



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**Intervenciones Nutricionales para Reducir la Lesión Renal  
Isquémica Experimental**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

Pedro Rojas Morales

TUTOR PRINCIPAL

Dr. José Pedraza Chaverri

Facultad de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Verónica Guarner Lans

Instituto Nacional de Cardiología

Dr. Armando Roberto Tovar Palacios

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición

Ciudad de México. Marzo, 2022



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

Durante los estudios de posgrado se contó con el apoyo de:

- 1) Los proyectos PAPIIT IN202219 y IN200922, PAIP 5000-9105 y CONACYT A1-S7495.
- 2) La beca CONACYT (CVU 632340).
- 3) El Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) para asistir al congreso "21st International Conference on Antioxidants" en junio del 2019 en la ciudad de París, Francia.

Se agradece la valiosa asesoría del Comité Tutor:

Dr. José Pedraza Chaverri.

Dra. Verónica Guarner Lans.

Dr. Armando Roberto Tovar Palacios.

Y también del Jurado de Examen:

Dr. Samuel Canizales Quinteros.

Dra. Gladis del Carmen Fragoso González.

Dr. Rolando Efraín Hernández Muñoz.

Dr. Mauricio Díaz Muñoz.

Dra. Aliesha González Arenas.

Se agradece enormemente la ayuda técnica de la Dra. Edilia Tapia del INC Ignacio Chávez, de Omar Noel Medina Campos de la Facultad de Química y de Juan Carlos León Contreras del INCMN Salvador Zubirán.

# CONTENIDO

<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	4
1.1 El riñón y la lesión renal por isquemia y reperfusión	4
1.1.1 <i>El riñón: Estructura y función</i>	4
1.1.2 <i>La lesión renal aguda y la enfermedad renal crónica</i>	5
1.1.3 <i>La lesión renal isquémica</i>	8
1.2 El ayuno e intervenciones nutricionales	11
1.2.1 <i>La adaptación metabólica al ayuno</i>	11
1.2.2 <i>La restricción del alimento y sus beneficios</i>	12
1.2.3 <i>Mecanismos moleculares involucrados en la restricción del alimento</i>	14
1.2.4 <i>La dieta cetogénica y los cuerpos cetónicos</i>	16
<b>2 ANTECEDENTES</b>	17
<b>3 JUSTIFICACIÓN</b>	18
<b>4 HIPÓTESIS</b>	18
<b>5 OBJETIVOS</b>	18
<b>6 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	19
6.1 Reactivos	19
6.2 Animales de experimentación	19
6.3 Intervenciones nutricionales	19
6.4 Modelos de isquemia y reperfusión	20
6.5 Protocolos experimentales	21
6.6 Sacrificio y obtención de muestras	22
6.7 Parámetros bioquímicos en sangre y plasma	23
6.8 Consumo del oxígeno y potencial de membrana mitocondrial	23
6.9 Carbonilación de proteínas	23
6.10 Actividad de enzimas antioxidantes	24
6.11 Histología	24
6.12 Microscopía electrónica	25
6.13 Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia	25
6.14 Western Blot	25
6.15 Análisis estadístico	26
<b>7 RESULTADOS</b>	27
7.1 Cambios metabólicos inducidos por la dieta	27
7.2 El ayuno preoperatorio previene la lesión renal isquémica	27
7.3 El ayuno reduce el estrés oxidante y la disfunción mitocondrial	27
7.4 El ayuno reduce la fibrosis en la fase crónica	31
7.5 El ayuno reduce el estrés oxidante y el daño mitocondrial en la fase crónica	32
7.6 La TRF protege contra la lesión renal isquémica	33
7.7 La TRF reduce el estrés oxidante y la fragmentación mitocondrial	35
7.8 La TRF reduce la fibrosis en la fase crónica de la lesión	37
7.9 La KD previene la lesión renal isquémica	38
7.10 La KD reduce el estrés oxidante y la inflamación	39
7.11 La KD previene la disfunción renal y la fibrosis en la fase crónica	41
7.12 Resumen de datos	42
<b>8 DISCUSIÓN</b>	43
<b>9 CONCLUSIÓN</b>	47
<b>10 PERSPECTIVAS</b>	48
<b>11 REFERENCIAS</b>	49

## ABREVIATURAS

<b>3-NT</b>	3-Nitrotirosina
<b>4-HNE</b>	4-Hidroxinonenal
<b>8-OHdG</b>	8-Hidroxi-2-desoxiguanina
<b><math>\alpha</math>SMA</b>	Alfa actina de músculo liso
<b>AMPK</b>	Cinasa de proteínas activada por AMP
<b>AKI</b>	Lesión renal aguda
<b>ATP5a</b>	Subunidad 5a de la ATP sintasa
<b>CCL2</b>	Ligando 2 de la quimiocina CC
<b>CKD</b>	Enfermedad renal crónica
<b>DRP1</b>	Proteína relacionada a la dinamina 1
<b>ESRD</b>	Enfermedad renal terminal
<b>FN</b>	Fibronectina
<b>GPx</b>	Glutación peroxidasa
<b>GSH</b>	Glutación
<b>GST</b>	Glutación S-transferasa
<b>IGF1</b>	Factor de crecimiento similar a la insulina 1
<b>IL6</b>	Interleucina 6
<b>IR</b>	Isquemia y reperfusión
<b>KD</b>	Dieta cetogénica
<b>KIM-1</b>	Molécula de lesión renal 1
<b>MFN2</b>	Mitofusina 2
<b>mTOR</b>	Blanco mecanicista de rapamicina
<b>NRF2</b>	Factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2
<b>PGC1<math>\alpha</math></b>	Coactivador 1 alfa del receptor activado por proliferares del peroxisoma
<b>RONS</b>	Especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>TGF<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante beta
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>TRF</b>	Restricción temporal del alimento

## RESUMEN

La lesión renal isquémica es una condición médica resultante de la interrupción transitoria del flujo sanguíneo renal, para la cual no existen tratamientos efectivos más allá del cuidado de soporte y la terapia de remplazo renal. Su fisiopatología es compleja e involucra varios procesos tales como el estrés oxidante, la disfunción mitocondrial y la activación de la respuesta inflamatoria, que juntos, al amplificarse mutuamente, contribuyen al daño tubular y la progresión de la lesión hacia fibrosis y la degeneración progresiva del tejido renal funcional. En la búsqueda de nuevas estrategias para prevenir la lesión renal isquémica, en este trabajo se investigó el efecto de tres intervenciones nutricionales (el ayuno prolongado, la restricción temporal del alimento y la dieta cetogénica) en la lesión renal aguda inducida por isquemia y reperfusión y el desarrollo de fibrosis intersticial.

En primera instancia, comprobamos que el ayuno preoperatorio de tres días previene la lesión renal por isquemia y reperfusión en ratas, tal como ya previamente se había reportado en ratones. Sin embargo, demostramos que el ayuno es capaz de reducir el estrés oxidante y la disfunción mitocondrial en la fase aguda de la lesión, y que esto probablemente resulta en la protección contra el desarrollo de fibrosis renal en etapas tardías. Con la idea de reemplazar al ayuno con una intervención nutricional menos severa, se estudió la restricción temporal del alimento. Con este protocolo, en el cual las ratas se alimentaron por dos horas al día durante una semana, también se previno la lesión renal isquémica y hubo protección contra el estrés oxidante y el daño mitocondrial. Por otro lado, la dieta cetogénica, proporcionada ad libitum durante 3 días antes de la cirugía, resultó también en la protección contra la lesión renal isquémica. Hubo además protección contra el estrés oxidante y se redujo la inflamación en el tejido lesionado. Con esta tesis, se concluye que el resultado de la lesión renal isquémica se puede mejorar a través de la implementación de modificaciones en la dieta. Estas intervenciones nutricionales, ya sea con o sin privación del alimento, repercuten importantemente en la homeostasis redox, la estructura y la función mitocondrial y la respuesta inflamatoria en la lesión renal isquémica.

## **ABSTRACT**

Ischemic kidney injury is a medical condition resulting from transient interruption of the normal renal blood flow, for which there are no effective treatment beyond supportive care and renal replacement therapy. The pathophysiology of ischemic kidney injury is complex and involves several processes such as oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and activation of the inflammatory response, which together, by amplifying each other, contribute to tubular damage, renal fibrosis development, and progressive kidney disease. In searching for new strategies to prevent ischemic kidney injury, in this work, we investigated the effect of three nutritional interventions (prolonged fasting, time-restricted feeding, and the ketogenic diet) on ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury and interstitial fibrosis development.

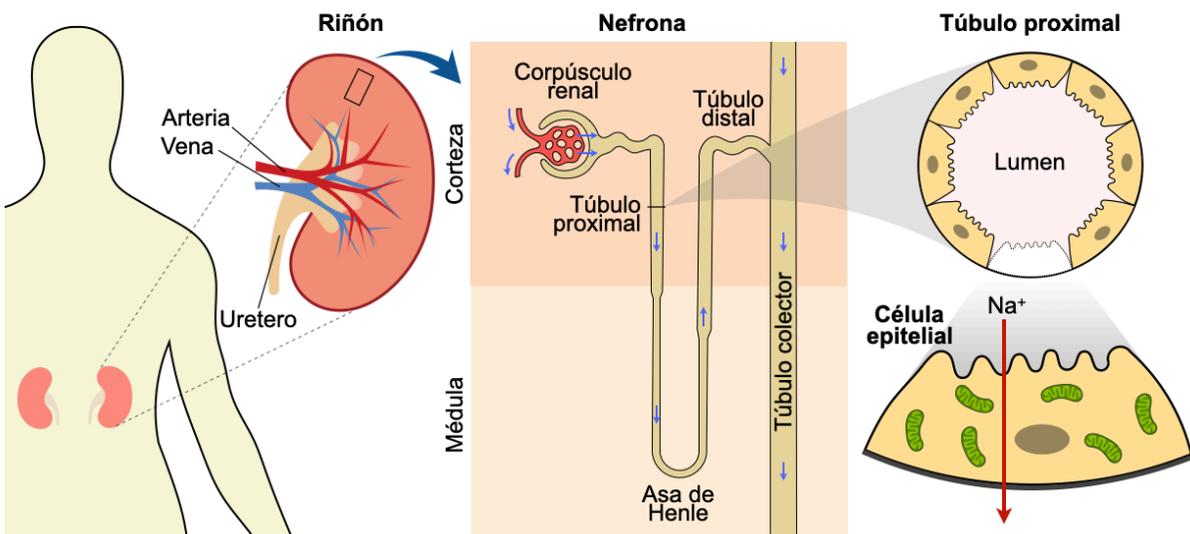
In the first place, we corroborated that 3-day fasting prevents ischemic kidney injury in rats, as previously reported in mice. Yet, we demonstrated that fasting reduces oxidative stress and mitochondrial dysfunction in early acute tissue injury and that this likely causes protection against renal fibrosis development at later times. With the idea of replacing prolonged fasting with a less severe nutritional intervention, we focused on time-restricted feeding. With this protocol, wherein rats were fed for 2 hours a day over a week, we also observed protection against ischemic kidney injury, oxidative stress, and mitochondrial damage. On the other hand, the ketogenic diet, provided ad libitum for 3 days before surgery, also protected against ischemic kidney injury. The ketogenic diet caused protection against oxidative stress and inflammation in renal tissue. We conclude that dietary modifications can improve the outcome of ischemic kidney injury. These nutritional interventions, involving food deprivation or not, modulate redox homeostasis, mitochondrial structure and function, and inflammatory response in ischemic kidney injury.

