



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“El efecto del resveratrol en el daño renal por obesidad”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

CINTHYA GIOVANNA PORTAS CORTÉS

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. NORMA ARACELI BOBADILLA SANDOVAL

2019
Ciudad Universitaria, CDMX





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RECONOCIMIENTOS

El presente proyecto se realizó bajo la tutoría 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 el Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”. La investigación se efectuó en el periodo comprendido entre abril de 2015 a diciembre de 2016.

A los miembros del Jurado:

Dr. Jonatan Barrera Chimal	Instituto de Investigaciones Biomédicas
Dra. Elena Zambrano González	Departamento de Biología de la Reproducción del INCMNSZ
Dra. Norma Araceli Bobadilla Sandoval	Instituto de Investigaciones Biomédicas
Dra. Blanca Margarita Bazán Perkins	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
M. en C. Ixchel Quetzalitzli Lima Posada	Instituto de Investigaciones Biomédicas

El estudio fue apoyado financieramente por los proyectos de CONACyT: 235855, 235964, 181267, 272390 y por la DGAPA-PAPIIT-UNAM: IN223915 otorgados a la Dra. Norma Araceli Bobadilla Sandoval.

Durante mis estudios de Licenciatura y la realización de mi tesis recibí la beca y el nombramiento como Ayudante de Investigador Nacional Nivel III (Dra. Norma Araceli Bobadilla Sandoval, No. Expediente 7497) otorgado por el Sistema Nacional de Investigadores - CONACyT de mayo de 2015 a mayo de 2017 con el número de expediente 12354.

Agradezco la asesoría técnica de la Q.F.B. Rosalba Pérez Villalva durante la realización de este proyecto.

A la Dra. Elena Zambrano por las facilidades otorgadas a la realización de esta tesis, así como su confianza, apoyo y conocimientos.

Al Dr. Luis Reyes y a la Dra. Lilia Vargas por su colaboración en el desarrollo de este trabajo y sus valiosas aportaciones a este, gracias porque nunca se negaron a compartir su experiencia.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Norma Bobadilla, por permitirme pertenecer a su grupo de laboratorio y confiar en mí para el desarrollo de este trabajo, por las innumerables enseñanzas académicas y personales, por ser un gran ejemplo e inspiración para mí. Gracias.

A Ixchel Lima, gracias por la paciencia, los consejos, las enseñanzas, por las inyecciones de ánimo cuando lo necesitaba y por todo el apoyo.

A Rosy, por su valiosa colaboración, consejos, conocimiento y ayuda para el desarrollo de esta tesis.

A mis compañeros que integran el Departamento de Nefrología, Ixchel, Rosy, Jonatan, Andrea, Rodrigo, Luis, Vicky, Tino, Nathan, Roxana, Rafael, Arturo, Normita y Francesco, por brindarme sus valiosos consejos, por compartir sus conocimientos y experiencia, así como por ofrecerme un excelente ambiente de trabajo.

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme ser parte de ella y realizar uno de mis sueños.

A todos los que han contribuido a mi crecimiento personal y profesional.

A las ratitas, esos héroes anónimos sin los cuales la vida como la conocemos ahora no sería igual. GRACIAS.

A mis padres Sandra Cortés y Alejandro Portas, gracias por todas las enseñanzas que me han aportado a lo largo de mi vida, por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, por impulsarme a lograr mis objetivos y nunca dejarme vencer. Por su paciencia, por apoyar mis aciertos y comprender mis errores. Su fuerza y amor me han dirigido por la vida y me han dado las alas que necesitaba para volar. No podría tener mejores padres. Sin su apoyo esto no sería posible. Los amo.

A mis abuelos Lidia Alcaráz y Felipe Cortés, por quererme, cuidarme y apoyarme siempre, esto también se lo debo a ustedes.

A mis abuelos Ma. Eugenia Rubio (QEPD) y Bernardo Portas (QEPD), que sin saberlo me heredaron el gusto por la ciencia.

A mi familia por apoyarme, quererme, por estar siempre unidos y por todos esos momentos felices que hemos compartido a lo largo de la vida.

A mis amigos, por estar siempre conmigo compartiendo momentos felices y apoyándome en los complicados.

A Omar Verduzco, por creer en mí, por hacerme ver que el amor, la paciencia, la perseverancia y la mente, lo pueden todo. Por ser un ejemplo a seguir. Por las largas horas de plática y tus sabios consejos. Por ser mi fiel compañero en las buenas y en las malas, mi conciencia cuando lo necesito y mi apoyo incondicional, mi mejor amigo, mi cómplice, mi todo. Por todo eso y más, gracias. Te amo para siempre.

“En algún lugar, algo increíble está esperando ser conocido.”

Carl Sagan

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
El riñón	3
Las funciones del riñón	6
Enfermedad renal crónica	6
Fisiopatología de la enfermedad renal crónica	7
Obesidad	12
ERC por obesidad	14
Resveratrol	17
Resveratrol y ERC por obesidad	17
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
HIPÓTESIS	22
OBJETIVO GENERAL	23
OBJETIVOS PARTICULARES	23
MATERIAL Y MÉTODOS	24
Animales	24
Protocolo experimental	24
Resonancia magnética	26
Mediciones fisiológicas	27
Estudios histopatológicos	28
Análisis Bioquímicos	28
Análisis estadístico	30
RESULTADOS	31
DISCUSIÓN	42

CONCLUSIÓN	45
BIBLIOGRAFÍA	46
ARTÍCULO PUBLICADO	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. El glomérulo.

Figura 2. Componentes de la nefrona.

Figura 3. Protocolo experimental.

Figura 4. El aumento de peso de los animales al quinto mes de tratamiento es debido a un aumento en el peso de grasa.

Figura 5. La ingesta de una dieta alta en grasa genera un aumento en los niveles de proteinuria, efecto que fue revertido por el resveratrol.

Figura 6. Albuminuria al quinto mes de seguimiento.

Figura 7. Tensión arterial media y flujo sanguíneo renal.

Figura 8. Depuración de Creatinina (CrCl) y Aldosterona sérica.

Figura 9. El estrés oxidante se elevó en las ratas alimentadas con una dieta alta en grasa.

Figura 10. Imágenes representativas de cortes histológicos renales con tinción de PAS (Ácido periódico de Schiff).

Figura 11. Hipertrofia glomerular a los 5 meses de estudio.

Figura 12. La dilatación tubular.

Figura 13. La fibrosis túbulo intersticial.

LISTA DE ABREVIATURAS

ERC	Enfermedad renal crónica
FSR	Flujo sanguíneo renal
TAM	Tensión arterial media
TFG	Tasa de filtración glomerular
ROS	Especies reactivas de oxígeno
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
HIF-1α	Factor inducible por hipoxia
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
RAAS	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
AMPK	Proteína cinasa activada por AMP
ACAC	Acetil-CoA carboxilasa
MCP-1	Quimioatrayente de monocitos 1
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno-1
OMS	Organización Mundial de la Salud
IMC	Índice de masa corporal
PPAR-γ	Receptor proliferador de peroxisoma activado gamma
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
C/EBP-α	Proteína de unión al enhancer CCAAT alfa
(PGC)-1α	Coactivador 1-alfa de PPAR- γ
IL-6	Interleucina 6
IL-1β	Interleucina 1 beta
SIRT1	Sirtuina 1
DAG	Dieta alta en grasa
Res	Resveratrol

RESUMEN

Introducción: La enfermedad renal crónica ocupa el 17º lugar dentro de las causas de muerte a nivel mundial. Estudios epidemiológicos han demostrado la existencia de una asociación entre la obesidad y el desarrollo de enfermedad renal crónica. La obesidad aumenta la demanda metabólica renal y lleva a la expansión mesangial, ya que, un aumento de la grasa corporal central sin aumento en el número de nefronas requiere como adaptación el aumento del flujo sanguíneo renal y de la tasa de filtración glomerular, provocando cambios hemodinámicos, síndrome de hiperfiltración glomerular, hipertrofia glomerular, disminución de la densidad de podocitos y el aumento de la fracción de filtración; todos estos cambios pueden inducir proteinuria. El resveratrol es un polifenol que se encuentra principalmente en las uvas. Tiene propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas y antienvjecimiento. Se ha visto que la administración de resveratrol reduce el peso corporal ya que este polifenol es capaz de inhibir la adipogénesis y también es capaz de inducir la apoptosis de los adipocitos maduros. Estudios experimentales previos han mostrado que el resveratrol puede mejorar la función renal y las anormalidades histológicas renales, tales como: la albuminuria, la expansión mesangial, la acumulación de fibronectina glomerular e intersticial, así como la infiltración intersticial de macrófagos; además de sus efectos antioxidantes, como la eliminación directa de radicales o la modulación de enzimas antioxidantes, como el radical superóxido, los radicales hidroxilo, el peroxinitrito y la enzima superóxido dismutasa dependiente de manganeso. La obesidad ha estado en constante aumento a nivel mundial en los últimos años, siendo México uno de los países más afectados y considerando que la obesidad es un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad renal crónica, resulta eminente identificar nuevos blancos terapéuticos para reducir o evitar esta complicación. Por lo tanto, en este estudio se pretende evaluar a un compuesto con actividad antioxidante y antiinflamatoria sobre el daño renal inducido por obesidad.

Objetivo: Establecer si el tratamiento con resveratrol puede prevenir o evitar la progresión a enfermedad renal crónica causada por obesidad en ratas hembra

Métodos: Se estudiaron 18 ratas Wistar hembras divididas en los 3 siguientes grupos experimentales: 1.- Dieta control (n = 6), 2.- Dieta alta en grasa (n = 6), 3.- Dieta alta en grasa más resveratrol (n = 6). En estos dos últimos las ratas fueron alimentadas con una dieta alta en grasa desde los 21 días de nacidas, además, al grupo de dieta alta en grasa más resveratrol se le administró diariamente la dosis de resveratrol por vía oral (20 mg/kg) a partir de los 90 días de edad. Se registró diariamente el consumo de alimento y la ganancia de peso de todos los animales. Al cuarto y quinto mes de tratamiento con resveratrol, todos los animales fueron colocados en jaulas metabólicas con agua *ad libitum* para la recolección de orina de 24 h y se determinó la proteinuria en las muestras. También se determinó la albuminuria por la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS, el cual se tiñó con Azul de Coomassie para determinar la densidad de las bandas de albúmina por densitometría. Una vez concluidos los 5 meses de tratamiento se determinó la tensión arterial media y el flujo sanguíneo renal. Se realizaron las tinciones histológicas de PAS (Ácido periódico de Schiff) y rojo de Sirio para evaluar la hipertrofia glomerular, así como el grado de dilatación tubular. En los cortes histológicos teñidos con

rojo de Sirio se evaluó la fibrosis tubular. Finalmente se determinó la depuración de creatinina, los niveles de aldosterona sérica y los niveles urinarios de peróxido de hidrógeno como marcador de estrés oxidante.

Resultados y conclusiones: Se observó un incremento en el peso corporal en el grupo alimentado con una dieta alta en grasa con respecto al grupo control, mientras que el peso en el grupo alimentado con una dieta alta en grasa y administrado con resveratrol fue significativamente menor al grupo con dieta alta en grasa. Se observó un incremento en la proteinuria y en la albuminuria en el grupo alimentado con una dieta alta en grasa, mientras que el grupo administrado con resveratrol mantuvo niveles similares al grupo control. La tensión arterial media, el flujo sanguíneo renal, la depuración de creatinina y la aldosterona fueron constantes en los tres grupos. Se observó un incremento en los niveles urinarios de peróxido de hidrógeno en el grupo alimentado con una dieta alta en grasa con respecto al grupo control, mientras que con la administración de resveratrol este efecto fue revertido. Por último, se observó hipertrofia glomerular en el grupo alimentado con una dieta alta en grasa, sin embargo, el resveratrol mejoró de forma significativa las anormalidades glomerulares en los riñones de ratas obesas. La elaboración del presente proyecto permitió demostrar que las ratas hembra desarrollaron daño renal moderado debido a una ingesta alta en grasa, caracterizado por el aumento de la proteinuria, la albuminuria, hipertrofia glomerular y estrés oxidante, mientras que las ratas hembra administradas con resveratrol no desarrollaron daño renal. Asimismo, mostramos que la administración de resveratrol puede revertir el desarrollo del daño renal inducido por obesidad, disminuyendo la proteinuria, la albuminuria, el estrés oxidante y el daño estructural en el glomérulo. El mecanismo de protección de este polifenol está relacionado a sus propiedades antioxidantes, su capacidad para evitar la hiperfiltración glomerular ya que reduce la grasa corporal mediante sus propiedades antiadipogénicas y apoptóticas, y su capacidad de mantener la integridad estructural del glomérulo disminuyendo así la hipertrofia glomerular.

INTRODUCCIÓN

El riñón.

El riñón es un órgano importante del cuerpo, posee una estructura compleja adaptada a varias funciones biológicas esenciales, como la regulación de la presión arterial, el correcto mantenimiento del balance de iones y agua, así como el desecho de productos metabólicos tóxicos para el organismo. ¹

Los riñones de una persona filtran aproximadamente 190 litros de sangre de manera diaria, para eliminar alrededor de 2 litros de agua en forma de orina, lo que significa que, la tasa de filtración glomerular (TFG) es de 125 ml/min. ^{1,2} Para poder realizar esta función, los riñones reciben el 20-25% del gasto cardíaco. ³

La estructura renal tiene organizaciones morfológicas altamente diferenciadas que vienen determinadas por su función. Macroscópicamente, el riñón se puede dividir en tres secciones: la corteza, la médula y la pelvis renal que se conecta con el uréter. La médula se divide en interna y externa. La arteria renal penetra el riñón al lado del uréter, bifurcándose hasta formar la arteriola aferente que conduce a la formación del glomérulo. ^{4,5}

La unidad funcional del riñón es la nefrona. El riñón humano posee entre 800,000 a 1,200,000 nefronas, mientras que las ratas poseen 30,000 nefronas en cada riñón, éstas se encargan de filtrar la sangre para así mantener la homeostasis del cuerpo. ^{1,6,7}

La nefrona está subdividida en una unidad de filtración llamada corpúsculo renal o glomérulo y un compartimento de reabsorción tubular segmentado. El glomérulo está formado por cuatro diferentes tipos celulares: células endoteliales glomerulares, podocitos,

células mesangiales y células epiteliales parietales. La matriz extracelular que comparten las células endoteliales y los podocitos se denomina membrana basal glomerular. El endotelio fenestrado, la membrana basal glomerular y los poros hendidos entre los pedicelos de los podocitos constituyen las tres capas distintivas de la barrera de filtración glomerular entre la sangre y el espacio urinario. El mesangio proporciona un soporte al sistema vascular glomerular y las células epiteliales que forman la cápsula de Bowman. El filtrado urinario primario se colecta en la cápsula de Bowman, el penacho glomerular sólo permite el paso de moléculas menores a 7,000 Da, es decir, sólo el agua y algunos solutos son capaces de atravesar la barrera de filtrado, dejando atrás a las proteínas en el sistema circulatorio. El filtrado glomerular es ahora transportado a través de una serie de túbulos epiteliales conectados que inician desde el túbulo proximal, el asa de Henle, el túbulo distal y finalmente un túbulo colector (Figura 1 y 2). Los túbulos de las nefronas y el túbulo colector expresan varios canales iónicos y de agua, así como transportadores que ayudan a concentrar y ajustar la composición del filtrado urinario por reabsorción y secreción de compuestos químicos como iones de sodio, potasio, cloro, fósforo, calcio, magnesio y bicarbonato; también podemos encontrar glucosa, urea, aminoácidos y algunos péptidos como insulina y la hormona antidiurética. Todo este proceso, es vital para la conservación de fluidos, mantenimiento del balance electrolítico y la reabsorción de glucosa. ^{1, 2, 8} Los desechos y el agua en exceso se convierten en orina que se recolecta en el túbulo colector, posteriormente ésta fluye hacia la vejiga a través de unos conductos llamados uréteres. ²

Si los riñones no eliminan los desechos adecuadamente, éstos se acumulan en la sangre y dañan al cuerpo; de encontrarse proteínas mayores a 7,000 Da en la orina, se

presume que existe una alteración renal y que la barrera de filtrado no está cumpliendo su función.^{1,2}

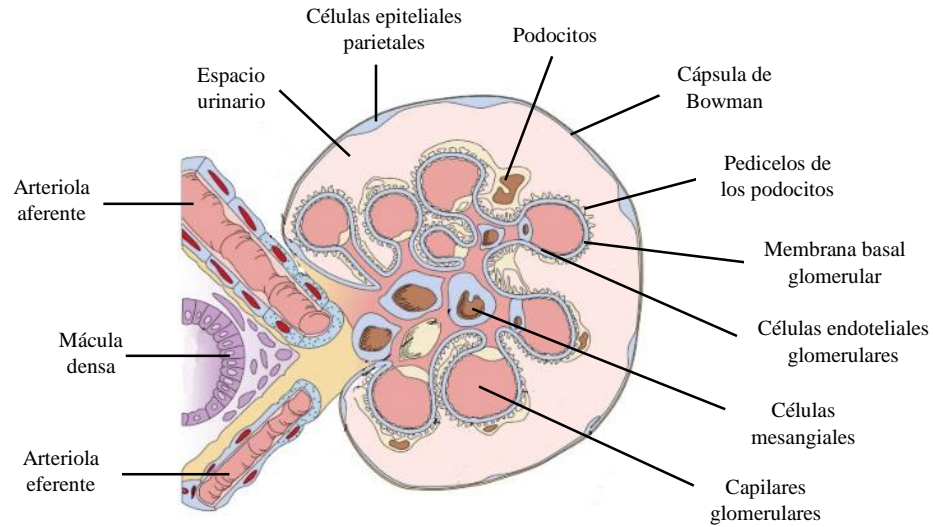


Figura 1. El glomérulo. Representación esquemática de un corte transversal de un glomérulo. Modificada de Skorecki, K. 2018.⁶

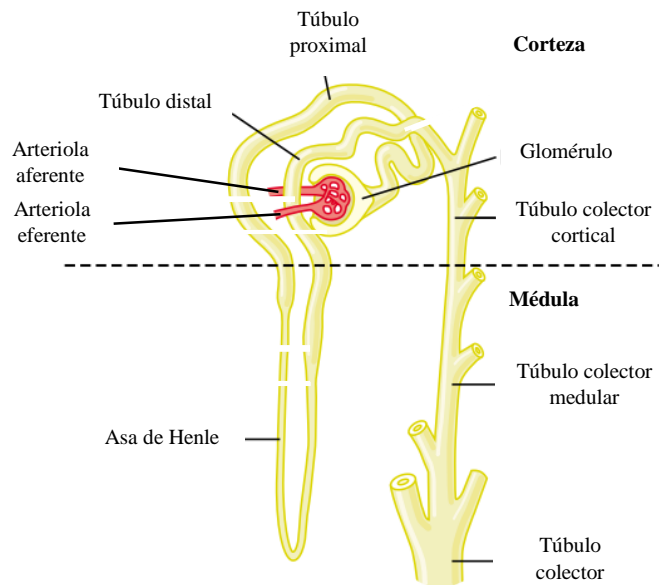


Figura 2. Componentes de la nefrona. Se muestra a la nefrona constituida por el glomérulo y los segmentos tubulares que se dividen en: túbulo proximal, asa de Henle, túbulo distal y túbulo colector. Modificada de Guyton, A. 2006.⁹

Las funciones del riñón.

Sus funciones son: **1.** Depurar de la sangre los productos de desecho generados por el organismo, como la urea, el ácido úrico y la creatinina, evitando la intoxicación por uremia. **2.** Excretar mediante la orina la misma cantidad de agua, sodio, cloro, potasio, calcio y magnesio que entran en el organismo, con la finalidad de mantener un balance electrolítico. **3.** Fabricar el bicarbonato que se destruye diariamente con la dieta. **4.** Fabricar las hormonas renales: eritropoyetina que estimula a la médula ósea para producir glóbulos rojos, renina que regula la presión arterial y el calcitriol 1,25-(OH) 2D3 (metabolito activo de la vitamina D) que ayuda a mantener el calcio para los huesos y para el equilibrio químico normal en el cuerpo. ^{1, 2, 7}

La función de los riñones se puede calcular mediante la determinación de los niveles de creatinina sérica y urinaria, y utilizando una fórmula para determinar la tasa de filtración glomerular estimada. ²

Enfermedad renal crónica.

La enfermedad renal crónica (ERC) es un problema de salud pública mundial, ocupa el 17° lugar dentro de las causas de muerte. La incidencia y la prevalencia están en un aumento constante generando altos costos para los sistemas de salud, que incluso la Organización Mundial para la Salud (OMS) ha proyectado que para el año 2020 será la 3° causa de mortalidad. Se prevé que la prevalencia de ERC en adultos de 30 años o más aumentará del 13.2% actual, al 14.4% en el 2020 y 16.7% en el 2030. Las causas más

comunes de insuficiencia renal son la diabetes tipo 2 y la hipertensión arterial, que en conjunto padecen el 60% de los pacientes con enfermedad renal crónica terminal. ^{7, 10, 11, 12}

La ERC se define como la presencia de daño renal estructural y la pérdida progresiva de la función renal siendo la TFG normal de alrededor de 125 ml/min y que en condiciones de daño renal va disminuyendo (60 a 90 ml/min) y puede llegar a la pérdida total de la función renal, lo que se conoce como enfermedad renal crónica terminal, independientemente de la etiología subyacente.

Las guías de la Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) se refieren a la ERC como todo el espectro de la enfermedad que ocurre después del inicio del daño renal. La evidencia del daño estructural puede derivar de un estudio histológico, imagenológico o de las alteraciones persistentes en el examen de orina por un plazo superior a 3 meses, particularmente por la presencia de albuminuria. Una reducción en la TFG menor a 60 ml/min corresponde a una ERC, sin requerir evidencia adicional de daño renal estructural. ¹⁰

La National Kidney Foundation recomienda tres pruebas rutinarias para detectar esta enfermedad, que son: una medición de la presión arterial, una comprobación rápida de proteína o albúmina en la orina y el cálculo de la TFG con base en una medición de creatinina en suero. ²

Fisiopatología de la enfermedad renal crónica.

