: 275–284, 2005. doi:[10.1113/jphysiol.2004.078543](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.078543).
68. **Zeman FJ.** Effects of maternal protein restriction on the kidney of the newborn young of rats. *J Nutr* 94: 111–116, 1968. doi:[10.1093/jn/94.2.111](https://doi.org/10.1093/jn/94.2.111).
69. **Zuk A, Bonventre JV.** Acute kidney injury. *Annu Rev Med* 67: 293–307, 2016. doi:[10.1146/annurev-med-050214-013407](https://doi.org/10.1146/annurev-med-050214-013407).