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 El riñón y la lesión renal por isquemia y reperfusión

### 1.1.1 El riñón: Estructura y función.

Los riñones son dos estructuras similares posicionadas en la cavidad abdominal y detrás del peritoneo que cumplen varias funciones tales como el mantenimiento del equilibrio hídrico y salino, la eliminación de sustancias de desecho, la regulación de la presión arterial y la síntesis de hormonas y distintos intermediarios metabólicos [1]. En una persona adulta, cada riñón se compone de alrededor de un millón de minúsculas estructuras individuales llamadas nefronas que trabajan conjuntamente para filtrar la sangre, eliminar distintos productos de desecho, recuperar los componentes esenciales y finalmente formar la orina. Cada nefrona consta de cuatro estructuras definidas conectadas entre sí: el corpúsculo renal, el túbulo proximal, el asa de Henle y el túbulo contorneado distal (**Figura 1**). A su vez, varias nefronas drenan en un túbulo colector compartido [1,2].



**Figura 1. La estructura y la función del riñón.**

El riñón está formado por miles de diminutas estructuras en forma de “U” llamadas nefronas, quienes filtran la sangre y forman la orina. Cada nefrona consta de un corpúsculo renal, un túbulo proximal, el asa de Henle y el túbulo distal. A través de estas estructuras viaja el ultrafiltrado glomerular hacia un túbulo colector compartido por varias nefronas. En las células epiteliales del túbulo proximal se reabsorbe la mayor cantidad del sodio filtrado para regresar nuevamente a la sangre, y es por esta razón principalmente que el transporte de sodio demanda un consumo alto de energía, que deriva esencialmente de la fosforilación oxidativa mitocondrial.

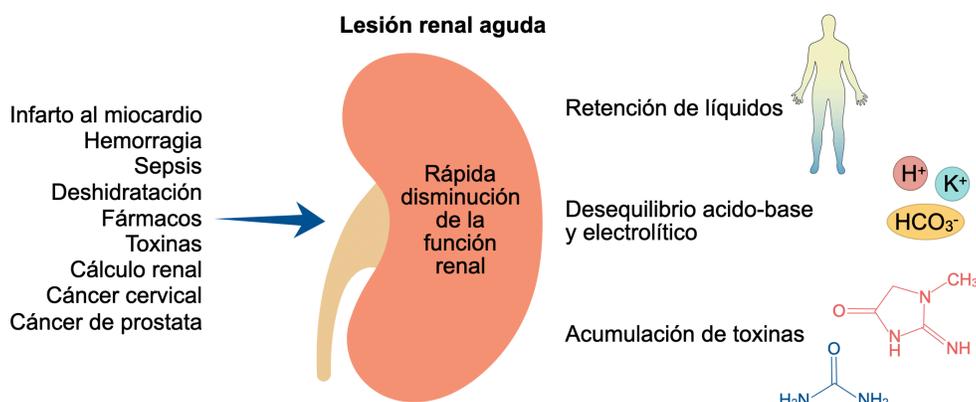
En el corpúsculo renal, formado por el glomérulo y la cápsula de Bowman, ocurre la filtración de los distintos componentes no celulares de la sangre pero se retienen macromoléculas como la mayoría de las proteínas plasmáticas. En los distintos segmentos que conforman el túbulo, principalmente la porción proximal, se reabsorben muchos de los metabolitos que cruzan la barrera glomerular tales como la glucosa, los aminoácidos y otros solutos como el sodio. Sin embargo, las células epiteliales que conforman los túbulos también secretan hacia el lumen de estos una gran cantidad de moléculas provenientes de los capilares peritubulares, tales como la urea y la creatinina, que son productos de desecho derivados del catabolismo de los aminoácidos en el hígado y de la creatina en el músculo, respectivamente. En el túbulo distal, en cambio, se reabsorbe la mayor cantidad del agua para concentrar el ultrafiltrado glomerular y formar de 1 a 2 litros de orina al día [1,2].

El riñón, tal como cualquier órgano del cuerpo, depende del suministro constante de nutrientes y del oxígeno para satisfacer sus requerimientos energéticos y llevar a cabo sus funciones [1]. Particularmente demanda mucha energía para mantener el transporte tubular y así reabsorber la mayoría de los solutos filtrados. El riñón es un órgano flexible que puede usar ácidos grasos, lactato, glutamina y, en menor medida, glucosa en condiciones de abundante comida, sin embargo durante el ayuno también puede usar glicerol y cuerpos cetónicos [3]. Las células epiteliales del túbulo proximal requieren de una cantidad elevada de energía para recuperar, casi en su totalidad, el sodio del lumen tubular mediante transporte activo y enviarlo devuelta a la circulación general [4]. Esta energía deriva esencialmente de la fosforilación oxidativa mitocondrial, por lo que las células epiteliales del túbulo proximal presentan un número elevado de mitocondrias, las cuales son bastante alargadas y se distribuyen por todo el citoplasma de las células epiteliales, pero particularmente se concentran cerca de la membrana basolateral [4]. Probablemente esta sea la razón por la cual el riñón es uno de los órganos metabólicamente más activos y es quien recibe mayor flujo sanguíneo por unidad de peso (más del 20% del gasto cardiaco).

### **1.1.2 La lesión renal aguda y la enfermedad renal crónica**

La lesión renal aguda (AKI: acute kidney injury) es una condición médica que afecta aproximadamente a 13 millones de personas en el mundo cada año; se estima que al

menos el 10% de los pacientes hospitalizados y más del 50% de los pacientes remitidos a cuidados intensivos presentan esta patología. Se define como la rápida disminución de la función renal en algunas cuantas horas o días y puede llegar a comprometer la salud y la vida de los individuos [5,6]. Existen múltiples factores que pueden perturbar la fisiología renal y provocar AKI, tales como el infarto al miocardio, la sepsis, las hemorragias, la deshidratación severa, el uso de altas dosis de algunos fármacos, la exposición a distintas toxinas ambientales y metales pesados y la obstrucción de las vías urinarias (**Figura 2**) [7,8].



**Figura 2. La lesión renal aguda.**

La lesión renal aguda es un síndrome que se induce por diversas causas y resulta en alteraciones sistémicas tales como la pérdida del control del volumen y el líquido extracelular, el desequilibrio electrolítico y salino y también la acumulación de sustancias de desecho como la urea y la creatinina.

Dada la función renal, un episodio de AKI resulta en la retención de agua, el desequilibrio ácido-base y salino y la acumulación de desechos nitrogenados como la urea y la creatinina (**Figura 2**). En determinadas circunstancias la AKI puede pasar desapercibida debido a que el insulto a los riñones es leve y que rápidamente se logra la reparación completa del daño. En cambio, dada una agresión severa el riñón puede no recuperarse completamente y propiciar el desarrollo de enfermedad renal crónica (CKD: chronic kidney disease) [9]. En el extremo, la lesión puede ser lo suficientemente agresiva y súbita provocando la pérdida total de la función renal dando origen a la

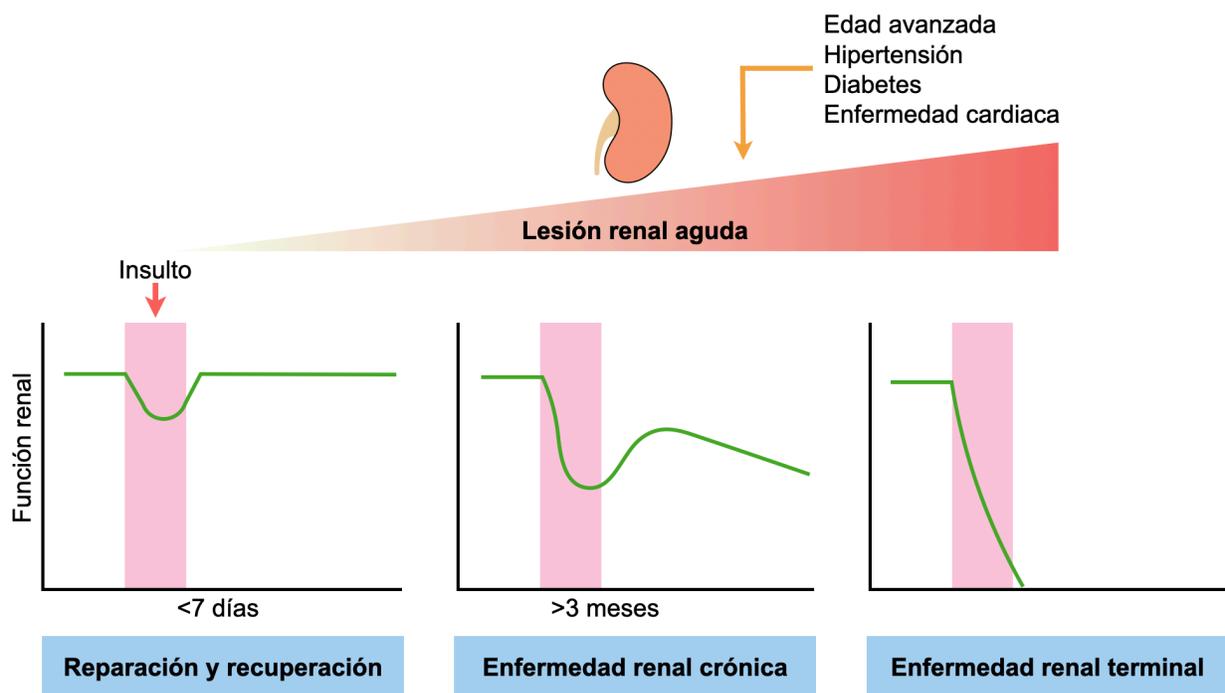
enfermedad renal terminal (ESRD: end-stage renal disease). Existen múltiples factores que pueden acentuar la AKI, siendo la edad avanzada y la presencia de comorbilidades como la hipertensión, la diabetes mellitus y distintos problemas cardiovasculares los principales (**Figura 3**) [5-9].