La fisiopatología es multifactorial y las vías moleculares que se relacionan con el inicio y la progresión constituyen una rara y compleja red de reguladores redundantes. La evolución de la enfermedad es el resultado de la pérdida progresiva de nefronas, a

consecuencia de cambios hemodinámicos compensatorios a nivel glomerular. Se presentan también hipertensión e hiperfiltración glomerular de las nefronas remanentes, hipertrofia y atrofia tubular, fibrosis túbulointersticial, esclerosis glomerular progresiva, arterioesclerosis y respuestas humorales desordenadas. Todo lo anterior, conlleva a la fibrosis del parénquima renal con la pérdida definitiva de la función renal. ^{10, 13, 14, 15, 16}

El proceso que da lugar a la progresión hacia la ERC en general, inicia por diversas respuestas celulares y moleculares en respuesta al daño inicial, las cuales se generan con el fin de mantener la homeostasis, pero en lugar de lograrlo, estas respuestas celulares terminan dañando a las nefronas funcionales. Los fenómenos compensatorios que ejercen las nefronas remanentes debido a la pérdida de otras nefronas, exacerbaban la fisiopatología glomerular. La liberación de un gran número de moléculas biológicamente activas en el túbulointersticio generan inflamación y desdiferenciación de las células epiteliales. Los requerimientos energéticos por el hiperfuncionamiento de las nefronas remanentes exceden los sustratos metabólicos disponibles y aunado a un inadecuado balance vascular, promueven la hipoxia/isquemia con una consecuente acidosis y generación de especies reactivas de oxígeno. ^{17, 18, 19, 20, 21}

La progresión de la ERC se da a través de tres fases: **1.-** Un estímulo de daño inicial, **2.-** Mecanismos de reparación desregulados y empeoramiento de la función de las nefronas, **3.-** Respuesta de las nefronas remanentes, generando mecanismos compensatorios por la pérdida de otras nefronas, lo que las lleva a realizar cambios en su actividad normal que pueden ser deletéreos para la supervivencia de las nefronas funcionales. ²²

En la etapa inicial de la pérdida de las nefronas, las nefronas remanentes se hipertrofian con el fin de mantener la tasa de filtración glomerular: la superficie capilar del glomérulo aumenta para suplir esta demanda, pero los podocitos diferenciados no pueden proliferar para cubrir este incremento en el área, por lo tanto se hipertrofian y si esta respuesta es insuficiente, el glomérulo tendrá áreas desnudas de esta cubierta. Sin embargo, en cierto punto se alcanza el límite de su ajuste y como muchas nefronas se pierden, la TFG comienza a disminuir. Ya que la homeostasis del riñón se gobierna a nivel de las nefronas, pueden comenzar a existir desbalances de iones, por ejemplo, retención de sodio y consecuentemente aumento del volumen extracelular. Ante esta retención se requiere una mayor excreción de sodio, por lo que se activan hormonas que tratan de regularla, en este caso, la habilidad de los mecanismos compensatorios puede permanecer hasta que el 90% de las nefronas hayan sido perdidas. Esto no sucede con otros iones como los fosfatos o el calcio, los cuales a nivel plasmático aumentan y disminuyen, respectivamente, cuando las nefronas se pierden. Las variaciones encienden una serie de mecanismos que median el incremento de la hormona paratiroidea y de la secreción del factor de crecimiento de fibroblastos 23 (FGF-23), que a su vez incrementan la secreción de fosfatos para normalizar los niveles plasmáticos de fosfatos y calcio. Este nuevo estado se alcanza hasta que el túbulo llega al máximo de respuesta y dichas hormonas siguen aumentando en un vano intento de compensar las deficiencias, lo cual afecta de manera sistémica, por ejemplo en la reabsorción ósea y afectando a otros órganos.²³

Un mediador principal en la respuesta hipertrófica es el Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (RAAS) que puede regular tanto la hemodinámica, como la hipertrofia/hiperplasia celular. El incremento de la actividad de RAAS estimula diversas vías

que median la hipertrofia, la producción de citocinas fibrogénicas y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), adicional a ello, el daño inflamatorio y glomerular puede causar daño tubular. La angiotensina II (Ang II) tiene un papel clave en la progresión de la enfermedad renal, ya que participa en los cambios hemodinámicos glomerulares y en los cambios de permeabilidad de la barrera de filtración glomerular contribuyendo a incrementar la proteinuria. Se ha propuesto que la filtración glomerular de proteínas plasmáticas causa daño túbulointersticial, ya que pueden ser moléculas activas oxidantes o inflamatorias. Las vías comunes que generan hipertrofia de la nefrona son: respuestas celulares al daño y eventos bioquímicos que participan en la progresión de la pérdida de las nefronas.^{17, 24, 25, 26}

Cuando existe un estímulo estresante, las células epiteliales se desdiferencian a través de un proceso llamado transición epitelio mesénquima. Estas células muestran características de proliferación, migración y producción de citocinas. Esta puede ser una respuesta contraproducente para la reparación del daño, ya que puede estar contribuyendo a la fibrosis del parénquima renal al estar reclutando otras células fibrogénicas, o estar produciendo proteínas de matriz extracelular. Citocinas como el TGF- β , el FGF, el PDGF, angiotensina II, endotelina, entre otras, tienen papeles potenciales en las vías que se encienden en la transición epitelio mesénquima.^{22, 27}

La inflamación juega un papel central en la progresión a ERC. Se ha propuesto que el epitelio tubular del riñón puede generar moléculas proinflamatorias como TNF- α , IL-6, IL-1 β , y TGF- β , que se concentran de manera local promoviendo la inflamación. Los macrófagos que junto con las células dendríticas que están presentes de manera normal en el riñón pueden estar participando en la señalización inflamatoria, siendo reclutados por quimioatrayentes al túbulo dañado.^{20, 21, 28, 29}

El deterioro de la microcirculación renal contribuye potencialmente a la progresión de ERC. Las células endoteliales sufren apoptosis en respuesta a la pobre perfusión, lo cual genera rarefacción vascular, evento central en la pérdida de nefronas. Existe una función endotelial desregulada y un decremento en la angiogénesis, por lo que se generan factores angiogénicos que también pueden ser contraproducentes al actuar como citocinas inductoras de respuestas profibróticas y proinflamatorias. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), por ejemplo, puede promover inflamación y fibrogénesis; la proteína endostatina es antiangiogénica y se ha reportado que niveles altos de ésta correlacionan con el aumento en la tasa de progresión a ERC. Los niveles plasmáticos de la dimetilarginina asimétrica (ADMA), que es un inhibidor de la sintasa de óxido nítrico, también se correlacionan con la severidad de la progresión del daño renal.^{22, 30}

El riñón consume grandes cantidades de ATP con el fin de proveer la energía necesaria para el transporte de sales, ácidos orgánicos y otros constituyentes plasmáticos, este ATP es generado por el metabolismo aerobio. Al disminuir el flujo sanguíneo renal, ocurre un desplazamiento hacia el metabolismo anaerobio para suplir los requerimientos de ATP, lo que genera diversas vías que influyen la pérdida de más nefronas.^{22, 31}

Otro factor importante en el progreso de la enfermedad es el factor inducible por hipoxia (HIF), el cual tiene acciones angiogénicas que pueden ser protectoras en el daño agudo, sin embargo, sus acciones crónicas pueden ser deletéreas, ya que interviene en el desarrollo del fenotipo fibrótico de las células epiteliales de manera directa o indirecta, así como en la activación de los genes de colágeno estimulados por TGF- β aún en ausencia de hipoxia.^{32, 33}

El estrés oxidativo resulta de un desequilibrio entre los compuestos antioxidantes y la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que puede dañar de manera irreversible los componentes celulares. La formación excesiva de radicales libres resultado de los procesos fisiopatológicos ocasionan la destrucción de las macromoléculas de la célula (ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos y proteínas) induciendo una disminución en la resistencia al ambiente y un incremento en la fragilidad celular. Uno de los mecanismos mediante los cuales la hipoxia genera ERC es la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), que se presentan en 3 formas inestables: el radical hidroxilo, el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno, las cuales juegan un papel importante en la transducción de señales que desembocan en hipertrofia, alteración de las interacciones proteína-proteína, inflamación, proliferación, entre otros procesos deletéreos.³⁴

Obesidad.

La obesidad se ha convertido rápidamente en un problema de salud pública alrededor del mundo, generando altos costos para los sistemas de salud. Según la OMS, más de 1.9 billones de personas adultas en todo el mundo tienen sobrepeso, de los que, 600 millones de nuevos casos de obesidad se detectaron en el 2014; en México el 32.1% de la población es obesa. La obesidad tiene una etiología multifactorial, cuya causa principal es el desequilibrio energético, ya que se consumen más calorías que las que se gastan, por ende, la obesidad se define como la acumulación excesiva de grasa corporal que puede perjudicar la salud. El índice de masa corporal (IMC) es utilizado para clasificar el sobrepeso y la obesidad, que se calcula dividiendo los kilogramos de peso por el cuadrado de la estatura en metros de una persona (kg/m^2). La OMS considera un IMC

entre 20 - 25 kg/m² como peso normal, un IMC entre 25 - 30 kg/m² como sobrepeso y un IMC de 30 kg/m² o mayor como obesidad.^{35, 36}

El desequilibrio crónico de calorías causa un aumento en el almacenaje de triglicéridos en el adipocito. El incremento de la masa del tejido adiposo se caracteriza por cambios en las propiedades celulares de los adipocitos, como el aumento de lípidos intracelulares, el incremento en el tamaño del adipocito (hipertrofia) y el incremento del número de adipocitos (hiperplasia) mediante la adipogénesis.³⁷

En la hiperplasia aumenta el número de preadipocitos y éstos se diferencian a adipocitos maduros por la secreción de adipocinas. Los factores de transcripción que influyen en la diferenciación de los preadipocitos son: el receptor proliferador de peroxisoma activado gamma (PPAR- γ) y la proteína de unión al enhancer CCAAT alfa (C/EBP- α).^{38, 39}

El exceso de almacenamiento de lípidos parece causar alteraciones funcionales del retículo endoplasmático (RE) y la mitocondria. En estados de desequilibrio energético y adiposidad, hay una excesiva demanda en el RE que provoca disfunción del plegamiento de proteínas, creación de gotas de lípidos y detección de colesterol. Las manifestaciones de estrés del RE en el adipocito incluyen el incremento en las concentraciones de lactato y la producción de la proteína homóloga C/EBP (CHOP). Además de los efectos en el RE, la obesidad se ha asociado con el estrés oxidativo a nivel de la mitocondria. En estados de adiposidad, el procesamiento del exceso de ácidos grasos libres por la mitocondria produce desacoplamiento mitocondrial y liberación de ROS.⁴⁰

Los mediadores sistémicos de la disfunción del adipocito incluyen a las adipocinas, los ácidos grasos libres y los mediadores inflamatorios. Las adipocinas son moléculas

circulantes producidas por los adipocitos, son centrales en la fisiopatología de la obesidad, éstas incluyen a la adiponectina, la leptina, la resistina y la grelina. Además de sus efectos en el uso de la energía, las adipocinas tienen influencia en la producción de mediadores inflamatorios. Por ejemplo, la adiponectina inhibe la síntesis y acción de $\text{TNF}\alpha$, que a su vez afecta negativamente la transcripción de adiponectina. La leptina aumenta la síntesis de interleucina 6 (IL-6) y $\text{TNF}\alpha$ en los macrófagos que también los activa.³⁸

ERC por obesidad.

Estudios epidemiológicos han demostrado la existencia de una asociación entre la obesidad y la ERC.⁴¹ De tal forma que, la obesidad es un factor de riesgo importante e independiente para el desarrollo y progresión de la enfermedad renal crónica.^{42, 43, 44} Además, la ERC causada por la obesidad puede ser independiente de la diabetes y la hipertensión.^{45, 46}

Se han propuesto varios mecanismos por los cuales se ha relacionado a la obesidad con la ERC. La obesidad aumenta la demanda metabólica renal y lleva a la expansión mesangial, ya que, un aumento de la grasa corporal central sin aumento en el número de nefronas, requiere como adaptación un aumento del flujo sanguíneo renal y de la tasa de filtración glomerular, provocando cambios hemodinámicos, síndrome de hiperfiltración glomerular, hipertrofia glomerular, disminución de la densidad de podocitos y el aumento de la fracción de filtración; todos estos cambios pueden inducir que haya proteínas de forma anormal en la orina (proteinuria).^{47, 48, 49}

Esta secuencia de eventos desencadena una cascada de cambios intrarenales y neurohormonales que causan un deterioro en la natriuresis renal, un aumento en la

reabsorción de sodio en las nefronas y que, a su vez, conduce a la compensación renal por vasodilatación y aumento de la TFG, provocando un síndrome de hiperfiltración glomerular. La lesión renal y la pérdida de nefronas ocurren en asociación con una prolongada hiperfiltración, y, en algunos casos, con la propia hipertensión inducida por la obesidad. La hiperfiltración glomerular que se produce después de un aumento de peso eventualmente disminuye y es sustituida por una disminución gradual de la tasa de filtración glomerular. La activación de TGF- β , del Sistema Nervioso Simpático (SNS) y del Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona, y la compresión física de la médula renal por parte del aumento de la adiposidad visceral, pueden contribuir a la hipertensión, que junto con la alteración de la hemodinámica intrarenal, la alteración histológica renal, los trastornos metabólicos (por ejemplo hiperlipidemia e intolerancia a la glucosa), la hiperfiltración glomerular y la inflamación, causan lesión glomerular, glomeruloesclerosis y pérdida progresiva de nefronas.

50, 51

La obesidad puede contribuir al desarrollo de la hiperlipidemia, es decir, cuando hay demasiados lípidos en la sangre como el colesterol y los triglicéridos; esto se da por la ingesta excesiva de una dieta alta en grasa. La obesidad promueve alteraciones en las hormonas derivadas de adipocitos, como baja adiponectina y altos niveles de leptina. La adiponectina es un importante regulador de la albuminuria, mientras que un alto nivel de leptina causa proteinuria, glomeruloesclerosis y promueve la fibrosis renal, así como estrés oxidante.^{49, 52}

El exceso de energía asociado al aumento de ácidos grasos libres y la reducción de adiponectina, reduce la actividad de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK), aumentando así la actividad de acetil-CoA carboxilasa (ACAC). Por lo anterior, se produce una reducción de la oxidación de ácidos grasos y un aumento de la síntesis de éstos, que

promueven una situación de toxicidad lipídica y estrés energético, y que fomentan el desarrollo de la ERC.⁵³

A menudo en la obesidad ocurre una deposición ectópica de lípidos en los tejidos no adiposos, como puede ser el riñón, estudios previos han encontrado que esta acumulación excesiva se produce en las células de los túbulos proximales, en los podocitos y en las células mesangiales.⁵³ Esta deposición excesiva conduce a la acumulación de metabolitos tóxicos, como diglicéridos y ceramidas, derivados del metabolismo de las grasas, de los ácidos grasos y de esfingolípidos.⁵⁴ Además, estos metabolitos pueden conducir a la disfunción mitocondrial, estrés del retículo endoplasmático, apoptosis, y eventualmente, lesión y disfunción renal.⁵⁰

El tejido adiposo secreta angiotensinógeno y enzima convertidora de angiotensina (ECA), éstos pueden actuar sobre el endotelio y músculo liso vascular, provocando vasoconstricción y efectos proinflamatorios vasculares a través de la expresión endotelial de VCAM-1, ICAM-1 y MCP-1. La angiotensina II contrae a las arteriolas eferentes, que no sólo contribuye al aumento de la reabsorción capilar peritubular y por consiguiente a la reabsorción de sodio tubular, si no también, aumenta la presión hidrostática glomerular. La activación de RAAS puede contribuir a la lesión glomerular, observada en la obesidad, por exacerbar la creciente presión glomerular.⁵⁰

Resveratrol.

El resveratrol es un polifenol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) que se produce naturalmente en muchas plantas como las uvas, las bayas, y la cáscara de cacahuete. Tiene propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas y antienvjecimiento. ⁵⁵

La sirtuina 1 (SIRT1) es un importante regulador de procesos celulares, ya que tiene efectos citoprotectores a través de múltiples mecanismos, tales como antiapoptosis, antioxidantes y antiinflamatorios, también regula la biogénesis mitocondrial, la autofagia, el metabolismo en respuesta a la energía celular y el estado redox mediante la desacetilación de muchos sustratos. ⁵⁶

Así mismo, se ha demostrado que el resveratrol es un activador de SIRT1 mediante varios mecanismos. Aunque originalmente se pensaba que el resveratrol activaba directamente a SIRT1 a través de un efecto alostérico, ahora se sabe que se requiere de la AMPK para su activación. ⁵⁷

Resveratrol y ERC por obesidad.

El resveratrol puede reducir la lesión renal, incluyendo la nefropatía diabética, lesión renal inducida por fármacos, lesión renal inducida por la aldosterona, lesión por isquemia/reperfusión, lesión renal inducida por la sepsis y el riñón obstruido, a través de sus efectos antioxidantes y la activación de SIRT1. ^{58, 59}

La adipogénesis, la apoptosis, la lipogénesis, la lipólisis y la oxidación de ácidos grasos se han descrito en la literatura como mecanismos blancos de este polifenol. ⁶⁰

Estudios experimentales previos llevados a cabo en modelos animales de diabetes han demostrado que el resveratrol puede mejorar la función renal, las anomalías histológicas renales, tales como expansión mesangial, acumulación de fibronectina glomerular e intersticial, la infiltración intersticial de macrófagos, así como promover una reducción en la albuminuria. Además posee un efecto antioxidante mediado por la eliminación directa de radicales libres como: el superóxido, los radicales hidroxilo y el peroxinitrito o bien por la modulación de la expresión y actividad de las enzimas antioxidantes como: la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (Mn-SOD). Al interactuar con el radical libre, el compuesto antioxidante cede un electrón, éste se oxida y se transforma en una molécula menos reactiva. ^{61,62}

Se ha mostrado que el resveratrol previene la nefropatía diabética en ratones *db/db* por la fosforilación de AMPK y la señalización de SIRT1-coactivador 1-alfa del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (PGC)-1 α , que parecen prevenir la apoptosis relacionada con la lipotoxicidad y el estrés oxidativo en el riñón. ⁶³

También se ha reportado que el tratamiento con resveratrol atenúa la hipertrofia renal y la excreción urinaria de albúmina en la fase inicial de la diabetes en ratas diabéticas inducidas por streptozotocina (STZ), sin afectar los niveles de glucosa en la sangre. ⁵⁸

De igual forma se ha visto que la administración de resveratrol en ratas diabéticas por STZ, disminuye la expresión del factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1). ⁶⁴

Se ha visto que la administración de resveratrol reduce el peso corporal, ya que este polifenol es capaz de inhibir la adipogénesis, proceso por el que los preadipocitos se

transforman en adipocitos maduros y también es capaz de inducir la apoptosis de éstos últimos.

El resveratrol inhibe a C/EBP β , el factor regulador temprano de la adipogénesis. Además, la expresión de C/EBP α y PPAR γ , requerida para inducir cambios en la forma celular desde una forma fibroblástica a una forma esférica, también se reduce por este polifenol mediada por SIRT1.⁶⁰

El resveratrol fosforila a la proteína cinasa activada por AMP y, una vez activada, AMPK inhibe a la acetil-CoA carboxilasa (ACAC) mejorando la oxidación de ácidos grasos y disminuyendo la síntesis lipídica.⁶⁵

La apoptosis es un proceso de muerte celular programada, inherente a la mayoría de las células nucleadas, que se activa cuando se les priva de factores esenciales de supervivencia; puede ser inducida por ciertos tipos de estrés celular o por la inducción de ligandos inductores de muerte específicos. Este proceso está mediado por caspasas, que pueden clasificarse como caspasas iniciadoras (caspasa 8 y 9) y caspasas efectoras (caspasa 3 y 7). Se ha propuesto que el tratamiento con resveratrol incrementa a la proteína caspasa 3 independientemente de SIRT1, induciendo la apoptosis de los preadipocitos.⁶⁶ También se ha encontrado que el efecto apoptótico del resveratrol en los adipocitos maduros se da por la modulación de la vía de Akt.⁶⁷

Recientemente se demostró que el resveratrol incrementa sinérgicamente la apoptosis inducida por el ligando inductor de apoptosis (TRAIL) de los adipocitos humanos y que este efecto es independiente de SIRT1.⁶⁸

El resveratrol reduce la expresión de TNF α , interleucina 6 (IL-6) y ciclooxigenasa 2 (COX-2), que son mediadores clave de la respuesta inflamatoria. También inhibe la señalización de NF- κ B activada por TNF- α , reduciendo así, la expresión de citocinas proinflamatorias.⁶⁹

Estudios *in vitro* han demostrado que el resveratrol reduce la expresión génica de las adipocinas proinflamatorias IL-6, IL-8, la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) y el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1), estimulada por IL-1 β en adipocitos, además aumenta la expresión génica de adiponectina e inhibe la secreción de leptina en éstos.^{70, 71, 72}

La activación de SIRT1 desacetila, además, al coactivador 1-alfa del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (PGC-1 α) en regiones promotoras para inducir la expresión de genes implicados en la biogénesis mitocondrial y la oxidación de ácidos grasos.⁷³

Los podocitos son células epiteliales altamente diferenciadas que componen a la barrera de filtración glomerular, el daño de estos podocitos contribuye a la presencia de proteinuria; las proteínas que conforman a los podocitos como la nefrina y podocina son críticas para mantener su integridad estructural. Se han hecho estudios experimentales donde el tratamiento con resveratrol modula la expresión de la nefrina y podocina en modelos animales de obesidad por la ingesta de una dieta alta en grasa.⁷⁴

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La ERC ocupa el 17° lugar dentro de las causas de muerte a nivel mundial. Existe una gran preocupación por los sistemas de salud por la alta incidencia de esta enfermedad, que incluso la Organización Mundial para la Salud ha proyectado que para el año 2020 será la 3° causa de mortalidad. Aunado a esto, la obesidad ha estado en constante aumento a nivel mundial en los últimos años, siendo México uno de los países más afectados y considerando que la obesidad es un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad renal crónica, resulta eminente identificar nuevos blancos terapéuticos para reducir o evitar esta complicación. Por lo tanto, en este estudio se pretende evaluar a un compuesto con actividad antioxidante y antiinflamatoria sobre el daño renal inducido por obesidad.

HIPÓTESIS

El tratamiento con resveratrol reduce o evita la enfermedad renal crónica causada por la obesidad, debido a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y su papel en la adipogénesis.

OBJETIVO GENERAL

Establecer si el tratamiento con resveratrol puede reducir o evitar la progresión a enfermedad renal crónica causada por obesidad en ratas hembra.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar la severidad de la ERC inducida por obesidad mediante la determinación de los niveles de proteinuria, albuminuria, depuración de creatinina, aldosterona sérica, así como los niveles urinarios de peróxido de hidrógeno como marcador de estrés oxidante y el daño histológico renal.
2. Determinar si la administración de resveratrol puede reducir o evitar el desarrollo de alteraciones funcionales y estructurales observadas en la ERC por obesidad.
3. Evaluar los posibles mecanismos de la renoprotección conferida por el resveratrol en la prevención de la progresión a ERC.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratas Wistar hembra, las cuales fueron provistas por el bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ). Los animales se mantuvieron en cajas hasta su sacrificio en un ciclo de luz-obscuridad 12:12 h, con acceso libre al alimento y al agua. El protocolo se condujo con la autorización del Comité de Ética del Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) del INCMNSZ.

Protocolo experimental

Se incluyeron 18 ratas Wistar hembra. Las ratas se dividieron en los tres siguientes grupos experimentales: **1.-** Control (n=6), alimentados con dieta chow (Rodent Lab Chow 5001). **2.-** Animales alimentados con una dieta alta en grasa desde los 21 días de nacidas (n=6). **3.-** Ratas alimentadas con una dieta alta en grasa desde los 21 días de nacidas y que a partir de los 90 días de edad recibieron simultáneamente resveratrol 20 mg/kg de manera diaria durante cinco meses (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (n=6). El resveratrol fue disuelto en una solución acuosa de carboximetilcelulosa 0.5%. Los animales se estudiaron y sacrificaron al quinto mes de tratamiento. (Figura 3).

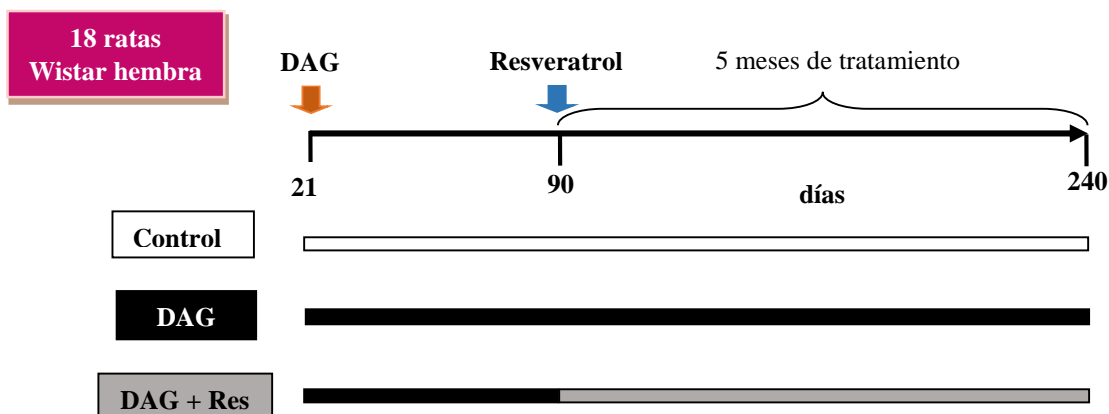


Figura 3. Protocolo experimental. La flecha roja indica el tiempo en que empezó la administración de la dieta alta en grasa y la flecha azul indica el tiempo en donde se empezó a administrar el resveratrol (20 mg/kg). Control n=6, dieta alta en grasa (DAG) n=6 y dieta alta en grasa más resveratrol (DAG + Res) n=6.

Dietas

La dieta control consistió en alimento comercial Rodent Lab Chow 5001®, formulada para mantenimiento de roedores convencionales conteniendo 5% (p/p) de grasa y un contenido energético de 4 Kcal/g. Mientras que la dieta alta en grasa fue elaborada en la planta piloto del Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (DCyTA) del INCMNSZ, cuyo contenido de grasa fue del 25% (p/p) y el energético de 5 Kcal/g, con una formulación diseñada con base a la recomendación AIN-93 del American Institute of Nutrition así como, modificaciones hechas a ésta por la Dra. Elena Zambrano y colaboradores. Para su elaboración se utilizó una batidora de paletas MaGnum modelo KB-503 de 20 L de capacidad, potencia de 1.10W, 1/4 HP y 425 rpm (Tabla 1).^{75, 76}

Tabla 1. Composición de las dietas usadas en el estudio.

COMPONENTE	DIETA CONTROL	DIETA ALTA EN GRASA
Proteína	25%	23%
Grasa	5%	25%
Polisacáridos	31%	21%
Azúcares simples	31%	21%
Vitaminas	1%	1%
Minerales	7%	5%
Fibra	5.3%	5%
Contenido Energético	4.0 Kcal/g	5.0 Kcal/g

Resonancia magnética

Los escaneos se realizaron colocando a los animales en un cilindro de plástico de paredes delgadas de 3 mm de grosor, 6.8 u 8.2 cm de diámetro interior en función del peso corporal, con un inserto de plástico cilíndrico añadido para limitar el movimiento. Mientras estaban en el tubo, los animales fueron sometidos brevemente a un campo electromagnético de baja intensidad (0.05 Tesla) para medir la grasa, el músculo y el agua corporal total. Después de 2 minutos, cuando se completó la medición, los animales fueron devueltos a su jaula de origen. Este sistema genera diferentes señales que modifican los patrones de giro de los átomos de hidrógeno dentro del sujeto y utiliza un algoritmo para evaluar las curvas

resultantes específicas para cada uno de los componentes medidos: masa grasa, masa muscular y agua corporal total.

Mediciones fisiológicas

Al cuarto y quinto mes del periodo experimental, los animales se colocaron en jaulas metabólicas para la recolección de orina, teniendo acceso al agua *ad libitum*. Posterior a la recolección, los animales fueron devueltos a sus jaulas con alimento y agua *ad libitum*. Se midió el volumen de orina de la recolección de 24 h. Se cuantificó la proteinuria y la depuración de creatinina.

Al finalizar el periodo experimental, las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (30 mg/kg), se colocó a la rata en una mesa termoregulada a 37°C, se determinó la tensión arterial media (TAM) mediante cateterización de la arteria femoral con un tubo de polietileno (PE-50) monitoreada con un transductor de presión (Modelo p23 db, Gould, Puerto Rico) acoplado a un polígrafo de Grass (Grass Instruments, Quincy, MA). El flujo sanguíneo renal (FSR) se determinó a través de una sonda de ultrasonido (1RB, Transonic flowprobe, Ithaca, NY) conectada a un flujómetro (Transonic flowmeter, New York, NY), la cual se colocó en la arteria renal izquierda previamente disecada y se le aplicó gel de acoplamiento ultrasónico (HR Lubricating Jelly, Carter-Wallace, New York, NY). Se ligó el paquete vascular del riñón derecho con sutura y se extrajo el riñón completamente, se determinó el peso del riñón y posteriormente fue seccionado en corteza y médula. Ambas secciones se congelaron en nitrógeno líquido y fueron almacenadas a -70°C para posteriores estudios moleculares. El riñón izquierdo se perfundió con 20 ml de solución salina al 0.9% y posteriormente se fijó con 20 ml de formaldehído al 4% a través del catéter colocado en la

arteria femoral; una vez perfundido, se retiró el riñón y se realizó un corte sagital y otro transversal. Los tejidos fueron incluidos en parafina en secciones de 3µm y se realizaron las tinciones de PAS (Ácido periódico de Schiff) y rojo de Sirio.

Estudios histopatológicos

El análisis de las laminillas se efectuó de manera cegada. En las laminillas con tinción de PAS (Ácido periódico de Schiff) se evaluó la hipertrofia glomerular mediante la determinación del diámetro glomerular. Se capturaron 5 campos (100x) de corteza renal de las ratas utilizando una cámara digital incorporada en un microscopio Nikon (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) y se midieron los diámetros de al menos 50 glomérulos por rata con el programa *NIS-Elements AR 4.5* (Nikon Corporation, Tokyo, Japan). También se midió el diámetro tubular de al menos 100 túbulos para determinar el grado de dilatación tubular con el programa *NIS-Elements AR 4.5* (Nikon Corporation, Tokyo, Japan). En los cortes histológicos teñidos con rojo de Sirio se digitalizaron al menos 5 campos (100x) subcorticales y se evaluó el porcentaje de área tubular afectada mediante morfometría con el programa *NIS-Elements AR 4.5* (Nikon Corporation, Tokyo, Japan).

Análisis Bioquímicos

Proteinuria: La excreción de proteínas en orina se cuantificó mediante el método turbidimétrico de precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA) al 10% usando una curva estándar de albúmina, sobre la cual se interpolaron las absorbancias obtenidas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 420 nm.

Albuminuria: Las muestras fueron sometidas a electroforesis utilizando 10 µl de orina diluida en solución fisiológica (1:10) y se corrieron en geles de SDS-PAGE al 8.5%. Posteriormente el gel fue teñido con Azul de Coomassie. Las bandas fueron escaneadas para el análisis densitométrico (E3 Biochem Imaging System UVP, Upland, CA) y la densitometría se analizó usando el programa *Vision Works Software UVP*.

Depuración de Creatinina: Se determinó la concentración de la creatinina sérica y urinaria mediante un estuche comercial (QuantiChrom™ Creatinine Assay Kit, DICT-500, Hayward, CA). Posteriormente se calculó la depuración de creatinina mediante la fórmula: $\text{DepCr (ml/min)} = [\text{Creat orina (mg/dl)}] [\text{flujo urinario (ml/min)}] / [\text{Creat sérica (mg/dl)}]$. Esta determinación se basa en el método de Jaffe para medir directamente la creatinina en muestras biológicas, utilizando picrato que se une con la creatinina y forma un complejo con color rojo que puede medirse mediante espectrofotometría a 510 nm.

Aldosterona sérica: Se determinó la aldosterona sérica cuantitativamente mediante ELISA siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante (EIA-4128, DRG International Inc., USA).

Excreción urinaria de Peróxido de Hidrógeno: Los niveles urinarios de H₂O₂ se determinaron mediante el estuche comercial Amplex® RedHydrogen Peroxide/Peroxidase Assay (Invitrogen, Eugene, OR), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron 50 µl de muestra que se incubaron en buffer del kit durante 30 min a temperatura ambiente. Esta metodología se basa en la reacción del H₂O₂ con la peroxidasa, lo que genera resorufina de color rojo-fluorescente como producto de oxidación, la cual puede ser cuantificada

espectrofotométricamente a 560 nm, la absorbancia se extrapoló con una curva estándar para determinar la concentración.

Análisis estadístico: El tratamiento de los datos se hizo mediante ANOVA seguido de la prueba post hoc de Bonferroni, el cual se realizó utilizando el programa GraphPad Prism 5. En el caso de las diferencias en la distribución de los diámetros glomerulares, áreas glomerulares y áreas de los penachos glomerulares se evaluaron por un análisis de contingencia, por la prueba de Chi-cuadrada y la prueba exacta de Fisher, el cual se realizó utilizando el programa GraphPad Prism 5. Los datos se presentan como el promedio \pm el error estándar y las diferencias estadísticamente significativas fueron encontradas cuando el valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS

El primer objetivo de nuestra investigación se centró en estudiar el daño renal de las ratas alimentadas con una dieta alta en grasa sin la administración de resveratrol para posteriormente compararlo con los efectos que tiene la administración de resveratrol en el daño renal inducido por obesidad, causado por una dieta alta en grasa en ratas hembra.

En la Figura 4A observamos una fotografía representativa de una rata de cada grupo a los cinco meses de tratamiento, en donde es evidente la diferencia de peso entre el grupo control en comparación con los animales alimentados con una dieta alta en grasa y los animales administrados con resveratrol. También se muestra el promedio del peso corporal en los tres grupos: el peso de las ratas alimentadas con una dieta alta en grasa (DAG) fue significativamente mayor que el grupo control (913.2 vs. 389.3 g), mientras que las ratas alimentadas con DAG y que recibieron resveratrol presentaron un peso significativamente menor que las alimentadas con DAG sin tratamiento (654.8 g). De acuerdo con la resonancia magnética realizada a los animales podemos asegurar que el aumento de peso corporal fue debido al aumento de la grasa corporal y no por el aumento de músculo o la retención de agua corporal. (Figura 4B-D).

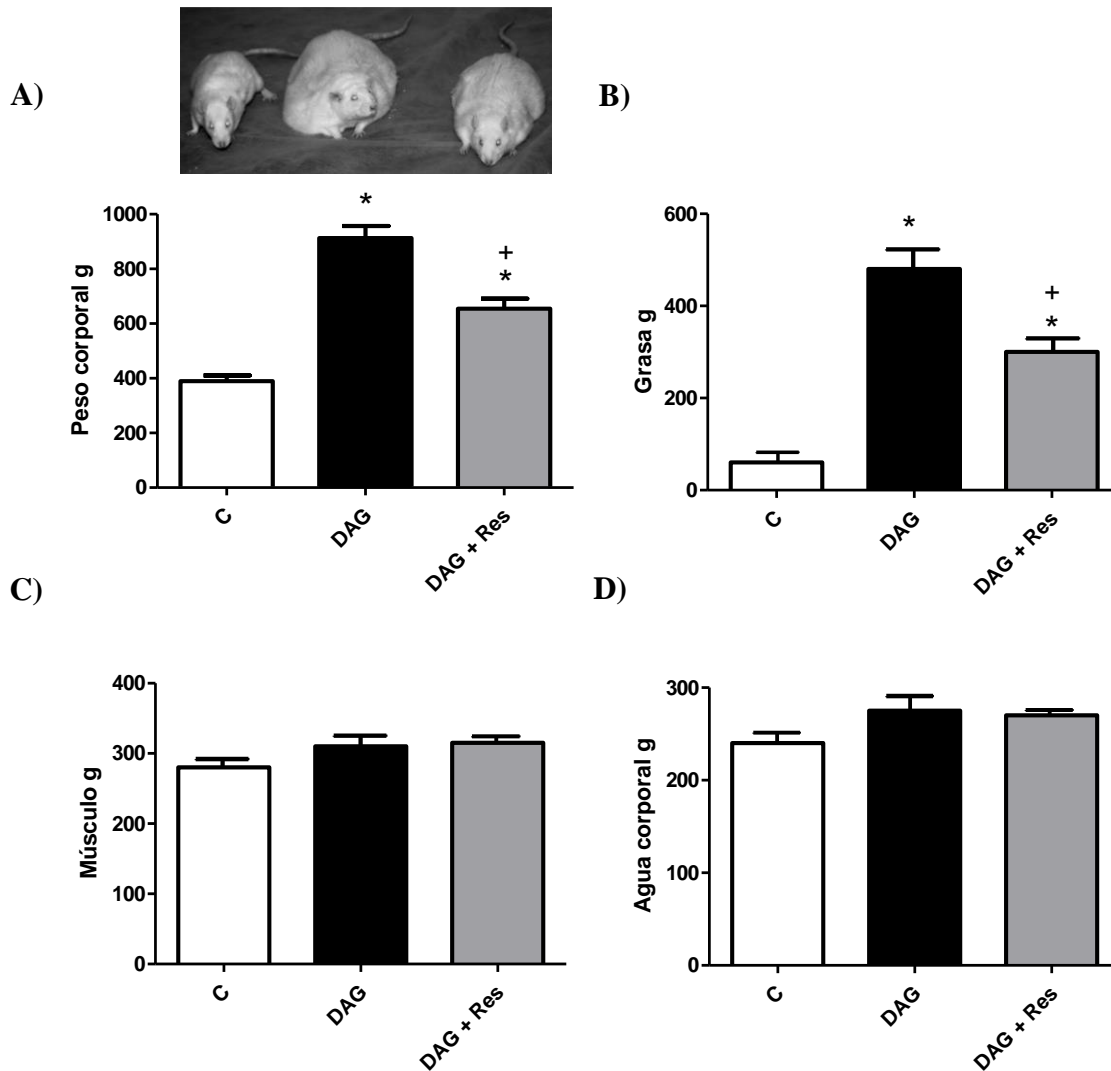


Figura 4. El aumento de peso de los animales al quinto mes de tratamiento es debido a un aumento en el peso de grasa. **A)** Foto representativa de los animales en estudio y peso corporal de las ratas hembra al quinto mes de tratamiento (n=6 por grupo). **B)** Grasa corporal de las ratas hembra al quinto mes de tratamiento (n=6 por grupo). **C)** Peso del músculo de las ratas hembra al quinto mes de tratamiento (n=6 por grupo). **D)** Agua corporal de las ratas hembra al quinto mes de tratamiento (n=6 por grupo). Promedio \pm ES. * $p < 0.05$ vs C; + $p < 0.05$ vs DAG.

Posteriormente evaluamos la proteinuria y albuminuria. En la Figura 5 se muestra la excreción urinaria de proteínas al cuarto y quinto mes del estudio, respectivamente. Como se puede apreciar, los animales alimentados con una dieta alta en grasa presentaron una elevación significativa de la proteinuria con un valor de 56.18 y 77.39 mg/24h, en comparación con el grupo control 10.14 y 15.31 mg/24h al cuarto y quinto mes de seguimiento respectivamente, mientras que, los animales administrados con resveratrol mantuvieron un nivel de proteínas en la orina similar al grupo control, 9.34 y 15.37 mg/24h al cuarto y quinto mes de tratamiento.

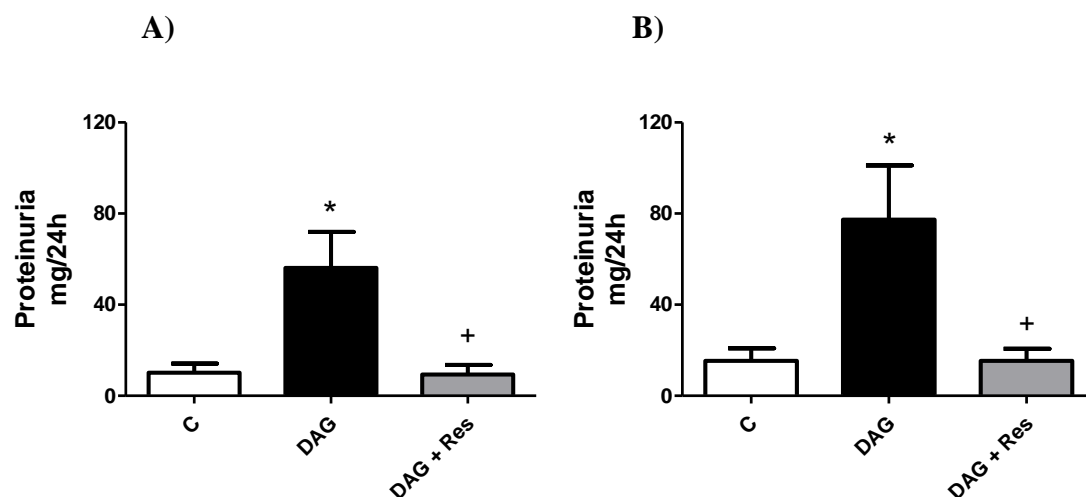


Figura 5. La ingesta de una dieta alta en grasa genera un aumento en los niveles de proteinuria, efecto que fue revertido por el resveratrol. A) Niveles de proteinuria a los 4 meses de evolución (n=6 por grupo). **B)** Niveles de proteinuria a los 5 meses de evolución (n=6 por grupo). Promedio \pm ES. * $p < 0.05$ vs C; + $p < 0.05$ vs DAG.

De igual modo, se presentó una elevación en la albuminuria en los animales alimentados con una DAG y en el caso de las ratas administradas con resveratrol, se redujo

significativamente la excreción de albumina urinaria con niveles similares al grupo control (Figura 6), indicando que el resveratrol mejora las anomalías estructurales en los riñones de las ratas obesas.