La CKD, en cambio, se define como la pérdida gradual de la función renal en el transcurso de varios meses o años y afecta entre el 8 y el 16% de la población adulta. Se caracteriza por la pérdida progresiva e irreversible de nefronas y el desarrollo de fibrosis intersticial y glomeruloesclerosis, acompañada frecuentemente de distintas complicaciones sistémicas tales como hipertensión, osteodistrofia, anemia, uremia, sarcopenia, acidosis metabólica, entre otras. Aunque la CKD puede resultar como consecuencia de uno o varios episodios de AKI, a nivel mundial las tres principales causas de CKD son la diabetes mellitus, la hipertensión y la glomerulonefritis [10-12]. No obstante, un episodio de AKI en pacientes con una función renal comprometida puede precipitar la transición de CKD a ESRD [13].

Actualmente, las estrategias terapéuticas para la prevención y el tratamiento de la AKI y la CKD son limitadas. En la práctica clínica, dado que no existen terapias farmacológicas establecidas, los pacientes con AKI o CKD reciben primordialmente cuidado de soporte para corregir las complicaciones sistémicas. Este consiste en el control de la presión arterial, la prevención de acidosis metabólica e hipercalemia, el mantenimiento del volumen, así como la omisión de toda intervención que acentúe o empeore el daño renal, como la administración de nefrotóxicos [14]. En casos donde la función renal queda severamente comprometida, se recurre a la terapia de remplazo renal mediante hemodiálisis, diálisis peritoneal o trasplante renal. Sin embargo, la terapia de remplazo renal no deja de suponer un problema de alto riesgo para los pacientes con enfermedad renal [14-16]. Por ejemplo, la hemodiálisis se acompaña frecuentemente de complicaciones serias como hipotensión, sangrado, trombosis, arritmias, infecciones, alteraciones electrolíticas, entre otras. Así mismo, el trasplante renal acarrea el riesgo de coágulos sanguíneos y sangrado, obstrucción urinaria, infecciones, ataque cardíaco y rechazo del riñón trasplantado [15].

### 1.1.3 La lesión renal isquémica

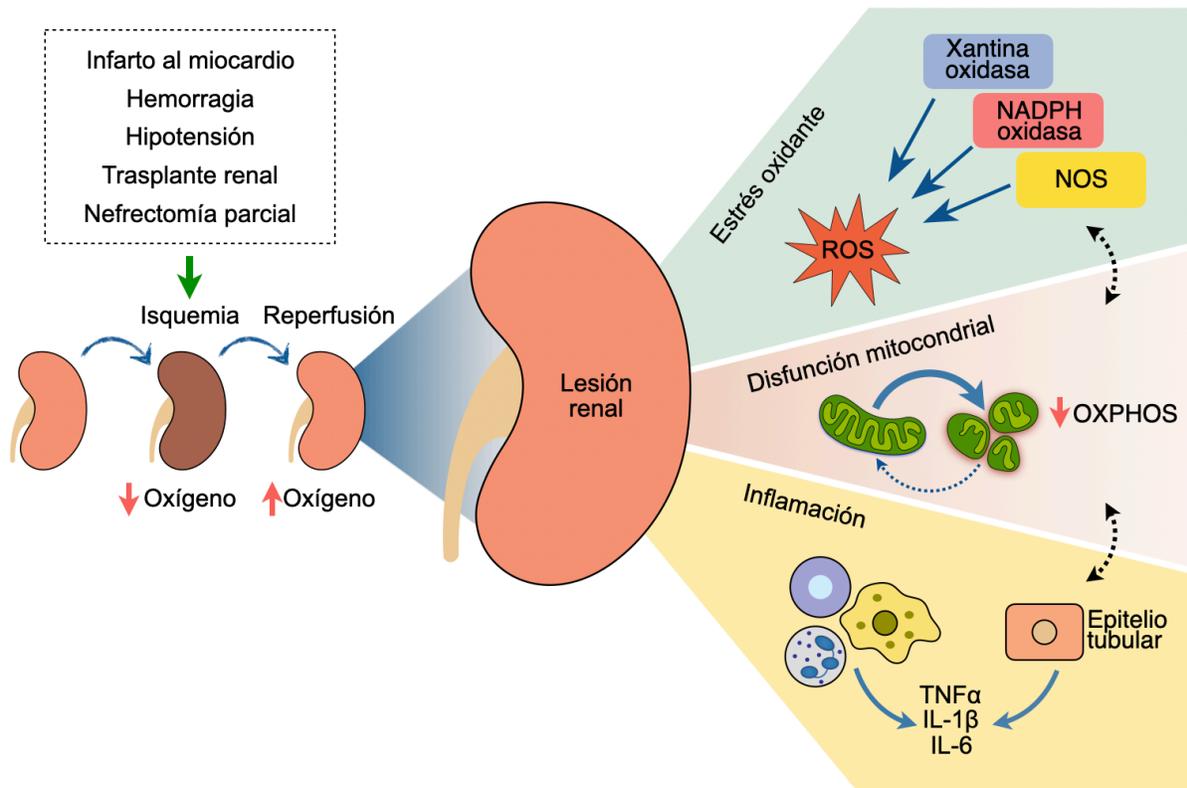
La lesión renal isquémica es un tipo de lesión renal que se induce específicamente por la disminución del flujo sanguíneo hacia los riñones (isquemia) y ocurre principalmente en escenarios como el infarto al miocardio, la obstrucción vascular renal, la hipotensión, el trauma renal y la hemorragia, pero también es el resultado de eventos quirúrgicos tales como la nefrectomía parcial y el trasplante renal en pacientes hospitalizados, donde se interrumpe transitoriamente el flujo sanguíneo renal [17,18]. Este evento de isquemia (hipoxia) y reperfusión (re-oxigenación) (IR) puede lesionar severamente a los riñones y suponer un problema grave, ya que desencadena un episodio de AKI en etapas tempranas que puede progresar a CKD en etapas tardías [19].



**Figura 3. Desenlaces de un episodio de lesión renal aguda.**

Dependiendo de la magnitud del daño renal por la lesión renal aguda pueden ocurrir al menos tres escenarios distintos. Cuando la lesión es leve, la función renal se recupera después del daño dado que las células epiteliales renales proliferan y se repara la región afectada. En el segundo escenario, la lesión es severa y progresa a enfermedad renal crónica, favoreciendo el deterioro progresivo de la función renal. En otros casos, la lesión es lo suficientemente grave que se pierde completamente la función renal, pudiendo ser letal cuando no se atiende a tiempo. Factores como la edad avanzada y la presencia de comorbilidades tales como la hipertensión, la diabetes y problemas cardiovasculares pueden acentuar la lesión.

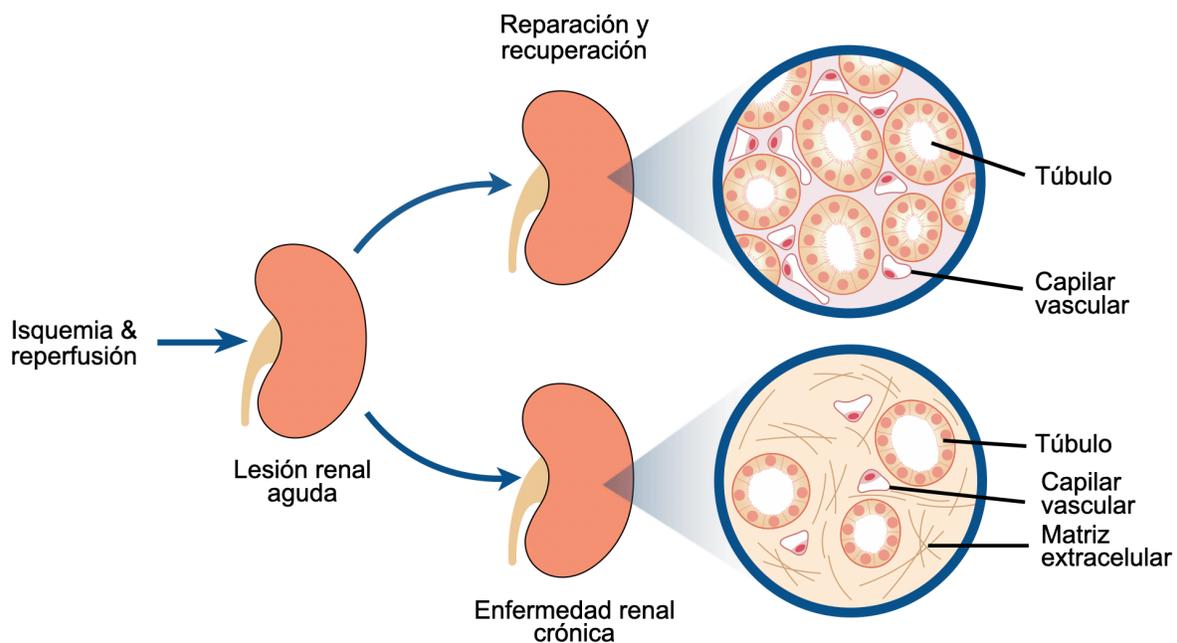
Aunque la fisiopatología de la lesión renal isquémica es compleja, se sabe que participan distintos mecanismos [17,19]. Por ejemplo, la reducción en las concentraciones del oxígeno en la fase de isquemia provoca la muerte de la células debido principalmente a la disminución de la síntesis mitocondrial del ATP. La falta del ATP inhibe la actividad de la ATPasa de sodio y potasio, lo que favorece la pérdida del gradiente electroquímico de la membrana celular, la acumulación del sodio en el citoplasma y del calcio en la mitocondria, conduciendo al aumento del volumen celular y a la muerte por necrosis y apoptosis [17,19].



**Figura 4. Fisiopatología de la lesión renal isquémica**

Los mecanismos involucrados en la fisiopatología de la lesión renal isquémica son varios, se inducen durante la isquemia e inmediatamente después de la reperusión y se amplifican mutuamente. Tres de los más importante son: el estrés oxidante, la inflamación y la disfunción mitocondrial. La isquemia renal puede suceder debido a un infarto al miocardio, hemorragias, hipotensión o durante intervenciones quirúrgicas como el trasplante renal y la nefrectomía parcial.