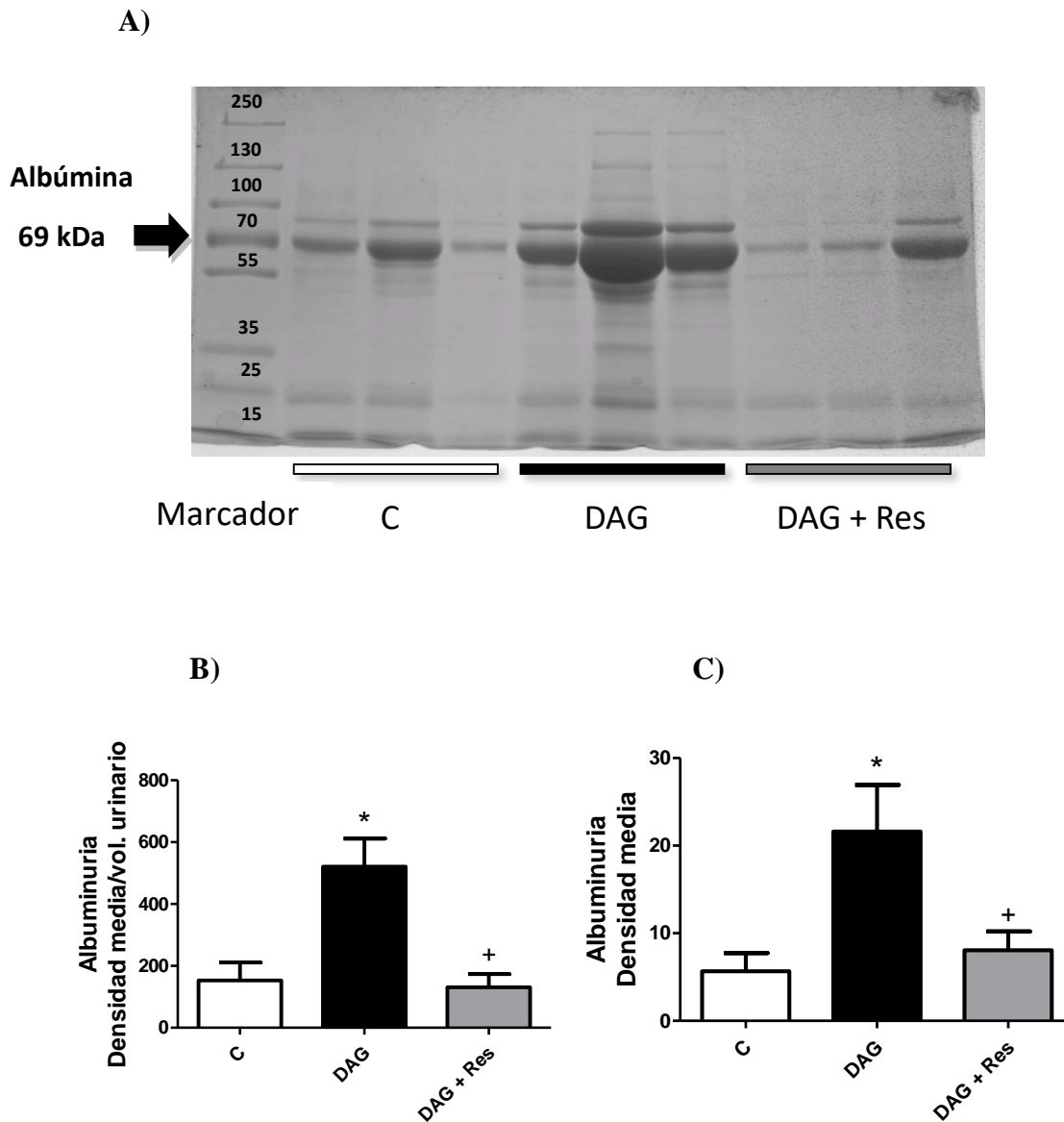


Figura 6. Albuminuria al quinto mes de seguimiento. A) Foto representativa del gel teñido con Azul de Coomassie (n=3 por grupo). B) Albuminuria corregida por el volumen urinario (n=6 por grupo). C) Albuminuria (n=6 por grupo). Promedio \pm ES. * $p < 0.05$ vs C; + $p < 0.05$ vs DAG.

No encontramos cambios estadísticamente significativos en el flujo sanguíneo renal (FSR), ni en la tensión arterial media (TAM) en los tres grupos de estudio. (Figura 7).

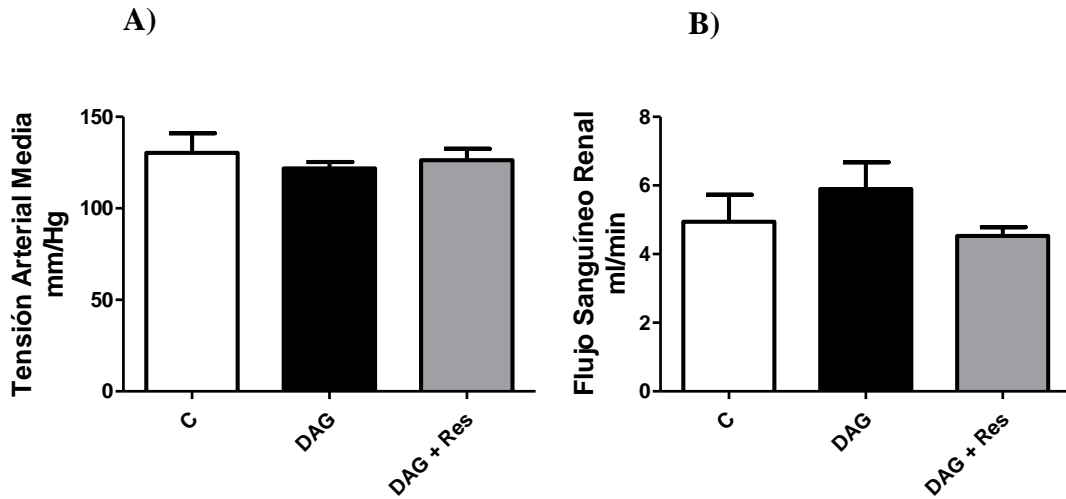


Figura 7. Tensión arterial media y flujo sanguíneo renal. A) Tensión arterial media (n=6 por grupo). B) Flujo sanguíneo renal (n=6 por grupo). Promedio \pm ES.

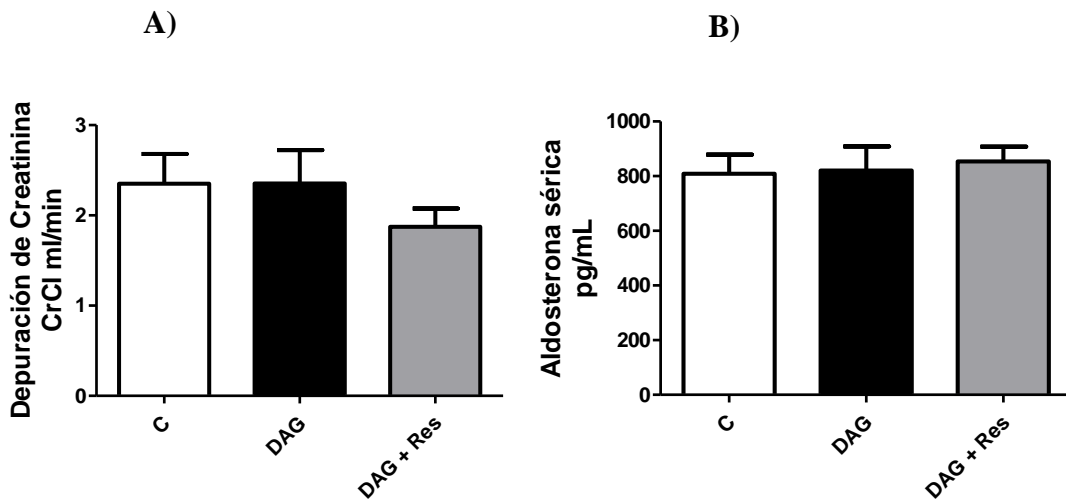


Figura 8. Depuración de Creatinina (CrCl) y Aldosterona sérica. A) Depuración de Creatinina (n=6 por grupo). B) Aldosterona sérica (n=6 por grupo). Promedio \pm ES.

La depuración de creatinina (CrCl) en las ratas hembra se mantuvo similar en los tres grupos, de igual modo, la aldosterona sérica fue similar en los tres grupos sin alcanzar una diferencia significativa. (Figura 8).

La ingesta de una DAG por un periodo de siete meses en ratas hembra no produjo disfunción renal, ya que no observamos una reducción estadísticamente significativa de la depuración de creatinina ni del flujo sanguíneo renal.

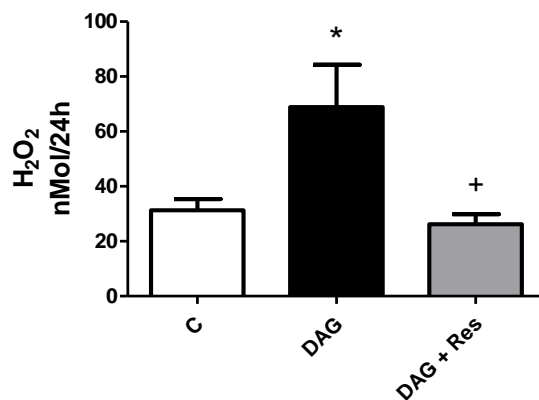


Figura 9. El estrés oxidante se elevó en las ratas alimentadas con una dieta alta en grasa. Excreción urinaria de peróxido de hidrógeno a los 5 meses de estudio (n=6 por grupo). Promedio ± ES. * p < 0.05 vs C; + p < 0.05 vs DAG.

También evaluamos la excreción urinaria de peróxido de hidrógeno, como un indicador de estrés oxidante. En la Figura 9 se puede apreciar que el grupo de hembras alimentadas con una DAG presentó un aumento en la excreción urinaria de H₂O₂ a los 5 meses de estudio, en comparación con su grupo control. Mientras que la excreción urinaria de H₂O₂ en las hembras alimentadas con DAG y resveratrol fue similar al grupo control.

Estos resultados sugieren que las hembras administradas con resveratrol poseen mecanismos para mantener bajos los niveles de H_2O_2 en presencia de una DAG.

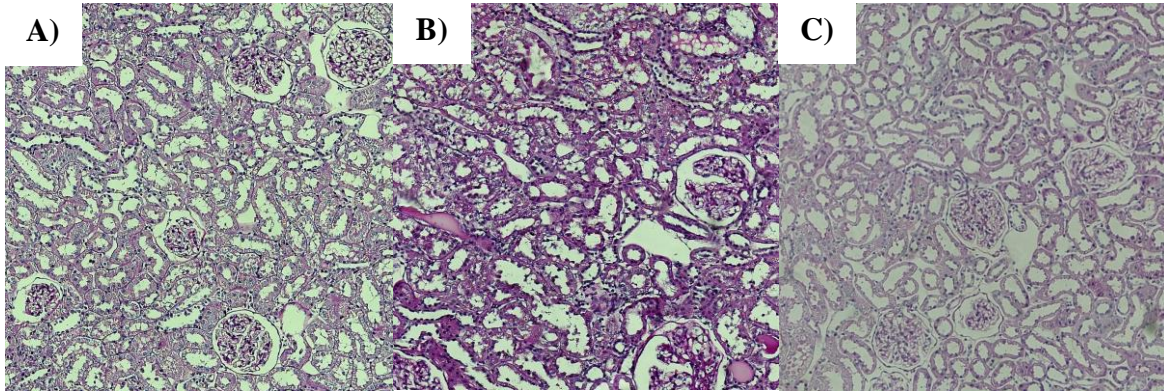


Figura 10. Imágenes representativas de cortes histológicos renales con tinción de PAS (Ácido periódico de Schiff). Microfotografías de luz representativas de cortes histológicos renales teñidos con PAS de **A)** Rata control. **B)** Rata DAG y **C)** Rata DAG + Res después de 5 meses de estudio (Magnificación 100x).

En la Figura 10 podemos observar microfotografías de luz representativas de cortes histológicos renales teñidos con PAS (Ácido periódico de Schiff), en donde se pueden distinguir los glomérulos y los túbulos.

Los diámetros glomerulares se distribuyeron por rangos, como se aprecia en la Figura 11A. Las ratas hembra control presentaron una distribución de los diámetros glomerulares en forma de campana, distribución que permaneció similar en las ratas administradas con resveratrol, mientras que en el grupo alimentado con una dieta alta en grasa podemos observar un desplazamiento a la derecha en los diámetros glomerulares. En el grupo control el 45% de los glomérulos están dentro de los 126 - 150 μm de diámetro y el 49% de las

hembras alimentadas con DAG y tratadas con resveratrol también están dentro de este rango, en cambio, en los animales alimentados con una dieta alta en grasa se promovió un incremento en el tamaño de los diámetros glomerulares, es decir, el 43% de las ratas poseen glomérulos con un diámetro de 151 - 175 μm en comparación con el 15% de las ratas control y el 20% de las ratas administradas con resveratrol. Además, las ratas alimentadas con una DAG tuvieron el 6% de sus diámetros glomerulares entre 176-200 μm , mientras que el 0% de las ratas control y el 1% de las ratas administradas con resveratrol presentan diámetros glomerulares dentro de este rango.

En la Figura 11B podemos observar las áreas glomerulares distribuidas en rangos. El 18% de las ratas control y el 12% de las ratas administradas con resveratrol presentan áreas glomerulares de 6000-10000 μm^2 , mientras que el 7% de los animales alimentados con una DAG presentan áreas dentro de este rango. El 32% de las ratas control y el 35% de las ratas administradas con resveratrol presentan áreas glomerulares de 10000-14000 μm^2 , mientras que el 19% de los animales alimentados con una DAG presentan áreas dentro de este rango. El 36% de las ratas en el grupo control tienen un área glomerular dentro de los 14000-18000 μm^2 , de igual forma el 34% de las hembras administradas con resveratrol y el 37% de los animales alimentados con una DAG presentan áreas dentro de este rango, sin embargo el 28% de los animales alimentados con una DAG el área glomerular estuvo entre el 18000-22000 μm^2 , mientras que el 10% de las ratas control y el 14% de las ratas administradas con resveratrol presentan áreas glomerulares dentro de este rango. El 5% de las ratas alimentadas con una DAG presentan áreas glomerulares dentro 22000-26000 μm^2 , mientras que el 0% de las ratas control y el 2% de las ratas administradas con resveratrol presentan áreas glomerulares dentro de este rango.

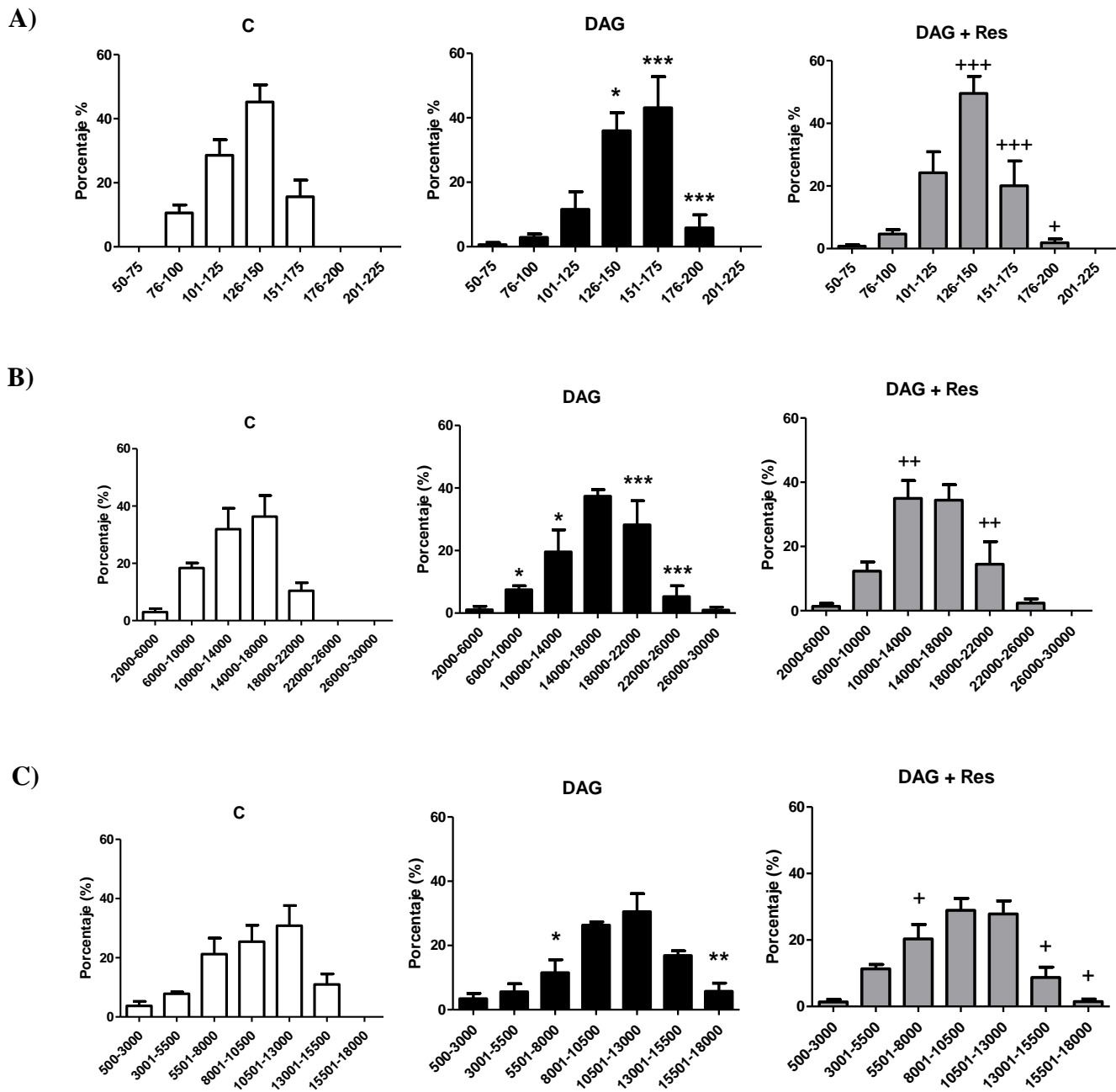


Figura 11. Hipertrofia glomerular a los 5 meses de estudio. (n=6 por grupo). **A)** Diámetros glomerulares (n=6 por grupo). **B)** Áreas glomerulares (n=6 por grupo). **C)** Penachos glomerulares (n=6 por grupo). Promedio \pm ES. * p < 0.05 vs C; **p < 0.005 vs C; ***p < 0.001 vs C; + p < 0.05 vs DAG; ++ p < 0.005 vs DAG; +++ p < 0.001 vs DAG.

De acuerdo con estos resultados, podemos notar que en el grupo alimentado con una dieta alta en grasa se produce un desplazamiento a la derecha en las áreas glomerulares.

En la Figura 11C podemos observar las áreas de los penachos glomerulares distribuidas en rangos. El 21% de las ratas en el grupo control presentan un área de penacho glomerular dentro de 5501-8000 μm^2 , de igual forma el 20% de las hembras administradas con resveratrol, sin embargo, el 11% de los animales alimentados con una DAG presentan áreas dentro de este rango. Así mismo, el 6 % de las ratas alimentadas con una DAG presentan penachos glomerulares con un área de 15501-18000 μm^2 , mientras que el 0% de las ratas control y el 1% de las ratas administradas con resveratrol presentan áreas glomerulares dentro de este rango. Con lo anterior, podemos deducir que en el grupo alimentado con una dieta alta en grasa también se produce un desplazamiento a la derecha en las áreas de los penachos glomerulares.

Estos estudios histopatológicos nos indican que la hipertrofia glomerular fue mayor en el grupo alimentado con una DAG y que el resveratrol mejoró de forma significativa las anomalías glomerulares en los riñones de ratas obesas.

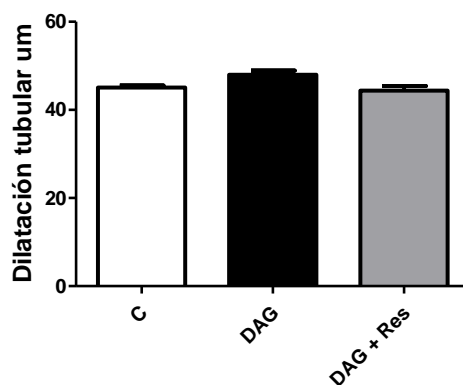


Figura 12. La dilatación tubular. Dilatación tubular en las ratas hembra a los 5 meses de estudio (n=6 por grupo). Promedio \pm ES.

A los cinco meses de estudio, no se observaron cambios significativos en la dilatación tubular en las ratas alimentadas con una DAG ni en las administradas con resveratrol, con respecto a su control. (Figura 12).

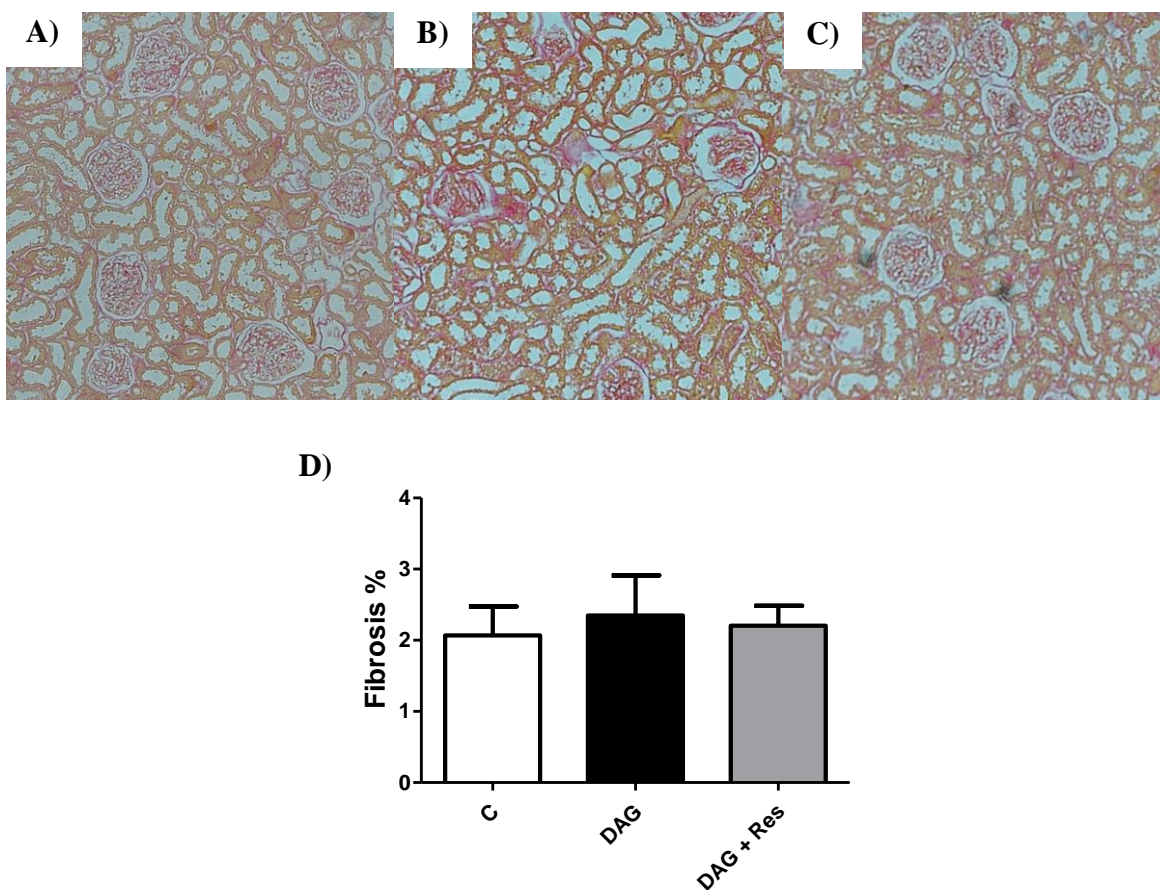


Figura 13. La fibrosis túbulo intersticial. Microfotografías de luz representativas de cortes histológicos renales teñidos con rojo de Sirio de **A)** Rata control. **B)** Rata DAG y **C)** Rata DAG + res (20mg/Kg) después de 5 meses de estudio (Magnificación 100x). **D)** Porcentaje de fibrosis en las ratas hembra a los cinco meses de estudio (n=6 por grupo). Promedio \pm ES.