En la fase de reperfusión, por otro lado, el aumento abrupto en las concentraciones del oxígeno favorece la sobreproducción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (RONS) tanto por la mitocondria como por otros sistemas enzimáticos que se activan en la fase de reperfusión tales como la xantina oxidasa, la NAPDH oxidasa y la sintasa del óxido nítrico (NOS) desacoplada [20]. Paralelamente ocurre la disfunción y la fragmentación mitocondrial y la deficiencia en la producción del ATP derivado de la fosforilación oxidativa [4,21]. La sobreproducción de RONS provoca daño oxidante a distintas macromoléculas como los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos, lo que precipita la muerte de las células epiteliales, que se desprenden y obstruyen los túbulos renales [17]. La muerte de las células renales promueve a su vez la síntesis y liberación de mediadores inflamatorios y el reclutamiento de las células del sistema inmunológico, lo que conduce en muchos casos a acentuar el daño renal ya establecido (**Figura 4**) [17,22,23].



**Figura 5. Fases de la lesión renal isquémica**

Un episodio de isquemia y reperfusión puede resultar en lesión renal aguda y este progresar a enfermedad renal crónica, la cual histológicamente se manifiesta en forma de fibrosis, degeneración tubular y rarefacción vascular.

Cuando el daño renal es leve, el tejido renal lesionado logra repararse en algunos cuantos días, a través de la proliferación y la regeneración del epitelio tubular [24,25]. Sin embargo, cuando la isquemia se prolonga y el daño renal es severo, en el transcurso de varias semanas o meses, la matriz extracelular se expande y termina por llenar los espacios alguna vez ocupados por nefronas funcionales, dando origen a la fibrosis tubulointestinal [17,26]. También, dado que junto al epitelio el endotelio vascular también se pierde, el número de vasos sanguíneos en el riñón disminuye (rarefacción vascular) y la hipoxia intra-renal prevalece, provocando la degeneración progresiva de la masa renal (**Figura 5**) [27]. Al deterioro gradual de la función renal remanente en esta fase crónica de la lesión también contribuyen el estrés oxidante y la disfunción mitocondrial persistentes y una respuesta inflamatoria exacerbada que no termina por resolverse [28-30].

## **1.2 El ayuno e intervenciones nutricionales**

### **1.2.1 La adaptación metabólica al ayuno**

La privación del alimento supone un importante desafío metabólico a virtualmente todos los seres vivos [31,32]. Para hacer frente a este estrés nutricional y lograr sobrevivir, los organismos reducen el gasto energético, destinando los escasos recursos disponibles al manteniendo de las funciones primordiales, tales como la regulación de la temperatura, el mantenimiento de la frecuencia cardiaca y la función cognitiva, mientras que temporalmente se dejan de lado procesos como el crecimiento y la reproducción [33].

El mantenimiento de la homeostasis energética global durante los periodos de ayuno requiere de la activación o supresión de múltiples rutas bioquímicas y procesos metabólicos, la participación de varios órganos y sistemas y la coordinación mediada por ejes de regulación neuroendocrina [34,35]. Durante el ayuno se inhibe la síntesis de macromoléculas y la proliferación celular, mientras que la autofagia aumenta en la mayoría de las células y tejidos para dismantelar y degradar ciertos componentes citoplasmáticos que puedan proveer inmediatamente de nutrientes (ácidos grasos, aminoácidos y glucosa) para el reciclaje o la producción de energía [36]. Paralelamente, cuando los niveles de la glucosa en la sangre disminuyen, los niveles plasmáticos de la insulina caen y el hígado comienza a generar glucosa a partir de la

degradación de los gránulos de glucógeno en los hepatocitos y también mediante la gluconeogénesis, usando sustratos como el glicerol resultante de la lipólisis en los adipocitos y los aminoácidos como la alanina que derivan de la degradación de las proteínas en el músculo. La glucosa generada, principalmente por el hígado, se destina casi exclusivamente para el cerebro, quien demanda un consumo alto de energía. Cuando el ayuno se prolonga, las hormonas metabólicas como el glucagon, así como la inducción de múltiples factores de transcripción tejido-específicos, promueven la movilización y utilización de los triglicéridos en el tejido adiposo, la oxidación de los ácidos grasos libres resultantes en el hígado y la elevada síntesis hepática de los cuerpos cetónicos  $\beta$ -hidroxibutirato y acetoacetato, que luego se enviarán a la circulación general para ser oxidados por las mitocondrias en la gran mayoría de los tejidos extrahepáticos y así cubrir los requerimientos energéticos sistémicos [37-42]. Como consecuencia, en respuesta a la falta del alimento y de la glucosa, a nivel sistémico se activa un programa molecular que provoca un cambio metabólico global hacia la utilización de los ácidos grasos y los cuerpos cetónicos.

### **1.2.2 La restricción del alimento y sus beneficios**

La restricción moderada del alimento, sin causar desnutrición, resulta en beneficios multi-sistémicos [33,43]. En distintos modelos experimentales se ha demostrado que la restricción dietaria y energética, en forma de restricción calórica, ayuno y ayuno intermitente, protege contra distintas enfermedades crónico-degenerativas como el cáncer y trastornos metabólicos, neurodegenerativos y cardiovasculares [33,43,44]. Comparados con los animales en condiciones de abundante comida, la esperanza de vida de los animales aumenta cuando se someten a regímenes de restricción calórica o privación del alimento [33,44]. Por ejemplo, la restricción diaria del alimento en un 50% desde una edad temprana aumenta al doble la esperanza de vida de las ratas de laboratorio, mientras que en monos (*Macaca mulatta*) la restricción calórica del 30% reduce la tasa de mortalidad y la incidencia de trastornos cardiovasculares [45,46]. Adicionalmente, distintas intervenciones nutricionales incrementan la resistencia al estrés. Por ejemplo, en roedores la privación del alimento previene los efectos adversos de altas dosis de fármacos como el etopósido y la doxorubicina, que se usan en la quimioterapia contra el cáncer, y también incrementa la resistencia a eventos traumáticos como la isquemia cerebral, hepática, cardíaca y renal [47]. Aunque los

estudios en humanos son limitados, se sabe que la restricción calórica y el ayuno intermitente inducen muchos de los cambios moleculares, metabólicos y fisiológicos observados en roedores y ayudan a prevenir o retrasar la aparición de distintas enfermedades metabólicas como la diabetes, el síndrome metabólico y enfermedades cardiovasculares, que muchas veces ocurren como consecuencia de llevar una dieta hipercalórica y realizar poca o nula actividad física [46,48,49].

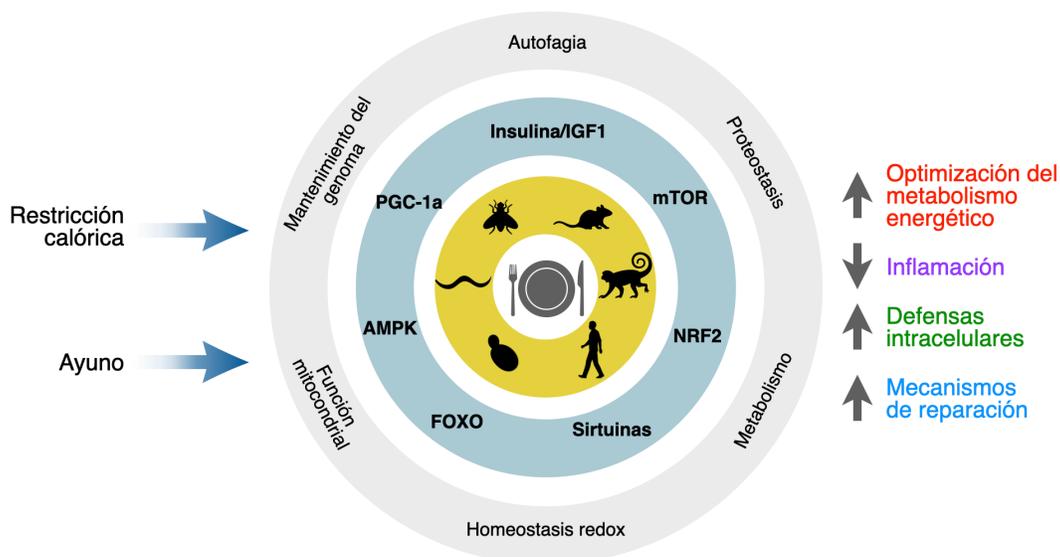
La restricción dietaria engloba a toda aquella intervención nutricional (**Tabla 1**) en donde se reduce la ingesta de calorías diarias (como es el caso de la restricción calórica o el ayuno) o se sustituye o modifica algún componente de la dieta, esto es que se disminuyen, por ejemplo, la cantidad de proteínas (restricción de proteínas) o se reemplaza específicamente algún aminoácido [44]. También comprende aquellas intervenciones donde se restringe el tiempo de la ingesta del alimento. Por ejemplo, en el ayuno intermitente se alternan periodos de ingesta del alimento ad libitum con periodos donde hay nula o poca ingesta de calorías [46]. En la restricción temporal del alimento (TRF: Time-Restricted feeding) se restringe la ingesta de los alimentos a un intervalo de 4-12 horas o menos durante el día [49]. Aunque el tiempo de alimentación y la composición de la dieta en las distintas intervenciones nutricionales pueden ser diferentes, en general todas imparten efectos positivos en la salud y la supervivencia y operan de formas muy similares a nivel molecular.

**Tabla 1: Tipos de intervenciones nutricionales**

Intervención	Descripción
Restricción calórica	Restricción de la ingesta calórica diaria en un 20-40%
Restricción de proteínas	Restricción de la ingesta diaria de proteínas
Ayuno	Abstinencia en la ingesta de comida durante más de 16 horas
Ayuno intermitente	Alternancia de periodos de ayunos prolongados y periodos de realimentación
Restricción temporal del alimento	Alimentación ad libitum durante menos de 12 horas al día
Dieta cetogénica	Dieta que elimina o reduce drásticamente el consumo de carbohidratos e induce la síntesis endógena de cuerpos cetónicos

### 1.2.3 Mecanismos moleculares involucrados en la restricción del alimento

Aunque no se conocen completamente los mecanismos moleculares que median los efectos benéficos de la restricción del alimento, se sabe que participan vías o proteínas de señalización relacionadas con el manejo y el metabolismo de los nutrientes, e incluyen la vía de la insulina, el blanco mecanicista de rapamicina (mTOR), sensores metabólicos como la cinasa de proteínas activada por AMP (AMPK) y las sirtuinas. También participan proteínas reguladoras de la transcripción que son sensibles a cambios en el estado nutricional y el ambiente redox, tales como el factor con dominios “Forkhead- Box” 3 (FOXO3), el coactivador 1 alfa del receptor activado por proliferares del peroxisoma (PGC1 $\alpha$ ) y el factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (NRF2) [33,43]. Estas proteínas trabajan en conjunto detectando los cambios en la disponibilidad de nutrientes/energía, ajustando el metabolismo basal y activando distintos mecanismos de citoprotección y de reparación como la autofagia, que hacen frente, en primera instancia, a la deficiencia energética y, en segundo lugar, a distintas formas de estrés.