Finalmente se cuantificó la fibrosis túbulo intersticial y encontramos que ésta estuvo prácticamente ausente en los tres grupos de estudio. (Figura 13).

DISCUSIÓN

En el presente estudio mostramos que la ingesta de una DAG provoca obesidad en ratas hembra, caracterizada por un incremento en la ganancia de peso corporal. Cabe recalcar que este aumento de peso fue únicamente por la acumulación de grasa y no por un aumento de músculo ni por agua corporal. También encontramos que la obesidad indujo a un daño renal moderado evidenciado por la elevación en la excreción de proteínas en orina, hipertrofia glomerular y estrés oxidante, este daño no estuvo relacionado con cambios en la presión arterial, ya que, hasta el final del estudio, todos los animales se mantuvieron normotensos. En la literatura se ha registrado que la enfermedad renal crónica inducida por obesidad puede ser independiente de la hipertensión.^{45, 46}

Las propiedades farmacocinéticas del resveratrol indican que éste no puede ser disuelto en agua, que posee una vida media corta y una vez administrado es metabolizado rápidamente en el cuerpo.^{59, 77} Debido a estas características el resveratrol fue disuelto en una solución acuosa de carboximetilcelulosa 0.5 %.⁷⁸

Encontramos que la administración de resveratrol por un periodo de cinco meses en un modelo animal de obesidad por una DAG, reduce el peso corporal, resultado de una menor generación de tejido adiposo, esto se puede explicar por sus propiedades antiadipogénicas y su capacidad apoptótica en los adipocitos maduros, previamente descritas^{60, 65, 66, 67, 68,} también encontramos que puede mejorar las anormalidades renales, tales como proteinuria, albuminuria, hipertrofia glomerular y que también tiene efectos antioxidantes.^{58, 59}

La ingesta de una DAG por un periodo de siete meses en ratas hembra no produjo disfunción renal, ya que no observamos una reducción estadísticamente significativa de la

depuración de creatinina ni del flujo sanguíneo renal, consideramos que un plazo mayor de seguimiento es necesario para detectar deterioro de la función renal.

Una característica importante en la enfermedad renal es el estrés oxidante persistente, caracterizado por la producción de ROS, las cuales producidas en exceso generan peroxidación lipídica, activación de leucocitos, daño endotelial y producción de citocinas.³⁴ Cuando medimos los niveles de H₂O₂ presentes en la orina de los grupos estudiados, observamos que en las ratas alimentadas con una DAG se encontraron elevados al final del periodo experimental, mientras que en las hembras que recibieron el resveratrol se mantuvieron similares al grupo control. Por lo tanto, es posible que el efecto antioxidante del resveratrol ayuda a disminuir el daño renal asociado a la enfermedad renal crónica por obesidad.

En nuestro estudio encontramos que el diámetro de los glomérulos en el grupo de las ratas hembra obesas aumentó al quinto mes, lo que refleja hipertrofia glomerular. Los diámetros glomerulares en las ratas hembra administradas con resveratrol se mantuvieron similares a sus controles, lo que sugiere que estos animales presentan menor hiperfiltración, lo que seguramente impactará en una menor progresión a ERC. De acuerdo con la literatura el diámetro glomerular promedio de una rata sana es de 120 μ m, lo cual concuerda con los resultados obtenidos. El área glomerular y el área de los penachos glomerulares se comportaron de la misma forma. Estudios previos en modelos animales de obesidad por ingesta de una DAG han demostrado que el resveratrol modula la expresión de la nefrina y podocina, las cuales son proteínas críticas que conforman a los podocitos y mantienen su integridad estructural; explicando así, su efecto en la disminución de la hipertrofia glomerular.^{6, 74}

Finalmente observamos que la fibrosis túbulo intersticial estuvo prácticamente ausente en los tres grupos de estudio. Previamente, en nuestro laboratorio encontramos que la fibrosis túbulo intersticial no aumenta en un modelo de progresión a ERC por isquemia/reperfusión en ratas hembra, en este estudio se consideró que la elevación temprana de TGF- β , podría estar ejerciendo un efecto protector.⁷⁹ Se ha reportado que TGF- β juega un papel neuroprotector después de un episodio de isquemia cerebral y que posee propiedades antiinflamatorias, ya que favorece la polarización de macrófagos antiinflamatorios Th2.⁸⁰

Todos estos resultados nos indican que el tratamiento con resveratrol atenúa el daño renal inducido por una DAG.

CONCLUSIÓN

La elaboración del presente proyecto permitió demostrar que las ratas hembra desarrollaron daño renal moderado después de siete meses de una ingesta alta en grasa, mientras que las ratas hembra alimentadas con una DAG y que fueron tratadas con resveratrol por cinco meses no desarrollaron daño renal en este periodo experimental. El desarrollo del daño renal se caracterizó por el aumento de la proteinuria, por el aumento de la albuminuria, por el estrés oxidante y por alteraciones histopatológicas como hipertrofia glomerular.

En este estudio mostramos que la administración de resveratrol puede revertir el desarrollo del daño renal inducido por obesidad, disminuyendo la proteinuria, albuminuria, el estrés oxidante y el daño estructural en el glomérulo.

El mecanismo de protección de este polifenol es a causa de sus propiedades antioxidantes, su capacidad para evitar la hiperfiltración glomerular ya que reduce la grasa corporal mediante sus propiedades antiadipogénicas y apoptóticas, y su capacidad de mantener la integridad estructural del glomérulo disminuyendo así la hipertrofia glomerular.

BIBLIOGRAFÍA

1. Douglas, Eathon. John, P. *Vander's Renal Physiology*. (McGraw Hill Professional, 2009).
2. Diseases, N. I. of Di. and D. and K. Los riñones y cómo funcionan. *Natl. Kidney Urol. Dis. Inf. Clear.* **8**, 16 (2009).
3. Gainza de los Rios F.J. Insuficiencia renal aguda. *Nefrogodiadigital.Com* 1–25 (2012).
4. Heinz Valtin, J. A. S. *Renal Function*. (Lippincott Williams & Wilkins, 1995).
5. M., M. M. *Tratado de nefrología*. (Norma, 1993).
6. Skorecki, K., Chertow, G. M., Marsden, P. A., Taal, M. W. & Yu, A. S. L. *Brenner y Rector. El riñón + ExpertConsult*. (Elsevier Health Sciences, 2018).
7. Li, W., Hartwig, S. & Rosenblum, N. D. Developmental origins and functions of stromal cells in the normal and diseased mammalian kidney. *Dev. Dyn.* **243**, 853–863 (2014).
8. Dressler, G. R. The Cellular Basis of Kidney Development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**, 509–529 (2006).
9. Guyton, A. C. & Hall, J. E. *Effect of Estrogen on Bone. Textbook of Medical Physiology* (2006). doi:10.1136/pgmj.51.599.683-c
10. A, S. M. & E, C. A. Enfermedad renal crónica : clasificación , mecanismos de renoprotección. 338–348 (2005).
11. Lozano, R. *et al.* Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease

- Study 2010. *Lancet* **380**, 2095–2128 (2017).
12. Hoerger, T. J. *et al.* The future burden of CKD in the United States: A simulation model for the CDC CKD initiative. *Am. J. Kidney Dis.* **65**, 403–411 (2015).
 13. M., B. B., W., M. T. & H., H. T. Dietary Protein Intake and the Progressive Nature of Kidney Disease: *N. Engl. J. Med.* **307**, 652–659 (1982).
 14. S., C. L., W., E. P., A., S. R. & L., K. P. Acute Kidney Injury and Chronic Kidney Disease as Interconnected Syndromes. *N. Engl. J. Med.* **371**, 58–66 (2014).
 15. Heinzl, A. *et al.* Molecular disease presentation in diabetic nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant.* **30**, iv17-iv25 (2015).
 16. Zoja, C., Zanchi, C. & Benigni, A. Key pathways in renal disease progression of experimental diabetes. *Nephrol. Dial. Transplant.* **30**, iv54-iv59 (2015).
 17. Shah, S. V, Baliga, R., Rajapurkar, M. & Fonseca, V. a. Oxidants in Chronic Kidney Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **18**, 16–28 (2007).
 18. Boubred, F. *et al.* Developmental Origins of Chronic Renal Disease: An Integrative Hypothesis, Developmental Origins of Chronic Renal Disease: An Integrative Hypothesis. *Int. J. Nephrol. Int. J. Nephrol.* **2013**, **2013**, e346067 (2013).
 19. Zoccali, C., Tripepi, G., Dounousi, E. & Mallamaci, F. Chronic Kidney Disease (CKD) as a systemic disease: Whole body autoregulation and inter-organ cross-talk. *Kidney Blood Press. Res.* **39**, 134–141 (2014).
 20. Kovesdy, C. P. & Kalantar-Zadeh, K. *Inflammation in Chronic Kidney Disease. Chronic Kidney Disease, Dialysis, and Transplantation* **6**, (Elsevier Inc., 2010).
 21. Machowska, A., Carrero, J. J., Lindholm, B. & Stenvinkel, P. Therapeutics targeting persistent inflammation in chronic kidney disease. *Transl. Res.* **167**, 204–213 (2016).
 22. Schnaper, H. W. Remnant nephron physiology and the progression of chronic kidney

- disease. **29**, 1–17 (2015).
23. S., B. N. On the Pathogenesis of the Uremic State. *N. Engl. J. Med.* **286**, 1093–1099 (1972).
 24. Goldfarb, D. A. & Novick, A. C. The renin-angiotensin system: Revised concepts and implications for renal function. *Urology* **43**, 572–583 (2017).
 25. Bertani, T., Cuttillo, F., Zoja, C., Brogгинi, M. & Remuzzi, G. Tubulo-interstitial lesions mediate renal damage in adriamycin glomerulopathy. *Kidney Int* **30**, 488–496 (1986).
 26. Taal, M. W. & Brenner, B. M. Renoprotective benefits of RAS inhibition: From ACEI to angiotensin II antagonists. *Kidney Int.* **57**, 1803–1817 (2000).
 27. Quaggin, S. E. & Kapus, A. Scar wars: mapping the fate of epithelial–mesenchymal–myofibroblast transition. *Kidney Int.* **80**, 41–50 (2011).
 28. Shankar, A. *et al.* Markers of inflammation predict the long-term risk of developing chronic kidney disease: a population-based cohort study. *Kidney Int.* **80**, 1231–1238 (2011).
 29. López-Hernández, F. J. & López-Novoa, J. M. Role of TGF- β in chronic kidney disease: an integration of tubular, glomerular and vascular effects. *Cell Tissue Res.* **347**, 141–154 (2012).
 30. Long, D. A., Norman, J. T. & Fine, L. G. Restoring the renal microvasculature to treat chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* **8**, 244–250 (2012).
 31. P R Lewy, A Quintanilla, N W Levin & and R H Kessler. Renal Energy Metabolism and Sodium Reabsorption. *Annu. Rev. Med.* **24**, 365–384 (1973).
 32. Sun, S. *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 α induces Twist expression in tubular epithelial cells subjected to hypoxia, leading to epithelial-to-mesenchymal transition.

- Kidney Int.* **75**, 1278–87 (2009).
33. Basu, R. K. *et al.* Interdependence of HIF-1 α and TGF- β /Smad3 signaling in normoxic and hypoxic renal epithelial cell collagen expression. *Am. J. Ren. Physiol.* **1**, 898–905 (2011).
 34. Wolf, G. Role of reactive oxygen species in angiotensin II-mediated renal growth, differentiation, and apoptosis. *Antioxid. Redox Signal.* **7**, 1337–1345 (2005).
 35. Organization., W. H. Obesity and overweight. Fact Sheet N^o311. (2016). Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. (Accessed: 17th September 2017)
 36. World Health Organisation. Mexico. *Noncommunicable Dis. Ctry. Profiles* 2014 (2014).
 37. Flier, J. S. The adipocyte: Storage depot or node on the energy information superhighway? *Cell* **80**, 15–18 (1995).
 38. de Ferranti, S. & Mozaffarian, D. The Perfect Storm: Obesity, Adipocyte Dysfunction, and Metabolic Consequences. *Clin. Chem.* **54**, 945 LP-955 (2008).
 39. Drolet, R. *et al.* Hypertrophy and hyperplasia of abdominal adipose tissues in women. *Int. J. Obes. (Lond)*. **32**, 283–291 (2008).
 40. Wojtczak, L. & Schonfeld, P. Effect of fatty acids on energy coupling processes in mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **1183**, 41–57 (1993).
 41. Tanner, R. M., Brown, T. M. & Muntner, P. Epidemiology of Obesity, the Metabolic Syndrome, and Chronic Kidney Disease. *Curr. Hypertens. Rep.* **14**, 152–159 (2012).
 42. Ting, S. M. S., Nair, H., Ching, I., Taheri, S. & Dasgupta, I. Overweight, Obesity and Chronic Kidney Disease. *Nephron Clin. Pract.* **112**, c121–c127 (2009).
 43. Chertow, G. M., Hsu, C. & Johansen, K. L. The Enlarging Body of Evidence:

- Obesity and Chronic Kidney Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**, 1501–1502 (2006).
44. BF, C., MG, L., JC, E. & et al. Prevalence and correlates of elevated serum creatinine levels: The framingham heart study. *Arch. Intern. Med.* **159**, 1785–1790 (1999).
 45. Hall, J. E. *et al.* Is obesity a major cause of chronic kidney disease? *Adv. Ren. Replace. Ther.* **11**, 41–54 (2017).
 46. Ejerblad, E. *et al.* Obesity and Risk for Chronic Renal Failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**, 1695–1702 (2006).
 47. Kwakernaak, A. J., Zelle, D. M., Bakker, S. J. L. & Navis, G. Central Body Fat Distribution Associates with Unfavorable Renal Hemodynamics Independent of Body Mass Index. *J. Am. Soc. Nephrol.* **24**, 987–994 (2013).
 48. Wickman, C. & Kramer, H. Obesity and Kidney Disease: Potential Mechanisms. *Semin. Nephrol.* **33**, 14–22 (2017).
 49. Stenvinkel, P., Zoccali, C. & Ikizler, T. A. Obesity in CKD - What should nephrologists know? *J. Am. Soc. Nephrol.* **24**, 1727–1736 (2013).
 50. Hall, J. *et al.* Obesity, hypertension, and chronic kidney disease. *Int. J. Nephrol. Renovasc. Dis.* **7**, 75 (2014).
 51. Stengel, B., Tarver-Carr, M. E., Powe, N. R., Eberhardt, M. S. & Brancati, F. L. Lifestyle factors, obesity and the risk of chronic kidney disease. *Epidemiology* **14**, 479–487 (2003).
 52. Sharma, K. *et al.* Adiponectin regulates albuminuria and podocyte function in mice. *J. Clin. Invest.* **118**, 1645–1656 (2008).
 53. Mount, P., Davies, M., Choy, S. W., Cook, N. & Power, D. Obesity-related chronic kidney disease—The role of lipid metabolism. *Metabolites* **5**, 720–732 (2015).

54. Unger, R. H. & Scherer, P. E. Gluttony, Sloth and the Metabolic Syndrome: A Roadmap to Lipotoxicity. *Trends Endocrinol. Metab.* **21**, 345–352 (2010).
55. Bertelli, A. A. A. & Das, D. K. Grapes, Wines, Resveratrol, and Heart Health. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **54**, (2009).
56. Kitada, M., Kume, S., Takeda-Watanabe, A., Kanasaki, K. & Koya, D. Sirtuins and renal diseases: relationship with aging and diabetic nephropathy. *Clin. Sci.* **124**, 153–164 (2013).
57. Park, S. J. *et al.* Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases. *Cell* **148**, 421–433 (2012).
58. Kitada, M. & Koya, D. Renal protective effects of resveratrol. *Oxid Med Cell Longev* **2013**, 568093 (2013).
59. Baur, J. A. & Sinclair, D. A. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 493–506 (2006).
60. Aguirre, L., Fernández-Quintela, A., Arias, N. & Portillo, M. P. Resveratrol: Anti-obesity mechanisms of action. *Molecules* **19**, 18632–18655 (2014).
61. Sharma, S., Anjaneyulu, M., Kulkarni, S. K. & Chopra, K. Resveratrol, a Polyphenolic Phytoalexin, Attenuates Diabetic Nephropathy in Rats. *Pharmacology* **76**, 69–75 (2006).
62. Kitada, M., Kume, S., Imaizumi, N. & Koya, D. Resveratrol improves oxidative stress and protects against diabetic nephropathy through normalization of Mn-SOD dysfunction in AMPK/SIRT1- independent pathway. *Diabetes* **60**, 634–643 (2011).
63. Kim, M. Y. *et al.* Resveratrol prevents renal lipotoxicity and inhibits mesangial cell glucotoxicity in a manner dependent on the AMPK-SIRT1-PGC1?? axis in db/db mice. *Diabetologia* **56**, 204–217 (2013).

64. Wenbin, Z. & Guojun, G. Resveratrol ameliorates diabetes-induced renal damage through regulating the expression of TGF- β 1, Collagen IV and Th17/Treg-related cytokines in rats. *West Indian Med. J.* **63**, 20–25 (2014).
65. Szkudelska, K. & Szkudelski, T. Resveratrol, obesity and diabetes. *Eur. J. Pharmacol.* **635**, 1–8 (2010).
66. Pang, W.-J. *et al.* Lentivirus-mediated Sirt1 shRNA and resveratrol independently induce porcine preadipocyte apoptosis by canonical apoptotic pathway. *Mol. Biol. Rep.* **40**, 129–139 (2013).
67. Rayalam, S., Yang, J.-Y., Ambati, S., Della-Fera, M. A. & Baile, C. A. Resveratrol induces apoptosis and inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *Phytother. Res.* **22**, 1367–1371 (2008).
68. Mader, I., Wabitsch, M., Debatin, K.-M., Fischer-Posovszky, P. & Fulda, S. Identification of a novel proapoptotic function of resveratrol in fat cells: SIRT1-independent sensitization to TRAIL-induced apoptosis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **24**, 1997–2009 (2010).
69. Gonzales, A. M. & Orlando, R. A. Curcumin and resveratrol inhibit nuclear factor-kappaB-mediated cytokine expression in adipocytes. *Nutr. Metab. (Lond)*. **5**, 17 (2008).
70. Olholm, J., Paulsen, S. K., Cullberg, K. B., Richelsen, B. & Pedersen, S. B. Anti-inflammatory effect of resveratrol on adipokine expression and secretion in human adipose tissue explants. *Int. J. Obes. (Lond)*. **34**, 1546–1553 (2010).
71. Wang, A. *et al.* Up-regulation of adiponectin by resveratrol: The essential roles of the Akt/FOXO1 and amp-activated protein kinase signaling pathways and DsbA-L. *J. Biol. Chem.* **286**, 60–66 (2011).

72. Szkudelska, K., Nogowski, L. & Szkudelski, T. The inhibitory effect of resveratrol on leptin secretion from rat adipocytes. *Eur. J. Clin. Invest.* **39**, 899–905 (2009).
73. Baile, C. A. *et al.* Effect of resveratrol on fat mobilization. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1215**, 40–47 (2011).
74. Pan, Q. R. *et al.* Resveratrol increases nephrin and podocin expression and alleviates renal damage in rats fed a high-fat diet. *Nutrients* **6**, 2619–2631 (2014).
75. Reeves, P. G., Nielsen, F. H. & Fahey, G. C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *J. Nutr.* **123**, 1939–1951 (1993).
76. Zambrano, E., Martínez-Samayoa, P. M., Rodríguez-González, G. L. & Nathanielsz, P. W. Dietary intervention prior to pregnancy reverses metabolic programming in male offspring of obese rats. *J. Physiol.* **588**, 1791–1799 (2010).
77. Delmas, D., Lancon, A., Colin, D., Jannin, B. & Latruffe, N. Resveratrol as a chemopreventive agent: a promising molecule for fighting cancer. *Curr. Drug Targets* **7**, 423–442 (2006).
78. Das, S., Lin, H.-S., Ho, P. C. & Ng, K.-Y. The Impact of Aqueous Solubility and Dose on the Pharmacokinetic Profiles of Resveratrol. *Pharm. Res.* **25**, 2593–2600 (2008).
79. Lima-Posada, I. *et al.* Gender Differences in the Acute Kidney Injury to Chronic Kidney Disease Transition. *Sci. Rep.* **7**, 12270 (2017).
80. Hunt, N. H. & Grau, G. E. Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends Immunol.* **24**, 491–499 (2003).

Artículo publicado

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Gender Differences in the Acute Kidney Injury to Chronic Kidney Disease Transition

Ixchel Lima-Posada^{1,2}, Cinthya Portas-Cortés^{1,2}, Rosalba Pérez-Villalva^{1,2}, Francesco Fontana^{1,2}, Roxana Rodríguez-Romo^{1,2}, Rodrigo Prieto^{1,2}, Andrea Sánchez-Navarro^{1,2}, Guadalupe L. Rodríguez-González³, Gerardo Gamba^{1,2}, Elena Zambrano³ & Norma A. Bobadilla^{1,2}

This study evaluated if there is a sexual dimorphism in the acute kidney injury (AKI) to chronic kidney disease (CKD) transition and the time-course of the potential mechanisms involved in the dimorphic response. Female and male rats were divided into sham-operated or underwent 45-min renal ischemia (F + IR, and M + IR). All groups were studied at 24-h and 1, 2, 3, or 4-months post-ischemia. Additionally, oophorectomized rats were divided into sham or IR groups. After 24-h, AKI extent was similar in females and males, but female rats exhibited less oxidative stress and increased renal GSH content. After 4-months and despite similar AKI, the M + IR group developed CKD characterized by proteinuria, tubulointerstitial fibrosis, glomerular hypertrophy, increased oxidative stress and a reduction in HIF1 α and VEGF from the 1st-month and persisting throughout the time-course studied. Interestingly, the F + IR group did not develop CKD due to lesser oxidative stress and increased eNOS, TGF β and HIF1 α mRNA levels from the 1st-month after IR. Whereas, oophorectomized rats did develop CKD. We found a sexual dimorphic response in the AKI to CKD transition. Early antioxidant defense and higher TGF β , HIF1 α and eNOS were among the renoprotective mechanisms that the F + IR group demonstrated.