**Figura 6. Mecanismo de acción de la restricción dietaria**

Intervenciones nutricionales como la restricción calórica y el ayuno resultan en la activación o supresión de vías metabólicas y de señalización en las células que en última instancia culminan en la optimización del metabolismo energético, la supresión de la inflamación y la activación de mecanismos celulares de defensa y de reparación.

Particularmente podemos distinguir bien cuatro mecanismos o respuestas adaptativas que se inducen ante la falta del alimento y que protegen a las células y a los organismos del estrés, las enfermedades y el envejecimiento: 1) la optimización del metabolismo energético, 2) la supresión de la inflamación, 3) el incremento de los mecanismos de defensa, y 4) el aumento de los mecanismos de reparación y de eliminación de componentes celulares (**Figura 6**) [33,50].

Durante la restricción calórica se prefiere la optimización de los recursos energéticos al gasto de energía en actividades que demandan una elevada actividad física [31-33]. Adicionalmente, el metabolismo basal se reduce, lo que coincide con una leve reducción de la temperatura corporal [51]. Por otro lado, se renueva la población de mitocondrias en las células, haciendo que el metabolismo energético sea más eficiente; evitando la fuga de electrones en los complejos mitocondriales y, al mismo tiempo, reduciendo la producción de radicales libres [52,53].

La activación de la respuesta inflamatoria demanda una gran cantidad de recursos energéticos, particularmente glucosa, para la proliferación y expansión de las células del sistema inmunológico, así como para la síntesis de interleucinas. Es por esto, que la supresión de la inflamación es una respuesta general durante el ayuno y la restricción calórica [54]. Esto explica fácilmente porqué muchas enfermedades que tienen un componente inflamatorio mejoran con la restricción dietaria [55].

La restricción dietaria activa sistemas de defensa antioxidantes [53,56]. Cuando la señalización de la insulina disminuye en las células, se inducen factores de transcripción como el FOXO3 que promueven la síntesis de proteínas antioxidantes como la catalasa y la superóxido dismutasa (SOD), que neutralizan especies reactivas del oxígeno [53]. Otro factor que se induce es el NRF2, quien media ciertos efectos de la restricción calórica en roedores [53]. Este factor promueve la transcripción de proteínas de fase II que participan en la eliminación de xenobióticos, electrófilos y moléculas reactivas [57]. Esto provoca que los animales que se someten a restricción calórica sean resistentes a distintas formas de estrés.

Las células cuentan con distintos mecanismos para remover moléculas y organelos, tales como el sistema de degradación por ubiquitinas y la autofagia. El ayuno rápidamente promueve la activación de la autofagia, con lo que se consigue eliminar

mitocondrias dañadas o despolarizadas, dejando solamente aquellas mitocondrias que están acopladas y son eficientes en la producción de energía [58]. Por otro lado, la tasa de degradación de proteínas dañadas y la actividad del sistema de ubiquitinas/ proteasoma también aumentan en los tejidos de animales sometidos a restricción calórica [59]. De esta forma, la privación de nutrientes o energía mantiene a las células libres de moléculas y organelos dañados.

#### **1.2.4 La dieta cetogénica y los cuerpos cetónicos**

La dieta cetogénica es un tipo de dieta especialmente formulada que contiene altas cantidades de grasas, una concentración adecuada de proteínas y muy bajas cantidades de carbohidratos, por lo que modifica profundamente el metabolismo energético y particularmente promueve la producción endógena de cuerpos cetónicos, que se usan como fuente de energía alterna en lugar de la glucosa. Esta dieta se introdujo inicialmente como un tratamiento efectivo y bastante bien tolerado para la epilepsia fármaco-resistente en niños, pero ahora se erige como un programa de control de peso bastante popular en pacientes obesos [60,61]. Adicionalmente, se recomienda cada vez más para el tratamiento de distintos desordenes neurológicos, la diabetes y el cáncer [62,63]. Varios mecanismos parecen mediar los efectos benéficos de esta dieta, tales como la reducción del estrés oxidante y la supresión de la inflamación [64,65]. En muchos casos, los cuerpos cetónicos también reproducen los efectos benéficos de la dieta cetogénica y de la restricción dietaria en general [66]. Esto en parte se explica porque el  $\beta$ -hidroxibutirato, además de funcionar como un sustrato energético durante los periodos prolongados de ayuno, también tiene funciones de señalización, al activar receptores de membrana y distintas vías de transducción de señales dentro de las células, induciendo la acetilación de proteínas, suprimiendo la respuesta inflamatoria y activando la defensa antioxidante a través de los factores FOXO3 y NRF2 [66,67].

## 2 ANTECEDENTES

En varios trabajos experimentales se ha reportado que el ayuno prolongado y la restricción calórica previenen el daño por isquemia y reperfusión en órganos como el cerebro, el hígado, el corazón y el riñón [68-71]. Particularmente en el riñón esta protección se ha asociado con la reducción de la vía de insulina y el bloqueo de la respuesta inflamatoria [71]. Dado que la restricción del alimento incrementa la transcripción de ciertas enzimas antioxidantes e induce alteraciones en las mitocondrias tanto en el riñón como en otros órganos [71,72], se ha sugerido que la reducción del estrés oxidante y la preservación de la función mitocondrial podrían ser claves y mediar dicho efecto protector.

En la mayoría de los trabajos experimentales, para observar el fenómeno de protección contra el estrés, intervenciones nutricionales como la restricción calórica, la restricción de proteínas o el ayuno intermitente se han implementado por varias semanas o meses antes del evento estresante, mientras que los protocolos cortos de privación del alimento han sido poco estudiados y se desconoce si estos confieren protección renal. Particularmente, no se sabe si la adherencia a protocolos de TRF afecten el establecimiento y la progresión de la lesión renal isquémica.

Por otro lado, aunque la KD, al igual que la restricción calórica, ofrecen múltiples beneficios, en el campo de la nefrología su estudio se ha limitado principalmente porque puede inducir cálculos renales, sobre todo cuando se implementa por periodos prolongados de varias semanas o meses [73]. Sin embargo, la evidencia experimental emergente sugiere que esta dieta confiere protección renal en escenarios como la nefropatía diabética y la enfermedad renal poliquística [74,75]. Dado que la KD posee potentes efectos antioxidantes y antiinflamatorios en distintos escenarios experimentales podría ser posible que proteja contra la lesión renal isquémica [64,65]. El potencial uso de la dieta cetogénica en la lesión renal isquémica está respaldado por experimentos en ratas que demuestran que esta dieta protege al corazón y al cerebro del daño por IR [76,77].

### **3 JUSTIFICACIÓN**

A pesar de los avances en el entendimiento de su fisiopatología, la lesión renal isquémica sigue siendo problema de salud en todo el mundo, ya que más allá del cuidado de soporte y la terapia de remplazo renal no existen estrategias eficaces para prevenir, tratar o revertir esta patología, denotando la necesidad de implementar nuevos y mejores enfoques y esquemas terapéuticos. Distintas intervenciones nutricionales, tales como el ayuno, la restricción temporal del alimento y la dieta cetogénica, podrían representar una buena alternativa para esta afección dado que mejoran la función mitocondrial y tienen efectos antioxidantes y antiinflamatorios.

### **4 HIPÓTESIS**

El ayuno e intervenciones nutricionales relacionadas previenen el establecimiento y la progresión de la lesión renal isquémica hacia el desarrollo de fibrosis a través de la reducción del estrés oxidante, la disfunción mitocondrial y la inflamación.

### **5 OBJETIVOS**

- I. Identificar intervenciones nutricionales que eviten el establecimiento y la progresión de la lesión renal isquémica.
- II. Analizar los mecanismos subyacentes que median el efecto benéfico de las intervenciones nutricionales en la lesión renal isquémica.

## 6 MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Reactivos

La mayoría de los reactivos usados fueron de grado analítico y se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). El pentobarbital sódico se obtuvo de PiSA Agropecuaria (Hidalgo, México). Los reactivos para la determinación de la urea y la creatinina se obtuvieron de SpinReact (Girona, España) y aquellos para la determinación del  $\beta$ -hidroxibutirato fueron de Cayman Chemicals (#700190).

### 6.2 Animales de experimentación

Se usaron ratas macho de la cepa Wistar de aproximadamente 8–9 semanas de edad con un peso de 200–250 g, las cuales se obtuvieron de Círculo ADN (México) y se alimentaron con alimento estándar para roedores (5001, PMI Feeds Inc., Richmond, IN, EUA) hasta el inicio de los experimentos. Los animales se manipularon de acuerdo a las recomendaciones del Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez (Aprobación #INC/CICUAL/005/2018 y #INC/CICUAL/003/2021).

### 6.3 Intervenciones nutricionales

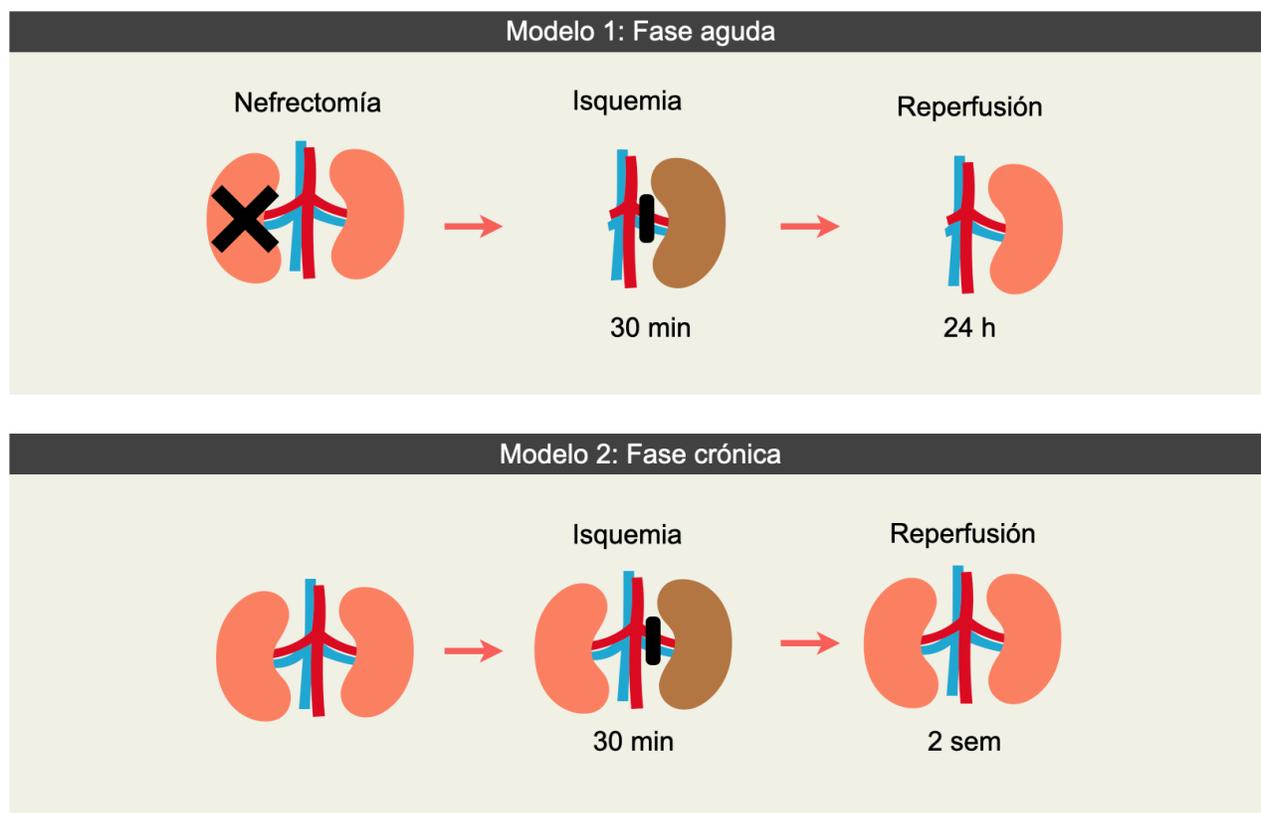
Se evaluaron los efectos metabólicos y nefroprotector de tres intervenciones nutricionales: el ayuno, la TRF y la KD. Para el protocolo de ayuno, las ratas se privaron del alimento durante 3 días, mientras que el agua se mantuvo *ad libitum*. Para el protocolo de TRF las ratas solamente tuvieron 2 horas de acceso libre al alimento (10:00 a.m.–12:00 a.m.) cada día durante una semana mientras que el agua se mantuvo también *ad libitum*. Un grupo de ratas tuvo acceso al alimento en todo momento y sirvió como control. Por otro lado, para la KD las ratas se alimentaron con una dieta control y una KD durante 3 días. La composición nutrimental de la KD se muestra en la **Tabla 2**. La composición de la dieta se basó en estudios que demuestran que la KD incrementa la esperanza de vida en ratones cuando se provee por varios meses [78].

**Tabla 2: Composición nutrimental de la dieta control y la dieta cetogénica**

Ingredientes (g/Kg de dieta)	Dieta control	Dieta cetogénica
Caseína	200	181
Cisteína	3	0
Metionina	0	2.7
Almidón	398	0
Maltodextrina	132	0
Sacarosa	100	0
Aceite de soya	70	70
Manteca de cerdo	0	561
Colina	2.5	2.5
Celulosa	50	85
Tert-butilhidroquinona	0.014	0.126
Mix de minerales	35	60
Mix de vitaminas	10	13

#### 6.4 Modelos de isquemia y reperfusión

Se usaron dos modelos de isquemia y reperfusión (IR) renal (**Figura 7**). En el primer modelo, que se usó para el análisis de la fase aguda (24 horas) de la lesión, el riñón izquierdo se sometió a isquemia durante 30 minutos mediante la oclusión de la arteria renal usando un clip vascular (Fine Science Tools), y el riñón derecho se removió quirúrgicamente (nefrectomía). En el segundo modelo, que se usó para el análisis de la fase crónica (2 semanas) de la lesión, el riñón izquierdo se sometió a isquemia de 30 minutos pero el riñón derecho se dejó intacto. En el caso de las ratas con cirugía falsa o sham, solamente se realizó la laparotomía longitudinal media pero ambos riñones se dejaron intactos. Transcurrido el tiempo de isquemia, se cerró la cavidad abdominal con una sutura absorbible 3-0 estéril (Biosyn™, Mansfield, MA, EUA) y las ratas se pusieron en cajas con agua y comida durante 24 horas o 2 semanas según el protocolo.



**Figura 7. Modelos de isquemia y reperusión.**

## 6.5 Protocolos experimentales

### 6.5.1 Intervenciones nutricionales y sus efectos metabólicos

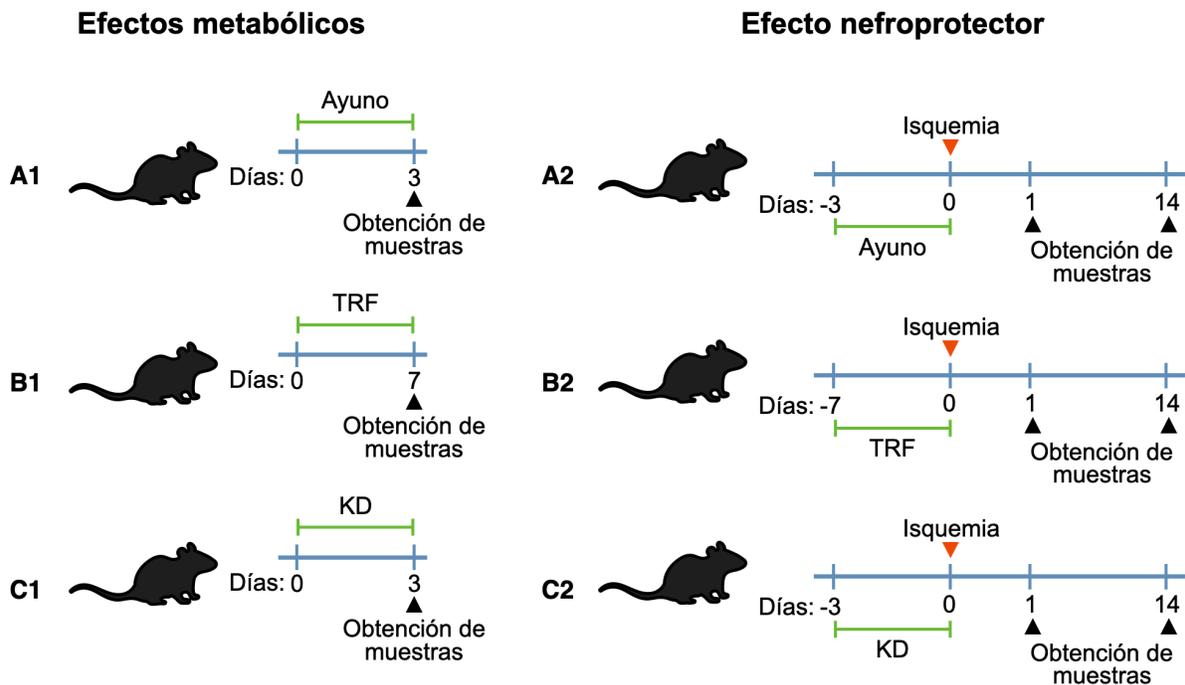
Se midieron el peso corporal y los niveles de la glucosa en la sangre y del  $\beta$ -hidroxibutirato en el plasma después de someter o no a las ratas a las intervenciones nutricionales siguiendo el esquema experimental de la **Figura 8**.

### 6.5.2 Intervenciones nutricionales y su efecto nefroprotector

Para evaluar el efecto nefroprotector de las intervención nutricionales se siguió el esquema experimental de la **Figura 8** y se emplearon los siguientes grupos:

- **Protocolo A2.** Efecto del ayuno en la IR renal.
  - Grupo 1: Sham
  - Grupo 2: IR
  - Grupo 3: IR+Ayuno
- **Protocolo B2.** Efecto de la TRF en la IR renal
  - Grupo 1: Sham

- Grupo 2: IR
- Grupo 3: IR+TRF
- **Protocolo C2.** Efecto de la KD en la IR renal.
  - Grupo 1: Sham
  - Grupo 2: IR
  - Grupo 3: IR+KD



### Figura 8. Protocolos experimentales

Esquema experimental usado para evaluar los efectos metabólicos (A1-C1) y nefroprotector (A2-C2) del ayuno, la restricción temporal del alimento (TRF) y la dieta cetogénica (KD) en la fase aguda (1 día) y crónica (14 días) de la lesión renal isquémica.

### 6.6 Sacrificio y obtención de muestras

Al concluir el tiempo de evolución de la lesión renal (24 horas o 2 semanas), las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (60 mg/kg, i.p.) y la sangre se extrajo de la aorta abdominal usando una jeringa con heparina. Se removió el riñón izquierdo, se lavó con PBS frío y se cortó longitudinalmente en dos porciones iguales. Una porción se fijó para histología y microscopio electrónica, mientras que de la otra parte se removió la médula y la corteza se cortó en trozos pequeños de aproximadamente 200 mg que se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido para los ensayos bioquímicos

y Western blot. La sangre se centrifugó a 3,000 g por 10 minutos a 4°C y el plasma se guardó a -80°C.

### **6.7 Parámetros bioquímicos en sangre y plasma**

Los niveles de la glucosa en la sangre se midieron con un glucómetro (Accu-Chek, Roche Diagnostics, Rotkreuz, Suiza). Los niveles plasmáticos de la urea, la creatinina y el  $\beta$ -hidroxibutirato se determinaron con técnicas comerciales siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **6.8 Consumo del oxígeno y potencial de membrana mitocondrial**

Para evaluar el consumo del oxígeno mitocondrial, los tejidos se homogeneizaron en solución de aislamiento mitocondrial (D-manitol 225 mM, sucrosa 75 mM, EDTA 1 mM, HEPES 5 mM, BSA 0.1%, pH 7.4) usando un homogeneizador de vidrio tipo Potter-Elvehjem (Wheaton). El homogeneizado se centrifugó a 800 g por 10 minutos para eliminar los núcleos y las células intactas; el sobrenadante posteriormente se centrifugó a 10,000 g por 10 minutos para obtener la fracción mitocondrial. La fracción mitocondrial final se re-suspendió en 200  $\mu$ l de solución de aislamiento sin BSA y las proteínas mitocondriales se cuantificaron usando el método de Lowry. La tasa de consumo del oxígeno mitocondrial se evaluó con ~200  $\mu$ g de mitocondrias frescas y un oxímetro de alta resolución (Oroboros Oxygraph-2k®) usando glutamato 10 mM y malato 2 mM como sustratos en presencia de ADP 2.5 mM. Se evaluó el cambio en el potencial de membrana mitocondrial usando la safranina O (2.5  $\mu$ M).