Renal ischemia/reperfusion injury (IRI) is a major cause of acute kidney injury (AKI) in patients hospitalized with native or transplanted kidneys^{1,2}. It affects 15% of hospitalized patients, and the highest incidence is found in patients in the intensive care unit, with up to 60% of patients affected²⁻⁴. Ischemic AKI is provoked by a reduction in renal blood flow (RBF)^{3,5}, producing endothelial and tubular epithelial injury⁶⁻⁸. Consequently, peritubular capillary perfusion is also reduced, which favors the harm of S2 and S3 segments of the proximal tubule due to the large number of mitochondria in these sections. Therefore, this segment is highly susceptible to oxygen tension changes, with the Na⁺/K⁺ ATPase as one of most affected enzymes. Likewise, a reduction in ATP produces uncoupling of the respiratory chain and the subsequent formation of free radicals that favor the detachment of epithelial cells and death by apoptosis or necrosis^{9,10}.

Although the tubular epithelium can recover from lethal or sublethal cell damage, cellular processes in endothelial and tubular cells may not fully recover, thereby conditioning the development of progressive renal dysfunction¹¹.

In the last two decades, the incidence of CKD has increased more than three times, and according to the World Health Organization (WHO), it will be one of the three leading causes of death and disability worldwide by 2020¹². This will certainly impact health systems around the world. CKD is characterized by progressive loss of nephrons and renal function, in which tubule-interstitial fibrosis plays an important role^{13,14}. Accumulated evidence during the last decade from epidemiological and experimental observations have revealed that AKI is an important risk factor for the development of CKD and may also promote the CKD transition to end stage renal disease (ESRD)^{8,14-17}. However, few studies have addressed the mechanisms of AKI transition to CKD. Several theories have tried to explain how an episode of AKI leads to renal function and structure injury over time. These theories include repeated cycles of damage and repair¹⁸, rarefaction of peritubular capillaries with the subsequent development of chronic hypoxia^{7,19,20}, and activation of signaling pathways such as hypoxia inducible

¹Molecular Physiology Unit, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico. ²Departament of Nephrology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico. ³Departament of Reproductive Biology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico. Correspondence and requests for materials should be addressed to N.A.B. (email: nab@biomedicas.unam.mx)

factor (HIF1), pro-fibrotic and pro-inflammatory cytokines^{21,22}. In addition, although it is essential that the tubular cells proliferate to restore normal tubular structure, studies suggest that epithelial cells of the renal tubules also play a critical role in the development of tubulointerstitial fibrosis by inducing an arrest in the cell cycle, causing disproportionate tubular proliferation, TGF β generation, and epigenetic modifications^{23–26}.

Moreover, there is a growing evidence that the pathogenesis, clinical features and prognosis of cardiovascular and renal diseases is completely different between men and women, which makes sense since the physiology of women is different from men. In this sense, one of the largest meta-analysis to assess gender differences in the progression of renal diseases included 11,000 patients referred from 60 different studies and showed that women demonstrate lower progression compared to men in different renal diseases, such as polycystic kidney disease, IgA nephropathy, membranous glomerulonephritis and CKD²⁷. In support of this meta-analysis, two recent studies showed that the progression to CKD is worse in men than in women^{28,29}. Likewise, the PREVEND cohort revealed that age, albuminuria, body mass index and blood glucose levels in men are risk factors that exacerbate the progression to ESRD at a greater magnitude than in women³⁰.

In this study, we evaluated whether there is a sexual dimorphism in the AKI to CKD transition, the time-course of functional and structural alterations in both genders, the effect of oophorectomy on this transition, and the mechanisms responsible for gender differences.

Results

Our first target was focused on assessing the severity IRI in male and female rats. The AKI was induced by 45 min of ischemia and compared with the control groups. These groups were studied 24-h after IR. The M + IR and F + IR groups developed AKI, characterized by a significant reduction in creatinine clearance (Fig. 1A), and renal blood flow (Fig. 1B), together with a significant increase in proteinuria (Fig. 1C). The urinary excretion of hydrogen peroxide (UH₂O₂V) increased 4-fold in the M + IR group compared to its control group, interestingly, in the F + IR group, the UH₂O₂V remained unaltered (Fig. 1D). Previously our group showed that the urinary heat shock protein 72 kDa levels (UHsp72) is a sensitive and early biomarker of AKI, capable of stratifying the intensity of epithelial tubular damage³¹. As shown in Fig. 1E and F, the female control group showed almost no UHsp72. In contrast, the F + IR group showed a significant increase in UHsp72 (upper WB). Similar levels of Hsp72 were found in the M + IR and F + IR groups (lower WB and densitometric analysis). This similar degree of IRI was confirmed by the histopathologic analysis as is shown in the representative PAS-stained kidney slices and in the quantification of injured tubules (Fig. 1G–H). These results indicate that IRI caused structural and functional alterations of the same magnitude in male and female rats, except in UH₂O₂V. The dimorphic response observed in the UH₂O₂V was further analyzed by measuring glutathione levels (GSH) into the kidney (Fig. 2). In renal cortex, GSH content was similar in control and the F + IR groups. In contrast, the M + IR group displayed a significant reduction by 60% in the GSH levels compared to both control groups. (Fig. 2A). In renal medulla, GSH content was similar in both control groups, whereas the F + IR group exhibited greater GSH content by t-test ($p = 0.01$) but it not reach statistical difference by ANOVA. In contrast, the M + IR group exhibited lesser GSH levels compared to F + IR group (Fig. 2B). The GSSG levels in the renal cortex, a surrogate metabolite of GSH oxidation, we only observed a trend to increase in the M + IR group (Fig. 2C). Whereas in the renal medulla, GSSG levels were greater in the F + IR group (Fig. 2D). These findings indicate that despite similar IRI female rats had a greater ability to generate GSH.

Our second target was focused on assessing the time-course of AKI to CKD transition in female and male rats. As we previously reported^{23,26,32}, an ischemic episode in male rats induced a progressive increase in proteinuria from 17.2 ± 1.4 (1st-month) to 169.2 ± 26.2 mg/dL (4th-month) and it was evident since the 2nd-month (Fig. 3A). The temporal course of renal function corrected by body weight was similar among the groups and did not alter by IRI (Fig. 3B). In contrast, an early increase in UH₂O₂V was observed in the M + IR group (1st-month) that remained elevated during the time-course of the study when it was compared to its control group by t-test (Fig. 3C), but only significant by ANOVA at the 1st and 4th-month compared with F + IR group. Despite the same initial IRI, the F + IR group did not develop neither proteinuria nor elevation of UH₂O₂V (Fig. 3A,C).

At the end of the experimental period (4-months), both female groups exhibited a lesser body weight than male, due to the well-known biological sex difference in size and body weight. In the M + IR group there was a slight reduction that was associated with the AKI to CKD transition that exhibited the male rats, but not the females (Fig. 3D). No differences in the mean arterial pressure among the studied groups were observed (Fig. 3E). The M + IR and F + IR groups did not exhibit changes in RBF, although it was significantly higher in male than in female groups (Fig. 3F), this difference was not observed when RBF was corrected by the body weight (data not shown).

In accord with our findings at functional level, after the 4th-month, the F + IR group showed almost no renal structural alterations compared to the M + IR group. The representative microphotomicrograph from a F + IR rat (Fig. 4A) contrast with a M + IR rat microphotomicrograph (Fig. 4B), wherein the presence of a large percentage of tubulointerstitial fibrosis-affected area is clearly visible. The morphometric analysis of the time-course of tubulointerstitial fibrosis showed that 4-months post-ischemia, the F + IR (Fig. 4C) and the M + IR groups (Fig. 4D) showed a significant increase in fibrosis, however the degree of damage was much greater in males than in females, 38% vs. 12%, respectively ($p < 0.05$). Tubular dilataion and glomerular hypertrophy was not observed in the F + IR (Fig. 4E and G, respectively). Alterations that were do present in the M + IR group (Fig. 4F and H). Supplemental Fig. 1 shows the time-course of glomerular diameter distribution in male control group (top panel) compared with the M + IR (middle panel) and F + IR groups (lower panel). After one month, the control group exhibited a normal distribution, in which about 50% of glomeruli was found in the size range of 101–125 μ m (Supplemental Fig. 1A). After 2, 3 or 4-months, in the control male group, the glomerular size increased that was in accord with the rats grow-up, so the largest percentage of glomeruli diameter was found between 126 to 150 μ m and the distribution looks like a bell-shaped (Supplemental Figure 1B, C and D, respectively). In contrast, in

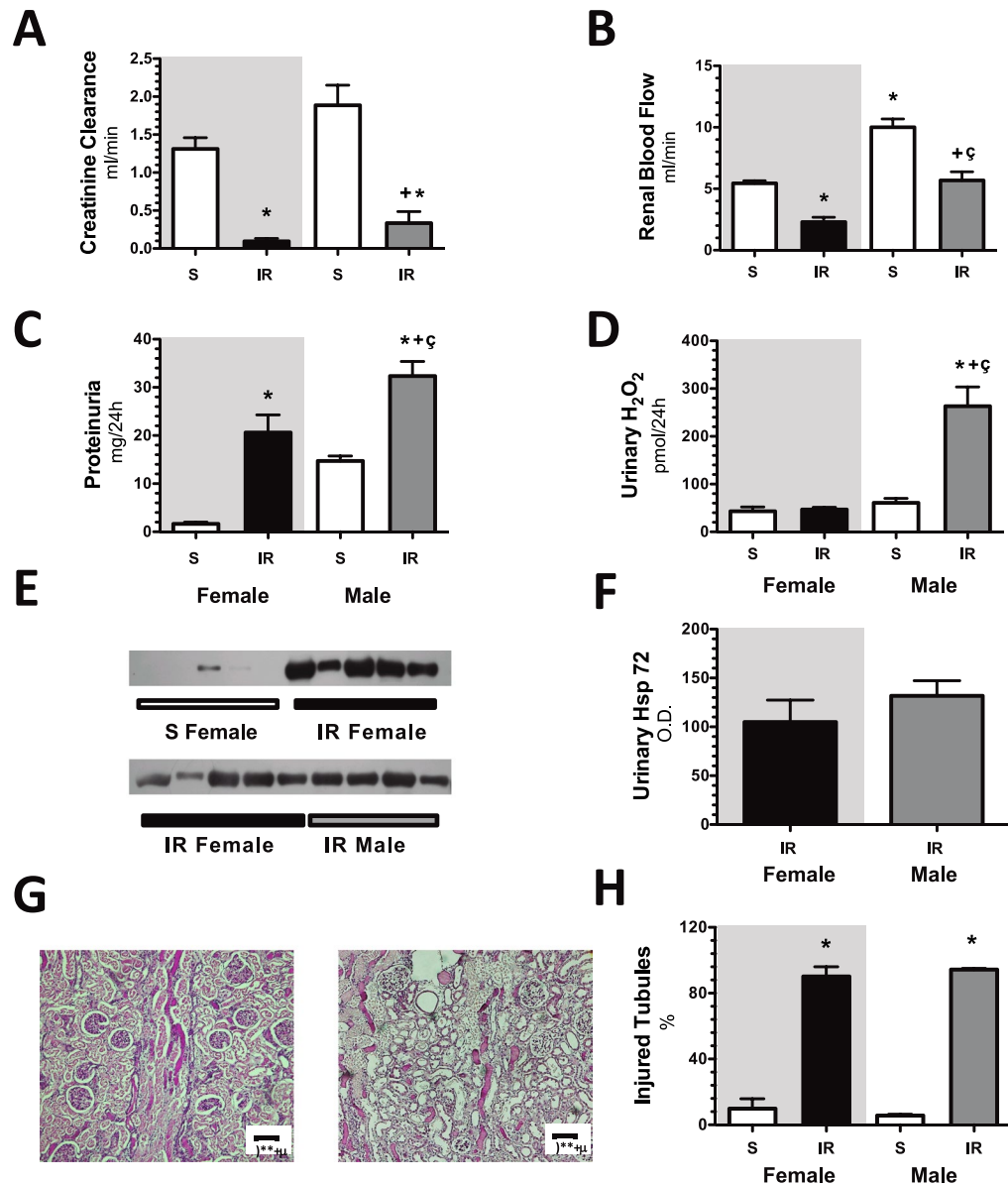


Figure 1. Renal injury induced by ischemia/reperfusion after 24-h in both female and male rats. (A) Creatinine clearance, (B) renal blood flow, (C) proteinuria, (D) Urinary H₂O₂ excretion, (E) Urinary Hsp72 levels by Western blot (n = 4–5 per group). (F) Densitometric analysis of Hsp72 levels, (G) a representative image of a periodic acid–Schiff (PAS) stained kidney slides from a female rat underwent IR (left), and an IR male rat (right), (H) percentage of injured tubules. Female groups are in a gray background in which sham female is represented by white bars and IR female group in black bars. Following by sham male in white bars and IR male group in gray bars. Control groups were formed at least n = 5, and IR Female or Male = at least 6. Data are shown as mean ± SE. *p < 0.05 vs, Sham female group, †p < 0.05 vs. sham male group, and ‡p < 0.05 vs. F + IR group.

the M + IR group there was a significant increase in the proportion of glomeruli in higher ranks to 176 μ (12%, Supplemental Figure 1H). This is in clear contrast to rats belonging to the control group, which had less than 2% in this range and none glomerulus in the range between 201–225 μm. The F + IR group had a distribution pattern like the control group (Supplemental Figures 1I–1L).

The results presented in Figs 3 and 4 and Supplemental Fig. 1 clearly show that the M + IR group developed progressive CKD, this complication was not observed in the F + IR group, despite the same AKI degree induced at the beginning of the study.

To dissect the renoprotective role of female sexual hormones in the long-term renoprotection observed, female rats were oophorectomized. Figure 5A shows that in oophorectomized rats one month after, estradiol levels were reduced by 55% compared with the control group, and this group of rats won more body weight than the female control rats. Although the creatinine clearance was greater in Oop group than S group the difference by ANOVA was not significant (Fig. 5C) and when the creatinine clearance was corrected by body weight, similar

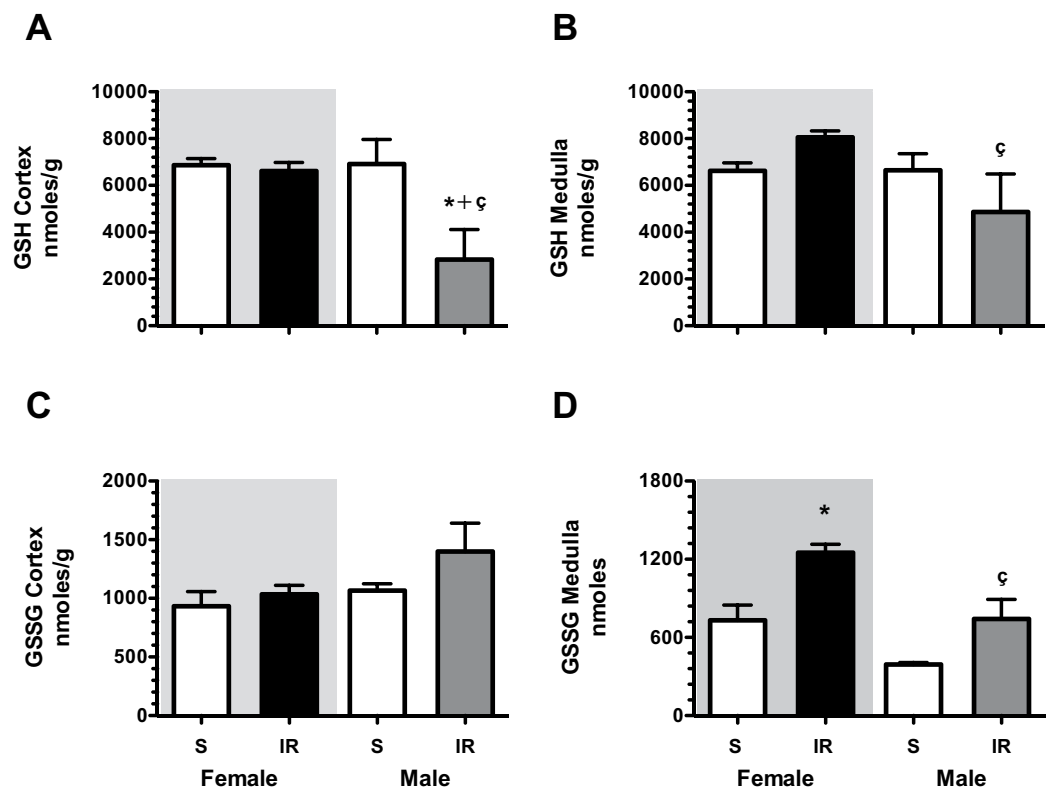


Figure 2. The IR renal injury induced a dimorphic GSH and GSSG kidney content response. (A) Cortex GSH levels, (B) Medulla GSH levels, (C) Cortex GSSG levels, (D) Medulla GSSG levels. Female groups are in a gray background in which Sham female is represented by white bars and IR female group in black bars. Following by sham male in white bars and IR male group in gray bars. The GSH and GSSG kidney content was evaluated 24-h post-ischemia. Control groups were formed by $n = 4$, whereas F + IR and M + IR groups included $n = 6$. Data are shown as mean \pm SE. * $p < 0.05$ vs. Sham female group, + $p < 0.05$ vs. sham male group, and ‡ $p < 0.05$ vs. F + IR group.

results were observed (0.53 ± 0.07 vs. 0.66 ± 0.08 ml/min/100 g BW, $p = \text{NS}$). One month after, one half of these rats underwent IR and the other half, sham surgery. After 24-h, proteinuria was much greater in Oop + IR than in the F + IR group, (Fig. 5B). The IRI was also evidenced by the reduction in creatinine clearance and renal blood flow in both groups (Fig. 5C and D, respectively). Then, the time-course of AKI to CKD was analyzed. Urinary protein excretion progressively increased in the Oop + IR group since the 3rd-month post-ischemia (Fig. 5E), being a pretty like the M + IR group compartment. Similarly, oxidative stress in the Oop + IR group was higher than F + IR group since the 2nd-month ($p = 0.05$), reaching a statistically significant difference in the 3rd and 4th-months (Fig. 5F). These results suggest that female sexual hormones play a crucial role in avoiding the AKI to CKD transition.

In order to know the mechanisms responsible in the renoprotection observed in female rats, we evaluated the mRNA levels of several signal pathways involved in the pathophysiology of CKD. The endothelial nitric oxide synthase (eNOS) mRNA levels were significantly increased in the F + IR group at 1st and 3rd-months after IRI compared to sham group. In contrast, mRNA levels of eNOS remained unaltered in the M + IR groups, but were significantly different than those observed in F + IR groups (Fig. 6A). There were not changes in catalase mRNA levels among the groups, except for the 1st-month in M + IR, in which a significant reduction was observed compared to F + IR group (Fig. 6B). We also found a significant increase in hypoxia-inducible factor (HIF1 α) mRNA levels in the F + IR group at the 2nd and 3rd-month post-ischemia, contrasting with the behavior in the M + IR group that was significantly smaller than the corresponding F + IR groups and different from S male group at 4th-month (Fig. 6C). Although, the VEGF mRNA levels were similar during the time-course of the study in the F + IR and M + IR groups (Fig. 6D), the VEGF protein levels towards to be lower in M + IR group during the follow-up, but a significant difference was only found at the fourth month (Fig. 6E-F). Finally, the mRNA levels of anti-inflammatory cytokines and vasoactive receptors were evaluated. There was a significant increase in TGF- β mRNA levels in the F + IR group, since the 1st-month post-ischemia and this effect was not seen in the M + IR groups (Fig. 7A). Similarly, there was a trend to increase of interleukin-10 mRNA levels in the F + IR groups (Fig. 7B). No differences were found in the mRNA levels of vasoactive factors (Fig. 7C,E and F), except in ET $_B$ receptor in which the values tended to be lesser in male groups (Fig. 7D).

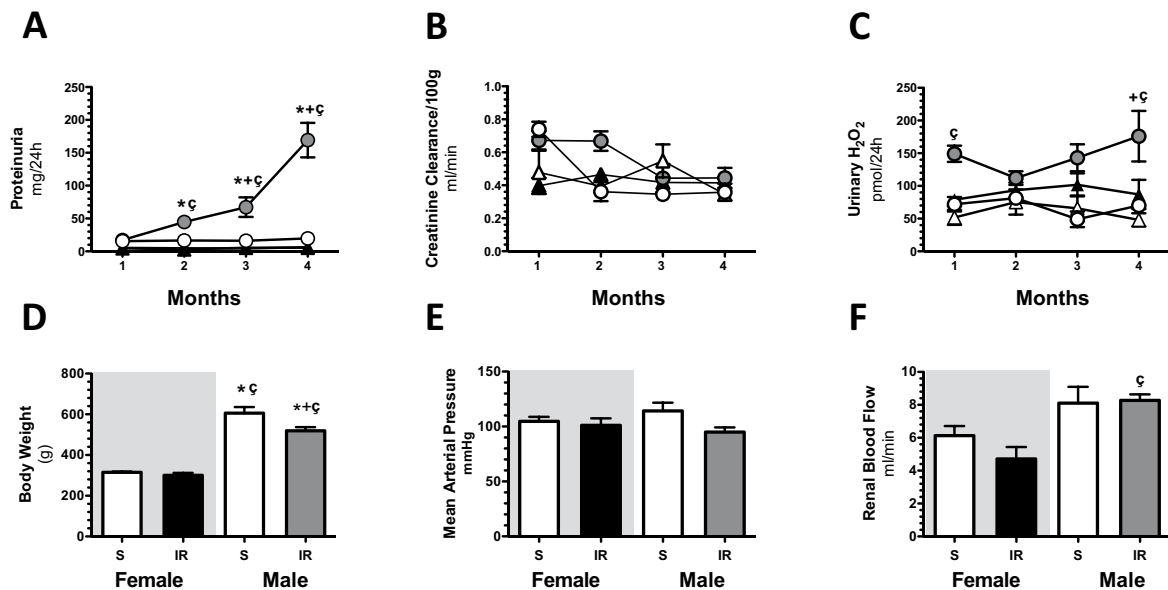


Figure 3. The AKI to CKD transition is prevented in female rats. Every 30-days (A) Urinary protein excretion, (B) creatinine clearance and (C) Urinary H₂O₂ excretion were measured. White triangles represent Sham female (n = at least 7), black triangles represent IR female (n = at least 10), white circles represent Sham male (n = at least 4) and gray circles represent IR male group (n = at least 4). After 4 months, (D) body weight, (E) mean arterial pressure, and (F) renal blood flow were recorded. Sham Female or Male (n = at least 4) and IR Female or Male groups (n = at least 7). Female groups are in a gray background in which sham is represented by white bars and F + IR group in black bars, following by Sham male in white bars and M + IR group in gray bars. Data are shown as mean ± SE. *p < 0.05 vs, Sham female group, +p < 0.05 vs. Sham male group, and †p < 0.05 vs. F + IR group.

Discussion

In this study, we show that after 24-h that of inducing renal injury by 45 min of renal bilateral ischemia, female and male rats exhibited a similar extent of IRI, but after 4 months of the initial IRI, the M + IR group, but not the F + IR group, exhibited clear signs of CKD, characterized by proteinuria, increased oxidative stress and structural changes such as: glomerular hypertrophy and tubulointerstitial fibrosis. These findings provide evidence to support that the F + IR group were protected from the development of CKD, even though they had a similar degree of initial AKI (Fig. 1). Moreover, when the female rats were oophorectomized, this group exhibited proteinuria and oxidative stress as the M + IR group. These results indicate that sexual dimorphism observed can be attributed to sex hormones, since, the oophorectomy generated a similar behavior of the AKI to CKD transition in female rats to that observed in male rats.

Several studies have shown that renal response to different pathological processes is different between males and females animals and it has also been observed in humans. Specifically, it has been reported that renal disease in males is associated with faster progression independently of differences in blood pressure^{29,33–42}. When it comes from ischemia/reperfusion the observations are not consistent. Studies conducted in Wistar rats have found that functional and structural injuries induced by ischemia/reperfusion are worsen in the male than female^{43–46}, similar between female and male^{47,48}, or even worsen in female than male rats^{49,50}, and these results differ to that occurs in mice in which the females are more resistant to IR injury³⁹. Using renal function (creatinine clearance and renal blood flow), and tubular injury markers (proteinuria, injured tubules %, and urinary excretion of Hsp72), we found, that after 24-h of renal bilateral ischemia, female and male rats displayed the same magnitude of IRI. Therefore, sexual dimorphism in IRI after 24-h was not observed, except in the oxidative stress, because the F + IR did not exhibit elevation of UH₂O₂V, as was observed in the M + IR group (Fig. 1D). This finding on oxidative stress was further explored in the renal tissue by measuring renal GSH content. The M + IR indeed exhibited a significant reduction in renal GSH, an effect that was not observed in the F + IR group (Fig. 2A), despite the extensive tubular proximal injury (Fig. 1). These results indicate that female hormones seems to maintain the GSH content in extreme conditions and they also are able to protect for their powerful antioxidant activity, as has been previously demonstrated⁵¹. Although female exhibited a lesser oxidative stress than male rats, it was not enough to reduce IR injury, because several players take place into AKI pathophysiology, mainly: 1) enhanced vasoconstriction, due to an imbalance in the release of vasoconstrictor and vasodilator factors; 2) endothelial cell injury, that promotes activation and transmigration of leucocytes which are able to produce cytokines and a pro-inflammatory state; 3) and epithelial cell injury by also contributing to the inflammation through releasing chemotactic cytokines, and by the loss of the tubular integrity that provokes a reduction in the survival pathways⁸.

The CKD progression after IRI was observed in the M + IR group accordingly with our previous studies^{23,26,32}, but interestingly, female rats did not develop CKD.

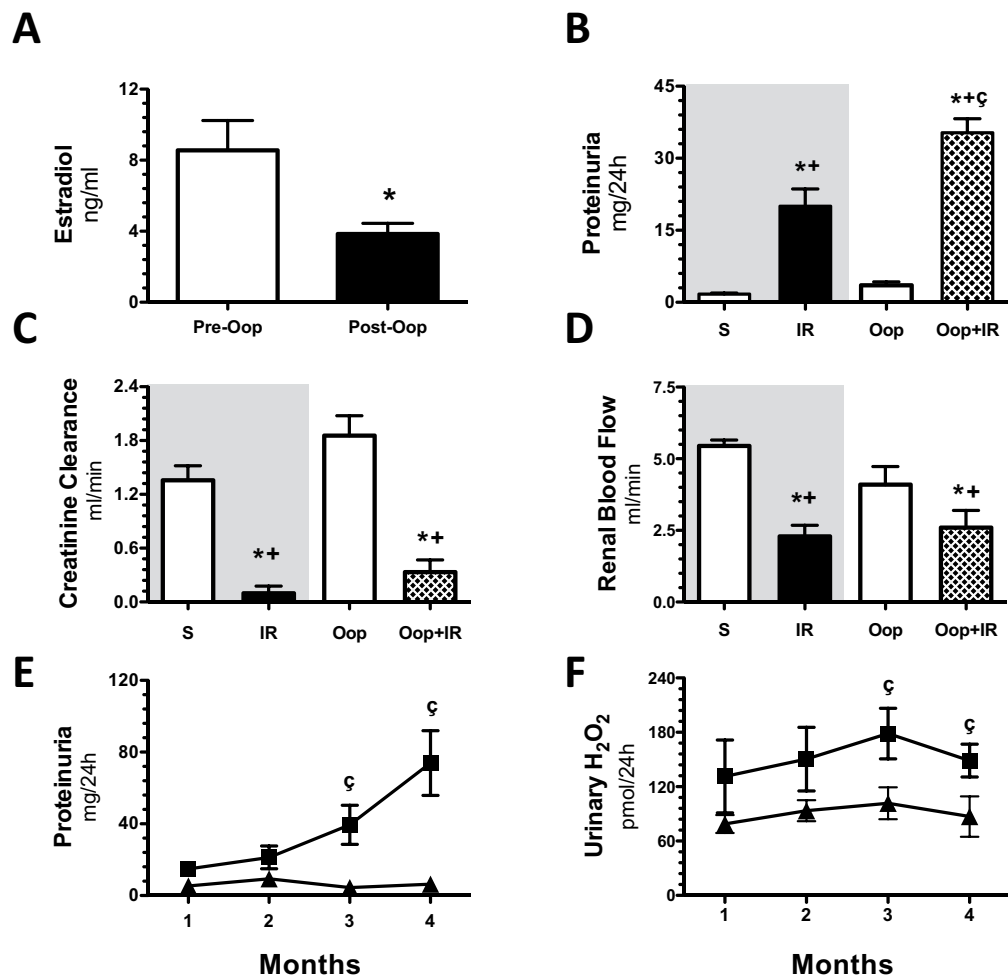


Figure 5. The depletion of estrogens is associated with AKI to CKD transition in female rats. (A) Estradiol levels before oophorectomy (Pre-Op) is represented in white bars ($n = 24$) and 1-month after oophorectomy (Post-Op) in black bars ($n = 24$). Then, oophorectomized rats (Oop) were underwent to sham surgery or bilateral renal ischemia of 45 min (Oop + IR) and studied 24-h or 1 to 4-months. In (B) proteinuria, (C) creatinine clearance, and (D) renal blood flow evaluated 24-h post-ischemia. Both female groups without oophorectomy are in a gray background in which sham (S) is represented by white bars and IR female group (IR) in black bars, following by the sham oophorectomized group (Op) in white bars and the oophorectomized underwent IR group (Oop + IR) in pattern bars. For the long-time experiment, (E) urinary protein excretion, and (F) Urinary H_2O_2 excretion were measured every 30 days during the follow-up. Black triangles represent IR female ($n =$ at least 8), black squares represent IR + Oop ($n =$ at least 4). Data are shown as mean \pm SE. * $p < 0.05$ vs. sham female group, + $p < 0.05$ vs. Op, † $p < 0.05$ vs. F + IR group.

mediated by its ability to increase HIF1 α since early stages after IRI, which in turn could help to prevent vascular rarefaction, chronic hypoxia and renal fibrosis.

In addition to this, it has been observed that estrogens have anti-fibrotic and anti-apoptotic properties in the cardiomyocytes⁵⁸. Also, it has been reported that administration of 17-beta estradiol to hypertensive oophorectomized rats attenuates glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis⁵⁹ while, in rats with type II diabetes, this hormone protects podocytes by increasing estrogen receptor beta³⁵. This effect on podocytes, apparently is mediated by stabilizing the cytoskeleton of these cells⁶⁰. On contrary, it has been postulated that testosterone has fibrotic and apoptotic properties through increasing TNF α signaling³⁷. Accordingly, with this evidence, the M + IR group developed glomerular hypertrophy and tubule-interstitial fibrosis after IRI and the female rats do not. Surprisingly, the time-course of TGF- β mRNA levels after the ischemic insult showed a clearly dimorphic response. In the F + IR, TGF- β mRNA levels were significantly increased, since the 1st- month and remained elevated along the study, whereas in the M + IR group this anti-inflammatory response did not occur. Similarly, interleukin-10 only trend to increase in the F + IR groups. Although several studies have revealed the fundamental role of TGF- β in renal fibrosis⁶¹, has also been observed that the use of antibodies against TGF- β in models of diabetic nephropathy⁶², or in puromycin aminonucleoside induced nephropathy⁶³ worsen proteinuria. In fact, Wang W *et al.* showed that TGF- β can relieve the inflammation through Smad7⁶⁴. Given the significant tubulointerstitial fibrosis in male rats compared with females, we believe that the early elevation of this cytokine in female

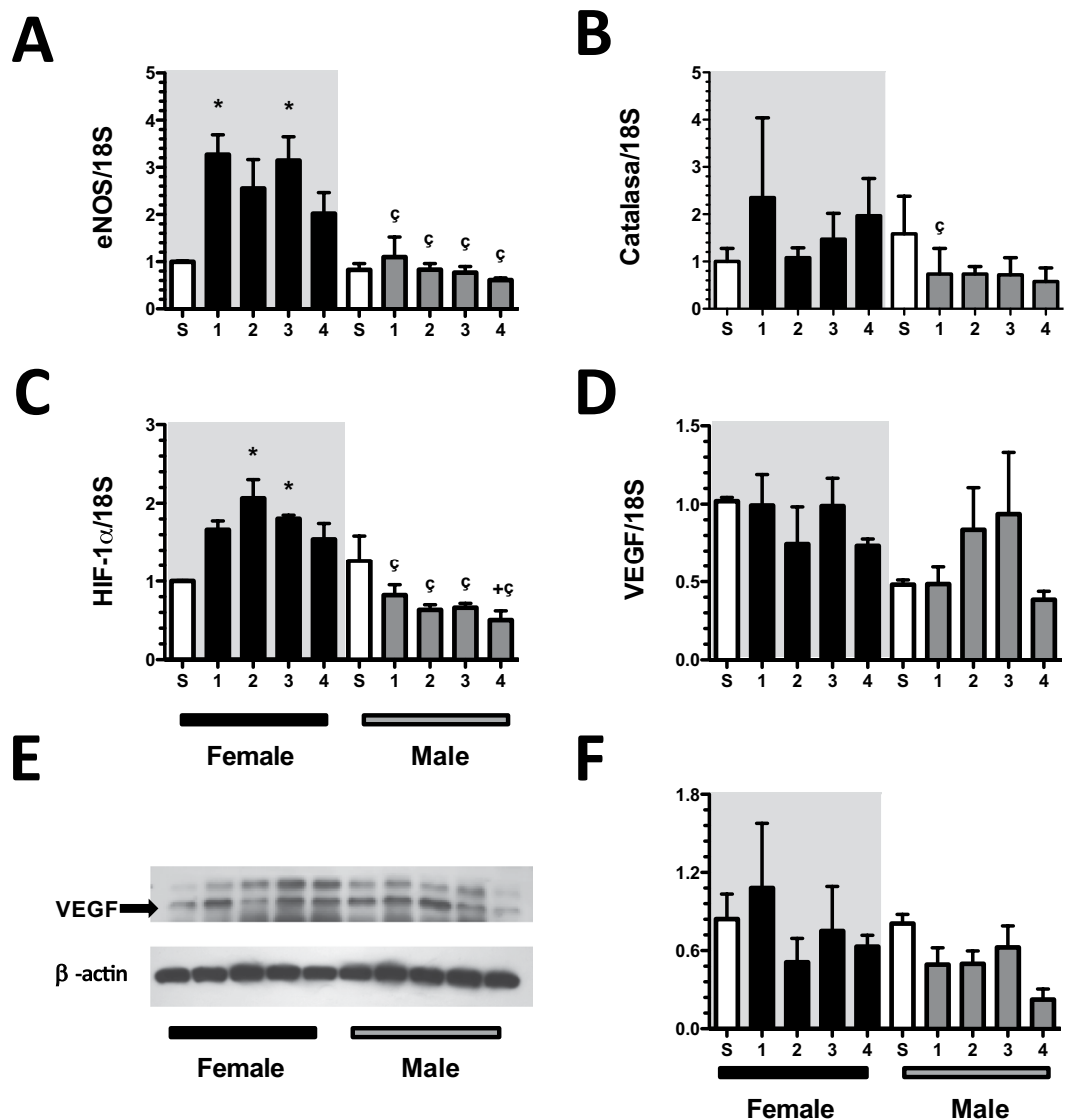


Figure 6. Dimorphic response of some mediators involved in the AKI to CKD transition. (A) eNOS mRNA levels, (B) catalase mRNA levels, (C) HIF1 α mRNA levels, (D) VEGF mRNA levels, (E) Representative autoradiographies of VEGF and β -actin Western Blot analysis, and (F) VEGF protein levels. Female groups are in a gray background, in which sham is represented by white bars and F + IR group in black bars, following by sham male in white bars and M + IR group in gray bars. The mRNA levels were determined at least by duplicate ($n =$ at least 4 per group). Data are shown as mean \pm SE. * $p < 0.05$ vs. Sham female group, + $p < 0.05$ vs. sham male group, and $^{\ddagger}p < 0.05$ vs. F + IR group.

rats, could be exerting a renoprotector effect. In support of this, Klempt *et al.* reported that TGF- β is induced after cerebral ischemia and this rise was associated with post-axial repair⁶⁵. Furthermore, it has been reported that TGF- β anti-inflammatory properties are mediated by promoting polarization of anti-inflammatory Th2 macrophages in cerebral malaria⁶⁶. Therefore, the increment in TGF- β mRNA levels in early stages after ischemia observed in the F + IR group is another beneficial mechanism that females install after the IRI.

In summary, there is a sexual dimorphism in the AKI to CKD transition and the renoprotection observed in the F + IR group was lost with the oophorectomy: These results strongly suggest that female sex hormones are responsible of the renoprotection observed. Within the renoprotective mechanisms that installed females after IRI are: best antioxidant and anti-inflammatory defense, as well as higher HIF1 α and eNOS mRNA levels.

Methods

All experiments involving animals were conducted in accordance with NIH 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 Committees: Comité para el cuidado y uso de animales de laboratorio, Instituto de Investigaciones Biomédicas and for Comité de investigación en animales, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición.

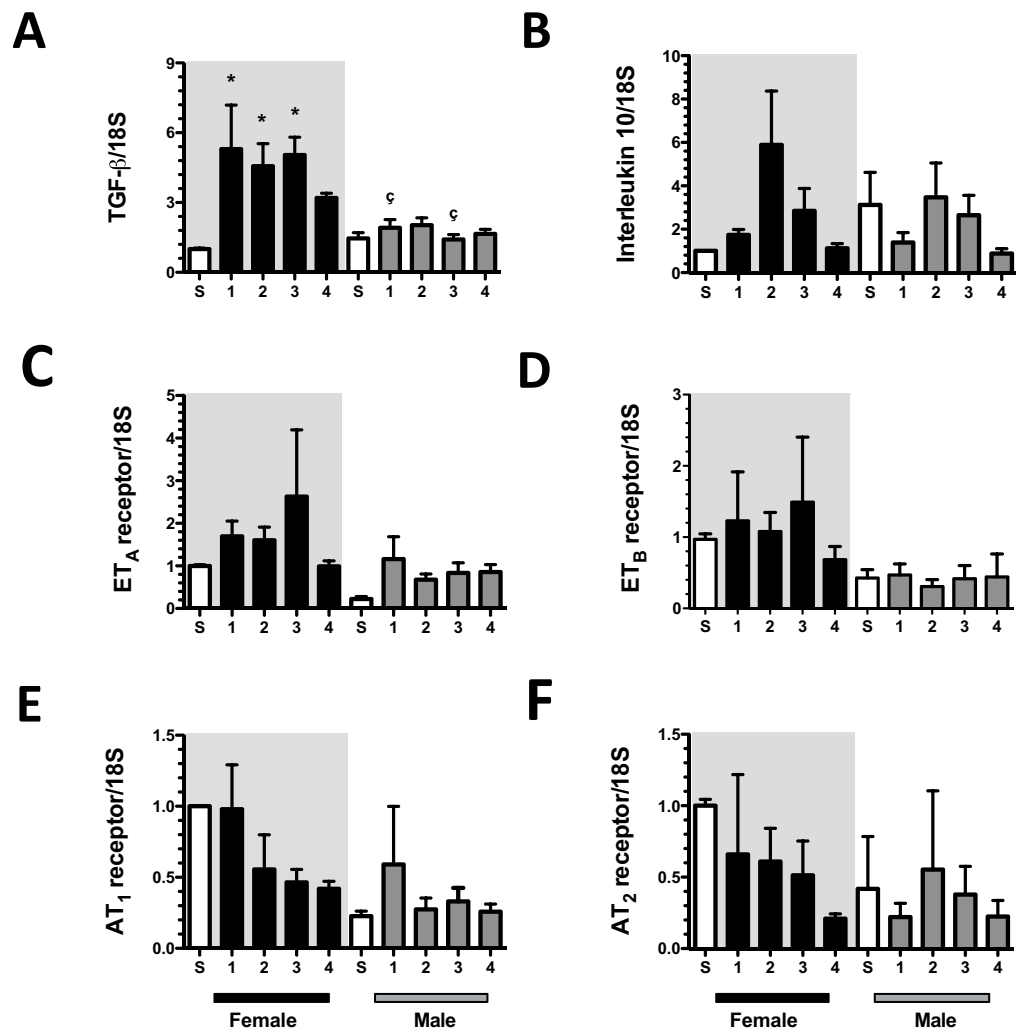


Figure 7. Anti-inflammatory and vasoactive pathways mRNA levels in the dimorphism found in the progression of CKD induced by AKI. (A) TGF- β mRNA levels, (B) Interleukin 10 mRNA levels, (C) ET_A receptor mRNA levels, (D) ET_B receptor mRNA levels, (E) AT₁ receptor mRNA levels, (F) AT₂ receptor mRNA levels. Female groups are in a gray background, in which sham is represented by white bars and F + IR group in black bars, following by sham male in white bars and M + IR group in gray bars. Groups included at least 4 rats per group. Data are shown as mean \pm SE. * $p < 0.05$ vs, Sham female group, † $p < 0.05$ vs. sham male group, and ‡ $p < 0.05$ vs. F + IR group.

Experimental Protocol 1. Thirty-nine female (250–280 g) and thirty-nine (290–310 g) male Wistar rats were included and divided into seven groups: Two groups of control animals underwent sham surgery that were studied and sacrificed at 24-h (5 females and 5 males) and at 4-months (4 females and 4 males); and 5-groups who underwent bilateral renal ischemia for 45 min and were studied at 24-h (6 females and 6 males) and at 1 (5 females and 5 males), 2 (6 females and 6 males), 3 (5 females and 5 males), or 4-months post-ischemia (8 females and 8 males), F + IR and M + IR, respectively. The bilateral renal ischemia in the female rats was performed during the estrogenic phase. This phase was evaluated by vaginal smear, briefly cyclicity was recorded following examination of vaginal smears for the proportions of leucocytes, epithelial cells and cornified cells in the smear. The smears were assessed and cycles identified as described previously⁶⁷.

Experimental Protocol 2. Fifty-five female Wistar rats were oophorectomized at 70 days of age and allowed to evolve 1-month until estrogen levels decreased and were divided into 7-groups: two groups of control animals underwent sham surgery that were studied and sacrificed at 24-h ($n = 8$) and at 4-months ($n = 9$); and five groups who underwent bilateral renal ischemia for 45 min and were studied at 24-h ($n = 8$), and at 1 ($n = 8$), 2 ($n = 6$), 3 ($n = 8$), or 4-months post-ischemia ($n = 8$).

Ischemia/reperfusion model. Rats were anesthetized with an intra-peritoneal injection of sodium pentobarbital (30 mg/kg) and placed on a heating pad to maintain core body temperature at 37°C. Renal pedicles were isolated, and bilateral renal ischemia was induced using a non-traumatic clamp on each renal artery for 45 min.

Reperfusion was achieved by release of the clips and confirmed by return of oxygenated blood to the kidney. The muscle and the skin were closed with 3-0 vicryl and silk sutures, respectively. For sham surgery, laparotomy and renal pedicle dissection, without clamping, was performed in anesthetized rats.

Bilateral Oophorectomy. The animals were anesthetized by intraperitoneal injection of sodium pentobarbital at a dose of 30 mg/Kg and were placed in a heating bed. Double dorsolateral incision was performed and the oviducts were ligated and removed; then, the abdominal wall and skin were sutured. After surgery, the animals remained in the heating bed until their anesthesia recovery. One month after, rats underwent to bilateral renal ischemia (45 min) and studied either, 24-h or 4-months after.