### **6.9 Carbonilación de proteínas**

Para la determinación de los carbonilos proteínicos, los tejidos se homogeneizaron en solución de lisis (Fosfatos 50 mM, pH 7.4, tritón X-100 0.1%) y se centrifugaron a 15,000 g por 10 minutos a 4°C. Después de remover los ácidos nucleicos con estreptomicina al 10%, el sobrenadante (~1 mg de proteína en 150  $\mu$ l) se incubó con 600  $\mu$ l de 2,4-dinitrofenilhidrazina 10 mM en ácido clorhídrico 2.5 N durante 1 hora a temperatura ambiente y las proteínas se precipitaron con 150  $\mu$ l de ácido tricloroacético al 20%. Después de 3 lavados con una mezcla de etanol-acetato de etilo (1:1 v/v), las proteínas se solubilizaron con cloruro de guanidina 6 M y la absorbancia se evaluó a 370 nm [80].

## 6.10 Actividad de enzimas antioxidantes

Los tejidos se homogeneizaron en solución de lisis (Fosfatos 50 mM, pH 7.4, tritón X-100 0.1%), se centrifugaron a 15,000 g por 10 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante para medir la actividad de las enzimas antioxidantes. Los ensayos se realizaron a 25°C y la densidad óptica se midió con el lector multiplaca Synergy Biotek (Winooski, EUA).

La actividad de la SOD total se midió siguiendo la reducción del azul de nitrotetrazolio en un sistema generador de anión superóxido por la xantina y la xantina oxidasa. Las muestras (3 µg en 20 µl) se incubaron con 300 µl de la mezcla de reacción (Xantina 0.3 mM, azul de nitrotetrazoleo 150 µM, EDTA 0.6 mM, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 400 mM) más 30 µl de xantina oxidasa (5 mg/ml) y la absorbancia se leyó a los 560 nm después de 10 minutos de iniciar la reacción [81].

La actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) se midió siguiendo la desaparición del NADPH a 340 nm acoplada a las reacciones de reducción y oxidación del glutatión (GSH) por la glutatión reductasa y la presencia de GPx en la muestra, respectivamente. Las muestras (3.5 µg en 35 µl) se incubaron con 300 µl de la mezcla de reacción (EDTA 1 mM, NaN<sub>3</sub> 1 mM, NADPH 0.2 mM, GSH 1 mM y glutatión reductasa 1 U/ml) y 25 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.25 mM [81].

La actividad de glutatión S-transferasa (GST) se evaluó siguiendo la conjugación del 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno con el GSH a 340 nm. Las muestras (15 µg en 20 µl) se incubaron con 180 µl de la mezcla de reacción (GSH 1 mM, 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 1 mM y EDTA 1 mM) [81].

## 6.11 Histología

Los tejidos se fijaron por inmersión en una mezcla de paraformaldehído (4%) y glutaraldehído (1.5%), se embebieron en parafina, se seccionaron a 10 µm con un microtomo y se procesaron para la tinción de hematoxilina y eosina, tricrómica de Massón o Rojo sirio usando procedimientos estándares. El área de lesión se cuantificó contabilizando los túbulos lesionados (necrosis tubular, depósitos hialinos, túbulos dilatados) por área, usando las micrografías obtenidas con la tinción de hematoxilina y eosina a un aumento de 10X.

## **6.12 Microscopía electrónica**

Para evaluar la morfología mitocondrial, la corteza renal del riñón fijado en paraformaldehído/glutaraldehído se cortó en trozos pequeños de  $\sim 3 \text{ mm}^3$  que se incubaron con tetraóxido de osmio al 2%, se embebieron en resina epóxica, se seccionaron a 70–90 nm con un altramicrotomo y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las imágenes se adquirieron con el microscopio electrónico Tecnai Spirit BioTWIN (Hillsboro, Orlando, EUA) revisando específicamente células epiteliales del túbulo proximal, que se caracterizan por la presencia de abundantes microvellosidades y mitocondrias.

## **6.13 Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia**

Para evaluar el daño a los ácidos nucleicos, se cortaron secciones de tejido de 10  $\mu\text{m}$  de grosor a partir de los bloques de parafina, se les removió la parafina, se rehidrataron y se incubaron por 2 horas con el anticuerpo anti-8-OHdG (1:200, Abcam), mientras que para medir la nitración de las proteínas los cortes se incubaron con anticuerpo anti-3-nitrotirosina (1:200, Santa Cruz Biotechnology). Después de 3 lavados, las laminillas se incubaron con anticuerpos secundarios HRP, se revelaron con 3,3'-diaminobenzidina, se contrastaron con hematoxilina y se observaron bajo el microscopio luz. Para la inmunofluorescencia, las laminillas se incubaron durante 2 horas con anticuerpo anti-KIM-1 (1:200) y 1 hora con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 (1:500). Los núcleos se tiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol a una concentración de 1  $\mu\text{g/ml}$  durante 5 minutos y las imágenes se obtuvieron usando un microscopio de epifluorescencia.

## **6.14 Western blot**

La corteza renal se homogeneizó en solución de lisis (Tris 50 mM, pH 8.0, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, EGTA 1 mM, NaF 5 mM,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  5 mM, pirofosfato de sodio 2 mM,  $\beta$ -glicerofosfato 5 mM, PMSF 1 mM, desoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1%, NP-40 1%) y se centrifugó a 15,000 g por 10 minutos a 4°C. Las proteínas (20  $\mu\text{g}$ ) en el sobrenadante se separaron mediante electroforesis en geles de acrilamida al 10–12% durante 2–2.5 horas a 100 V en condiciones reductoras y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham, Piscataway, NJ, EUA) durante 1.5 horas a 100 V en cámara húmeda. Las membranas se incubaron durante 2 horas con los anticuerpos

primarios (**Tabla 3**) preparados en leche al 5% en PBS+Tween-20 al 0.1% seguido de los anticuerpos secundarios apropiados por 1 hora a temperatura ambiente y en agitación constante. Las proteínas de interés se detectaron por quimioluminiscencia usando los kits de detección SuperSignal West Pico o Femto Chemiluminescent Substrate (Pierce), se cuantificaron usando ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EUA) y se normalizaron con los niveles de expresión de la tubulina, GAPDH o ATP5A.

**Tabla 3: Anticuerpos usados para Western Blot**

Anticuerpo	#Catálogo	Casa comercial	Dilución
Anti-KIM-1	AF3689	R&D Systems	1:2,000
Anti-DRP-1	sc-32898	Santa Cruz Biotechnology	1:1,000
Anti-TGFβ	sc-130348	Santa Cruz Biotechnology	1:1,000
Anti-ATP5A	ab14748	Abcam	1;100,000
Anti-3-NT	sc-32757	Santa Cruz Biotechnology	1:3,000
Anti-4-HNE	AB5605	Merck Millipore	1:4,000
Anti-IL6	sc-57315	Santa Cruz Biotechnology	1:1,000
Anti-CCL2	GTX60582	GeneTex	1:1,000
Anti-FN	F3648	Sigma-Aldrich	1:2,000
Anti-Tubulina	T9026	Sigma-Aldrich	1:5,000
Anti-αSMA	GTX100034	GeneTex	1:4,000
Anti-GAPDH	GTX100118	GeneTex	1:20,000
Anti-MFN2	9482	Cell Signaling Technology	1:2,000
Cabra anti-conejo IgG	7074	Cell Signaling Technology	1:5,000
Caballo anti-ratón IgG	7076	Cell Signaling Technology	1:5,000

### 6.15 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como el promedio ± error estándar de la media y se analizaron mediante el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey usando el paquete GraphPad PRISM versión 8.0. Las diferencias con  $p \leq 0.05$  se consideraron como significativas.

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Cambios metabólicos inducidos por la dieta

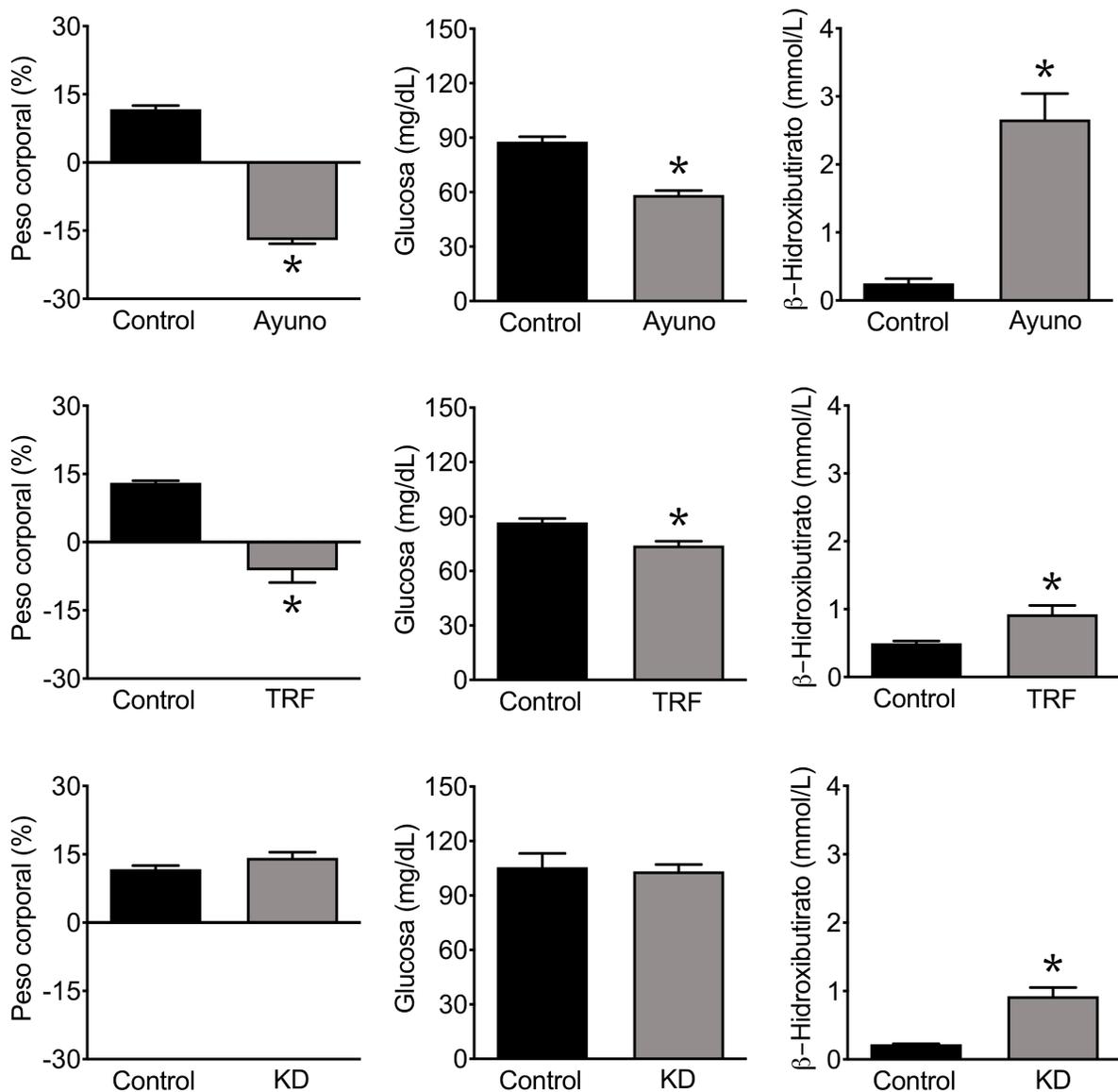
El ayuno de 3 días disminuyó del peso corporal inicial de las ratas en más del 15%, mientras que la TRF por una semana solo causó una pérdida del 5%. Los niveles de la glucosa en sangre disminuyeron en un 30% durante el ayuno mientras que con la TRF hubo una disminución del 15%. La dieta cetogénica en cambio no modificó el peso corporal ni la glucosa en sangre con respecto a las ratas alimentadas con la dieta control. Las tres intervenciones aumentaron los niveles plasmáticos del  $\beta$ -hidroxibutirato, pero el ayuno tuvo un mayor efecto (**Figura 9**).