Functional Studies. At the end of the experimental period, rats were anesthetized with sodium pentobarbital (30 mg/kg) and placed on a homeothermic table. The femoral arteries were catheterized with polyethylene tubing (PE-50). The mean arterial pressure (MAP) was monitored with a pressure transducer (model p23 db, Gould) and recorded on a polygraph (Grass Instruments, Quincy, MA). An ultrasound transit-time flow probe (transonic flowprobe, New York, NY) was placed around the left artery and filled with ultrasonic coupling gel (HR Lubricating Jelly, Carter-Wallace, New York, NY) to record the renal blood flow (Transonic flowmeter, New York, NY). Blood samples were taken at the end of the study.

Biochemical Studies. Proteinuria was determined monthly from 24-h urine collections using the turbidimetric method with trichloroacetic acid (TCA) throughout the monthly follow-up in all studied groups.

Urine and serum creatinine concentrations were measured with Quantichrom creatinine assay kit (DICT-500), and renal creatinine clearance was calculated.

Serum estradiol concentrations were determined by radioimmune analysis using a commercial rat kit, (DPC Coat-a-count, TKE21, Diagnostic Products, CA, USA).

Light microscopy analysis. For the light microscopy, the left kidney was perfused through the femoral catheter with PBS and then 4% neutral buffered formalin, and perfusion was continued until fixation was completed, maintaining the MAP that each rat had during the experiment. Renal tissue was paraffin embedded, 3 μ m sections were stained with periodic acid Schiff (PAS) or Sirius red. For the acute study, ten subcortical fields (magnification $\times 100$) were recorded from each kidney slide using a digital camera incorporated in a Nikon Light microscope. The injured tubules were analyzed blindly. Tubular damage was characterized by a loss of brush border, lumen dilation, and detachment from basement membrane. In each microphotograph, injured tubules were counted, and the results were expressed as the average of fields observed. For the chronic study, the glomerular diameter and area was measured in at least 50 glomeruli per rat, as we previously reported²³. For this purpose, ten to fifteen images of different renal cortex fields were recorded (magnification $\times 100$). In another ten images (magnification $\times 400$), tubular width was measured in at least 100 tubules. Tubulointerstitial fibrosis consisted in extra cellular matrix expansion with collagen deposition together with distortion and collapse of the tubules; fibrosis was evidenced by red coloration in Sirius red stained slides. The degree of tubulo-interstitial fibrosis was measured by morphometry in five to eight subcortical fields (magnification $\times 400$). The affected area was delimited and the percentage of tubulo-interstitial fibrosis was calculated by dividing the fibrotic area by the total field area, excluding the glomerular area. All the analyses were performed blinded.

Urinary hydrogen peroxide assay. The amount of hydrogen peroxide (H_2O_2) in urine was determined with an Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit (Invitrogen, Eugene, OR) according to the manufacturer's instructions.

Glutathione (GSH) and glutathione disulfide (GSSG) levels. *Tissue Preparation.* The right kidney was excised and separated into renal cortex and medulla. The sections were maintained in ice-cold saline solution (0.9% NaCl). A 10% whole homogenate was prepared in ice-cold homogenization buffer [154 mM KCl, 5 mM diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA), and 0.1 M potassium phosphate (KPi) buffer, pH 6.8]. Immediately after, one volume of cold acid buffer consisting of 40 mM HCl, 10 mM DTPA, 20 mM ascorbic acid, and 10% trichloroacetic acid (TCA) was added to one volume of homogenate. The suspension was centrifuged at 14,000 rpm and the resulting supernatant solution was maintained at $-70^\circ C$ for at least 4 weeks.

O-phthalaldehyde assay (OPA) Assay Procedure. The following solutions were required to perform the OPA assay: redox quenching buffer (RQB) (20 mM HCl, 5 mM DTPA, 10 mM ascorbic acid); 5% TCA in RQB (TCA-RQB); 7.5 mM N-ethylmaleimide (NEM) in RQB; 1.0 M KPi buffer (pH 7.0); 0.1 M KPi buffer (pH 6.9); 100 mM dithionite (DT; sodium hydrosulfite) in RQB; 5.0 mg/ml OPA in methanol. DT and OPA solutions were prepared immediately before use. Standards were prepared as follows: 0.1 mM GSSG in TCA-RQB; 0.1 mM GSH in TCA-RQB. The trace levels of GSSG were removed by treating 1.0 ml of a 1.0 mM solution of GSH in TCA-RQB with 25 mg of zinc dust. The assays consisted of paired samples labeled A and B. Sample A was the background consisting of non-glutathione-dependent fluorescence that was subtracted from the paired sample B. From GSSG 1 mM stock, 20 μ l was taken and 980 μ l of TCA-RQB was added to make the standard curve. OPA-derived fluorescence was measured at 365-nm excitation (slit width 5 nm) and 430-nm emission (slit width 20 nm)⁶⁸.

eNOS, catalase, HIF1 α , VEGF, ETA, ETB, AT1, AT2, TGF- β , and IL-10 mRNA levels. The right kidney was removed and quickly frozen. The total renal cortex RNA was isolated from the kidneys using the TRIzol method (Invitrogen, Carlsbad, CA) and checked for integrity using 1% agarose gel electrophoresis. To avoid DNA contamination, total RNA samples were treated with DNAase (DNAase I; Invitrogen). Reverse transcription (RT) was carried out with 1 μ g of total RNA and 200 U of Moloney murine leukemia virus reverse

transcriptase (Invitrogen). The mRNA levels eNOS, catalase, HIF1 α , VEGF, ET_A, ET_B, AT₁, AT₂, TGF- β and IL-10 were quantified by real-time PCR on an ABI Prism 7300 Sequence Detection System (TaqMan, ABI, Foster City, CA). Primers and probes were ordered as follows: eNOS (Rn02132634_s1), catalase (Rn00560930_m1), HIF1 α , (Rn0057756_m1), VEGF (Rn01511602_m1), ET_A (Rn00561137_m1), ET_B (Rn00569139_m1), AT₁ (Rn00561409_s1), AT₂ (Rn00560677_s1), TGF- β (Rn00572010_m1), and IL-10 (Rn99999012_m1). As an endogenous control, eukaryotic 18S rRNA (predesigned assay reagent Applied by ABI, external run, Rn03928990_g1) was used. The relative quantification of each gene expression was performed with the comparative threshold cycle (Ct) method.

Renal VEGF protein levels. VEGF protein levels were detected by Western blot, using 30 μ g of protein in 8.5% SDS-PAGE electrophoresis gel and electroblotted. The membranes were incubated with mouse anti-VEGF antibody (1:1000, ThermoScientific) overnight. Next, the membranes were incubated with a secondary antibody and HRP-conjugated anti-mouse IgG (1:5000, Santa Cruz Biotechnology). The proteins were detected with an enhanced chemiluminescence kit (Millipore) and by radiography. All Western blot analyses were performed within the linear range of protein loads and antibody use. The bands were scanned for densitometric analysis using the UVP EC3 Imaging System and the UVP VisionWorks LS Image acquisition and Analysis Software.

Urinary Hsp72 levels. Urinary Hsp72 levels were detected by Western blot, each urine was diluted 1:10 in 0.9% saline solution, and 10 μ L of each dilution was loaded and resolved by 8.5% SDS-PAGE electrophoresis and electroblotted. The membranes were incubated with mouse anti-Hsp72 antibody (ENZO Life Sciences, 1:5000 dilution) for 2-h and then incubated with a secondary antibody, HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (1:5000, Santa Cruz Biotechnology). The proteins were detected using a commercial chemiluminescence kit (Millipore).

Statistical analysis. The results are presented as the mean \pm SE. The differences among the four studied groups at 24-h and 4-months were assessed by ANOVA using the Bonferroni correction for multiple comparisons. All comparisons passed the normality test. The differences in the ranks of glomerular diameters among the groups were evaluated by contingency analysis, and the differences were assessed using the chi-squared test with the Yates correction. Statistical significance was defined when the p value was <0.05 .

The data generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

References

- Kelly, K. J. Acute renal failure: much more than a kidney disease. *Semin. Nephrol.* **26**, 105–113 (2006).
- Zappitelli, M. Epidemiology and diagnosis of acute kidney injury. *Semin. Nephrol.* **28**, 436–446 (2008).
- Friedewald, J. J. & Rabb, H. Inflammatory cells in ischemic acute renal failure. *Kidney Int.* **66**, 486–491 (2004).
- Lafrance, J. P. & Miller, D. R. Acute kidney injury associates with increased long-term mortality. *J. Am. Soc. Nephrol.* **21**, 345–352 (2010).
- Go, A. S. *et al.* The assessment, serial evaluation, and subsequent sequelae of acute kidney injury (ASSESS-AKI) study: design and methods. *BMC. Nephrol.* **11**, 22 (2010).
- Basile, D. P. The endothelial cell in ischemic acute kidney injury: implications for acute and chronic function. *Kidney Int.* **72**, 151–156 (2007).
- Basile, D. P. *et al.* Impaired endothelial proliferation and mesenchymal transition contribute to vascular rarefaction following acute kidney injury. *Am. J. Physiol Renal Physiol* **300**, F721–F733 (2011).
- Bonventre, J. V. & Yang, L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J. Clin. Invest* **121**, 4210–4221 (2011).
- Le, D. M., Legrand, M., Payen, D. & Ince, C. The role of the microcirculation in acute kidney injury. *Curr. Opin. Crit Care* **15**, 503–508 (2009).
- Molitoris, B. A., Dahl, R. & Geerdes, A. Cytoskeleton disruption and apical redistribution of proximal tubule Na(+)-K(+)-ATPase during ischemia. *Am. J. Physiol* **263**, F488–F495 (1992).
- Bedford, M., Farmer, C., Levin, A., Ali, T. & Stevens, P. Acute kidney injury and CKD: chicken or egg? *Am. J. Kidney Dis.* **59**, 485–491 (2012).
- Lozano, R. *et al.* Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* **380**, 2095–2128 (2012).
- Ferenbach, D. A. & Bonventre, J. V. Mechanisms of maladaptive repair after AKI leading to accelerated kidney ageing and CKD. *Nat. Rev. Nephrol.* **11**, 264–276 (2015).
- Chawla, L. S., Eggers, P. W., Star, R. A. & Kimmel, P. L. Acute kidney injury and chronic kidney disease as interconnected syndromes. *N. Engl. J. Med.* **371**, 58–66 (2014).
- Block, C. A. & Schoolwerth, A. C. Acute renal failure: outcomes and risk of chronic kidney disease. *Minerva Urol. Nefrol.* **59**, 327–335 (2007).
- Hsu, C. Y. *et al.* The risk of acute renal failure in patients with chronic kidney disease. *Kidney Int.* **74**, 101–107 (2008).
- Venkatachalam, M. A. *et al.* Acute kidney injury: a springboard for progression in chronic kidney disease. *Am. J. Physiol Renal Physiol* (2010).
- Lewington, A. J., Cerda, J. & Mehta, R. L. Raising awareness of acute kidney injury: a global perspective of a silent killer. *Kidney Int.* **84**, 457–467 (2013).
- Basile, D. P. Rarefaction of peritubular capillaries following ischemic acute renal failure: a potential factor predisposing to progressive nephropathy. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **13**, 1–7 (2004).
- Horbelt, M. *et al.* Acute and chronic microvascular alterations in a mouse model of ischemic acute kidney injury. *Am. J. Physiol Renal Physiol* **293**, F688–F695 (2007).
- Chen, J. *et al.* EGFR signaling promotes TGF β -dependent renal fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **23**, 215–224 (2012).
- Tanaka, S., Tanaka, T. & Nangaku, M. Hypoxia and Dysregulated Angiogenesis in Kidney Disease. *Kidney Dis (Basel)*. **1**, 80–89 doi:10.1159/000381515 (2015).
- Rodriguez-Romo, R. *et al.* AT1 receptor antagonism before ischemia prevents the transition of acute kidney injury to chronic kidney disease. *Kidney Int* **89**, 363–373, doi:10.1038/ki.2015.320 (2016).
- Bechtel, W. *et al.* Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney. *Nat. Med.* **16**, 544–550 (2010).
- Yang, L., Besschetnova, T. Y., Brooks, C. R., Shah, J. V. & Bonventre, J. V. Epithelial cell cycle arrest in G2/M mediates kidney fibrosis after injury. *Nat. Med.* **16**, 535–543, 531p (2010).

26. Barrera-Chimal, J. *et al.* Spironolactone prevents chronic kidney disease caused by ischemic acute kidney injury. *Kidney Int.* **83**, 93–103 (2013).
27. Neugarten, J., Acharya, A. & Silbiger, S. R. Effect of gender on the progression of nondiabetic renal disease: a meta-analysis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **11**, 319–329 (2000).
28. Evans, M. *et al.* The natural history of chronic renal failure: results from an unselected, population-based, inception cohort in Sweden. *Am. J. Kidney Dis.* **46**, 863–870 (2005).
29. Eriksen, B. O. & Ingebretsen, O. C. The progression of chronic kidney disease: a 10-year population-based study of the effects of gender and age. *Kidney Int.* **69**, 375–382 (2006).
30. Verhave, J. C. *et al.* Cardiovascular risk factors are differently associated with urinary albumin excretion in men and women. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**, 1330–1335 (2003).
31. Barrera-Chimal, J. *et al.* Hsp72 is an early and sensitive biomarker to detect acute kidney injury. *EMBO Mol. Med.* **3**, 5–20 (2011).
32. Barrera-Chimal, J. *et al.* Mild ischemic Injury Leads to Long-Term Alterations in the Kidney: Amelioration by Spironolactone Administration. *Int. J. Biol. Sci.* **11**, 892–900 (2015).
33. Cattran, D. C. *et al.* The impact of sex in primary glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* **23**, 2247–2253, doi:10.1093/ndt/gfm919 (2008).
34. Attia, D. M. *et al.* Male gender increases sensitivity to renal injury in response to cholesterol loading. *Am. J. Physiol Renal Physiol* **284**, F718–F726 (2003).
35. Catanuto, P. *et al.* 17 beta-estradiol and tamoxifen upregulate estrogen receptor beta expression and control podocyte signaling pathways in a model of type 2 diabetes. *Kidney Int.* **75**, 1194–1201 (2009).
36. Erdely, A., Greenfeld, Z., Wagner, L. & Baylis, C. Sexual dimorphism in the aging kidney: Effects on injury and nitric oxide system. *Kidney Int.* **63**, 1021–1026 (2003).
37. Metcalfe, P. D. *et al.* Testosterone exacerbates obstructive renal injury by stimulating TNF-alpha production and increasing proapoptotic and profibrotic signaling. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* **294**, E435–E443 (2008).
38. Muller, V. *et al.* Sexual dimorphism in renal ischemia-reperfusion injury in rats: possible role of endothelin. *Kidney Int.* **62**, 1364–1371 (2002).
39. Park, K. M., Kim, J. I., Ahn, Y., Bonventre, A. J. & Bonventre, J. V. Testosterone is responsible for enhanced susceptibility of males to ischemic renal injury. *J. Biol. Chem.* **279**, 52282–52292 (2004).
40. Pechere-Bertschi, A. & Burnier, M. Gonadal steroids, salt-sensitivity and renal function. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **16**, 16–21, doi:10.1097/MNH.0b013e328011d7f6 (2007).
41. Robert, R. *et al.* Gender difference and sex hormone production in rodent renal ischemia reperfusion injury and repair. *J. Inflamm. (Lond)* **8**, 14 (2011).
42. Verhagen, A. M., Attia, D. M., Koomans, H. A. & Joles, J. A. Male gender increases sensitivity to proteinuria induced by mild NOS inhibition in rats: role of sex hormones. *Am. J. Physiol Renal Physiol* **279**, F664–F670 (2000).
43. Fekete, A. *et al.* Sex differences in heat shock protein 72 expression and localization in rats following renal ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol Renal Physiol* **291**, F806–F811 (2006).
44. Bazzano, T., Restel, T. I., Porfirio, L. C., Souza, A. S. & Silva, I. S. Renal biomarkers of male and female Wistar rats (*Rattus norvegicus*) undergoing renal ischemia and reperfusion. *Acta Cir Bras* **30**, 277–288, doi:10.1590/S0102-865020150040000007 (2015).
45. Fekete, A. *et al.* Sex differences in the alterations of Na(+), K(+)-ATPase following ischaemia-reperfusion injury in the rat kidney. *J Physiol* **555**, 471–480, doi:10.1113/jphysiol.2003.054825 (2004).
46. Moslemi, F. *et al.* Effect of angiotensin II type 1 receptor blockade on kidney ischemia/reperfusion; a gender-related difference. *J Renal Inj Prev* **5**, 140–143, doi:10.15171/jrip.2016.29 (2016).
47. Takayama, J. *et al.* Actinonin, a meprin inhibitor, protects ischemic acute kidney injury in male but not in female rats. *Eur J Pharmacol* **581**, 157–163, doi:10.1016/j.ejphar.2007.11.044 (2008).
48. Afyouni, N. E. *et al.* Preventive Role of Endothelin Antagonist on Kidney Ischemia: Reperfusion Injury in Male and Female Rats. *Int J Prev Med* **6**, 128, doi:10.4103/2008-7802.172549 (2015).
49. Iran-Nejad, A., Nematbakhsh, M., Eshraghi-Jazi, F. & Talebi, A. Preventive role of estradiol on kidney injury induced by renal ischemia-reperfusion in male and female rats. *Int J. Prev. Med* **6**, 22 (2015).
50. Aryamanesh, S., Ebrahimi, S. M., Abotaleb, N., Nobakht, M. & Rahimi-Moghaddam, P. Role of endogenous vitamin E in renal ischemic preconditioning process: differences between male and female rats. *Iran Biomed J* **16**, 44–51 (2012).
51. Giergiel, M., Lopucki, M., Stachowicz, N. & Kankofer, M. The influence of age and gender on antioxidant enzyme activities in humans and laboratory animals. *Aging Clin Exp Res* **24**, 561–569, doi:10.3275/8587 (2012).
52. Silbiger, S. R. & Neugarten, J. The impact of gender on the progression of chronic renal disease. *Am. J. Kidney Dis.* **25**, 515–533 (1995).
53. Singh, A. P., Singh, N. & Singh Bedi, P. M. Estrogen attenuates renal IRI through PPAR-gamma agonism in rats. *J Surg Res* **203**, 324–330, doi:10.1016/j.jss.2016.02.038 (2016).
54. Sugishita, K., Li, F., Su, Z. & Barry, W. H. Anti-oxidant effects of estrogen reduce [Ca2+] during metabolic inhibition. *J Mol Cell Cardiol.* **35**, 331–336 (2003).
55. Ji, H. *et al.* Sex differences in renal injury and nitric oxide production in renal wrap hypertension. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **288**, H43–H47 (2005).
56. Shoji, K., Tanaka, T. & Nangaku, M. Role of hypoxia in progressive chronic kidney disease and implications for therapy. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **23**, 161–168 (2014).
57. Tanaka, S., Tanaka, T. & Nangaku, M. Hypoxia as a key player in the AKI-to-CKD transition. *Am J Physiol Renal Physiol* **307**, F1187–1195, doi:10.1152/ajprenal.00425.2014 (2014).
58. Fliegner, D. *et al.* Female sex and estrogen receptor-beta attenuate cardiac remodeling and apoptosis in pressure overload. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **298**, R1597–1606, doi:10.1152/ajpregu.00825.2009 (2010).
59. Maric, C., Sandberg, K. & Hinojosa-Laborde, C. Glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis are attenuated with 17beta-estradiol in the aging Dahl salt sensitive rat. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**, 1546–1556 (2004).
60. Catanuto, P. *et al.* In vivo 17beta-estradiol treatment contributes to podocyte actin stabilization in female db/db mice. *Endocrinology* **153**, 5888–5895 (2012).
61. Meng, X. M., Nikolic-Paterson, D. J. & Lan, H. Y. TGF-beta: the master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol* **12**, 325–338, doi:10.1038/nrneph.2016.48 (2016).
62. Ziyadeh, F. N. *et al.* Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression, and glomerular mesangial matrix expansion by treatment with monoclonal antitransforming growth factor-beta antibody in db/db diabetic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 8015–8020 (2000).
63. Ma, L.-J. *et al.* Divergent effects of low versus high dose anti-TGF- β 2 antibody in puromycin aminonucleoside nephropathy in rats. *Kidney International* **65**(1), 106–115 (2004).
64. Wang, W. *et al.* Signaling mechanism of TGF-beta1 in prevention of renal inflammation: role of Smad7. *J Am Soc Nephrol* **16**, 1371–1383, doi:10.1681/ASN.2004121070 (2005).
65. Klempt, N. D. *et al.* Hypoxia-ischemia induces transforming growth factor beta 1 mRNA in the infant rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* **13**, 93–101 (1992).

66. Hunt, N. H. & Grau, G. E. Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends Immunol* **24**, 491–499 (2003).
67. Rosa, E. S. A., Guimaraes, M. A., Padmanabhan, V. & Lara, H. E. Prepubertal administration of estradiol valerate disrupts cyclicity and leads to cystic ovarian morphology during adult life in the rat: role of sympathetic innervation. *Endocrinology* **144**, 4289–4297, doi:10.1210/en.2003-0146 (2003).
68. Senft, A. P., Dalton, T. P. & Shertzer, H. G. Determining glutathione and glutathione disulfide using the fluorescence probe o-phthalaldehyde. *Anal Biochem* **280**, 80–86, doi:10.1006/abio.2000.4498 (2000).

Acknowledgements

The results presented in this paper have not been published previously in whole or in part, except as an abstract presented at the World Congress of Nephrology 2017 (Mexico City, Mexico). This project was 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 study was performed in partial fulfillment of the requirements for the PhD degree in the Biochemical Sciences of ILP at Universidad Nacional Autónoma de México and was supported by a scholarship from CONACyT-Mexico. We are grateful to Dr. Mariela Contreras for her helping with the animal care.

Author Contributions

I.L.P., E.Z. and N.A.B.: conceived and design the study. I.L.P., C.P.C., R.P.V., F.F., R.R.R., R.P., and G.R.G.: performed the experiments, C.P.C. and N.A.B.: histopathological analysis. I.L.P. and A.S.N.: Oxidative stress analysis. I.L.P., E.Z. and N.A.B.: analyzed the data. N.A.B. and G.G.: contributed reagents or analysis tools. I.L.P., G.G. and N.A.B.: wrote the article.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at doi:10.1038/s41598-017-09630-2

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017