### 7.2 El ayuno preoperatorio previene la lesión renal isquémica

Primero se evaluó el efecto del ayuno preoperatorio en la fase aguda de la lesión renal isquémica. El análisis histológico mostró que el ayuno disminuyó el daño tubular causado por la IR, caracterizado por la obstrucción de los túbulos renales debido al desprendimiento de las células epiteliales y la presencia de depósitos hialinos (**Figura 10A, B**). También, los niveles plasmáticos de la urea y la creatinina disminuyeron notablemente con el ayuno en comparación con las ratas sometidas a IR (**Figura 10C, D**), indicando que el ayuno preservó tanto la estructura como la función renal. El análisis de la expresión de la molécula de lesión renal 1 (KIM-1: kidney injury molecule 1) por Western blot mostró que esta proteína incrementa durante la IR y que el ayuno reduce su expresión (**Figura 10E**).

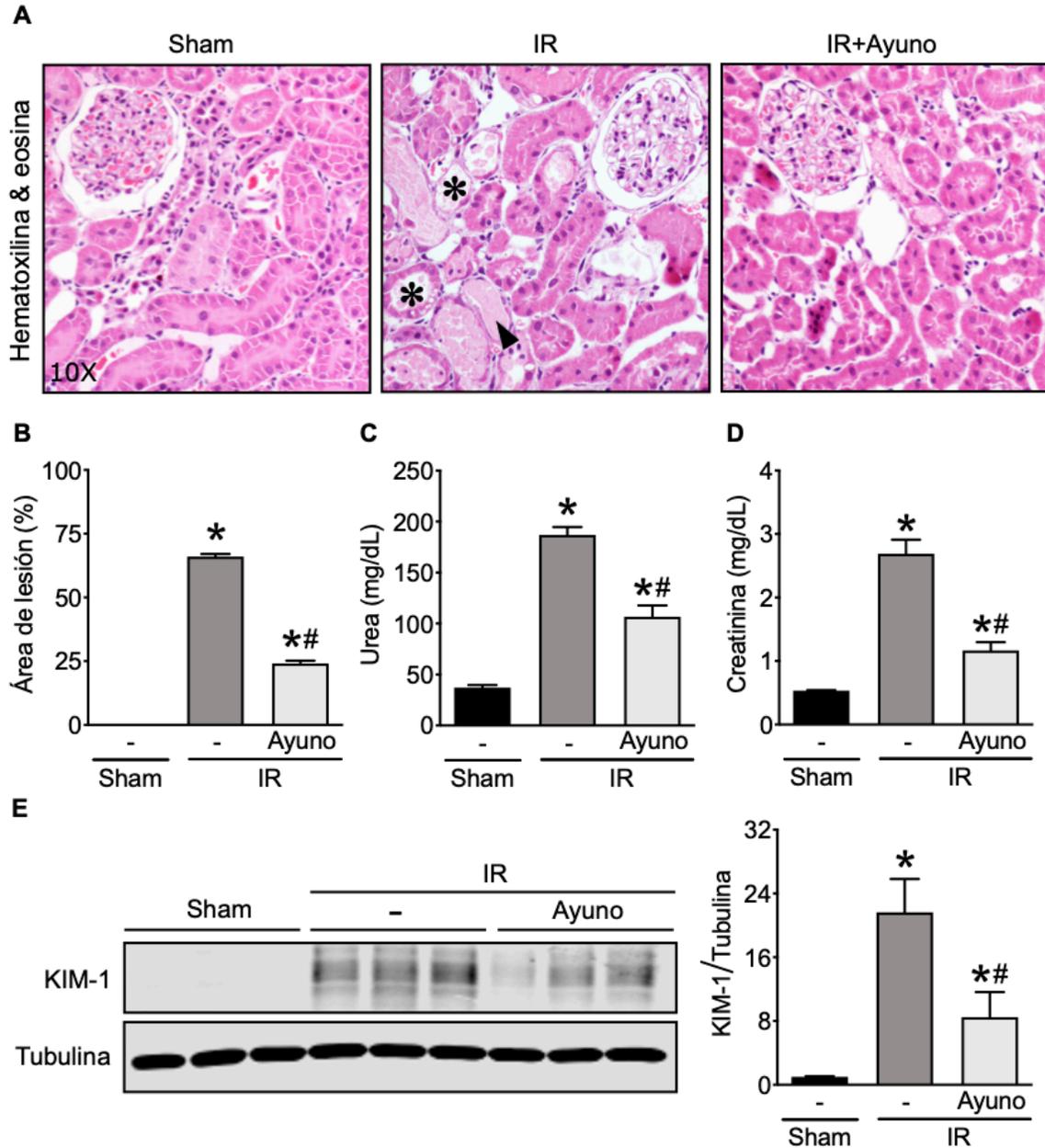
### 7.3 El ayuno reduce el estrés oxidante y la disfunción mitocondrial

Los niveles de los marcadores de estrés oxidante 3-nitrotirosina y los carbonilos proteínicos aumentaron con la IR y disminuyeron con el ayuno preoperatorio (**Figura 11A, B**). La actividad total de las enzimas antioxidantes SOD y la GPx disminuyeron con la IR mientras que el ayuno preservó la actividad de SOD y aumentó la actividad de GPx incluso más que en las ratas Sham (**Figura 11C, D**).



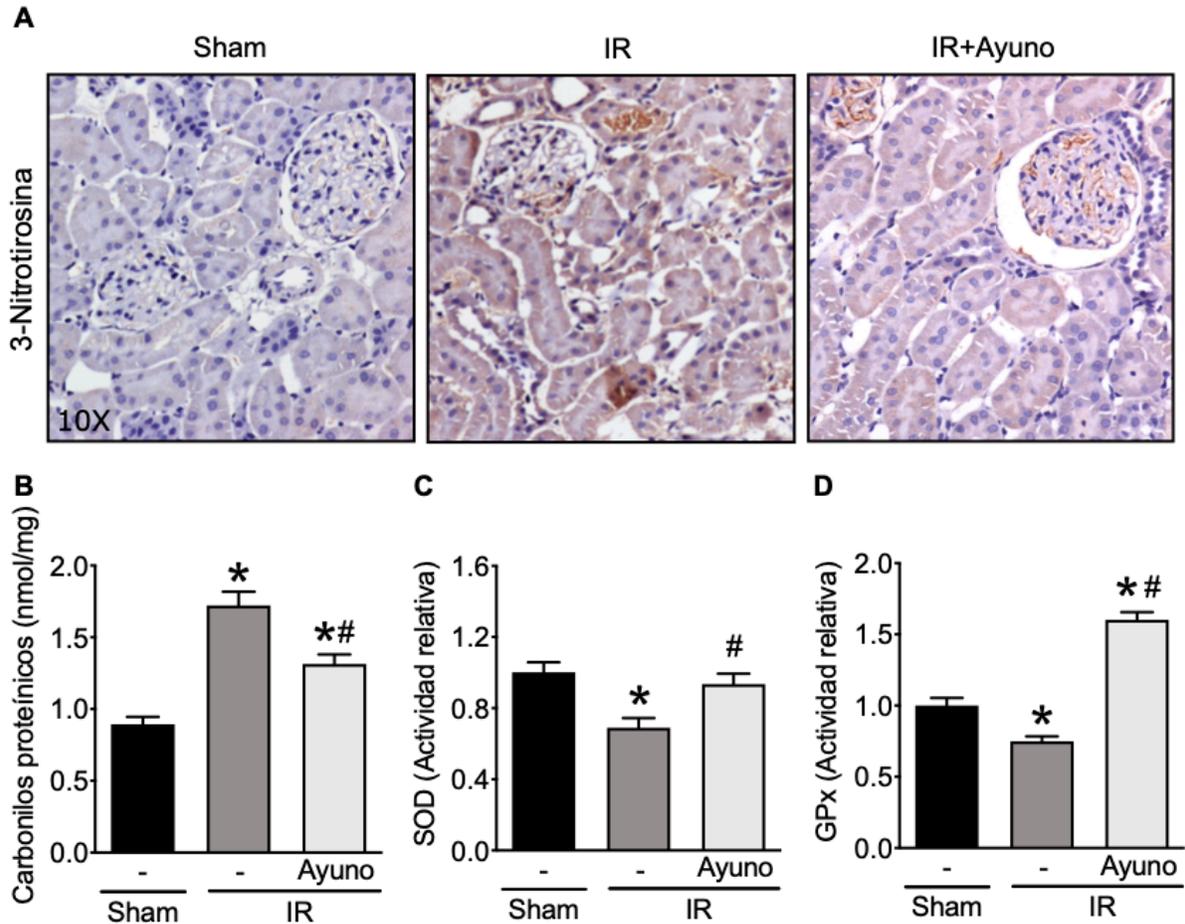
**Figura 9. Efecto de las intervenciones nutricionales en el metabolismo.**

Se determinó el cambio en el peso corporal, la glucosa en sangre y los niveles plasmáticos del  $\beta$ -hidroxibutirato en los grupos experimentales. Restricción temporal del alimento (TRF), Dieta cetogénica (KD). Los datos se expresan como el promedio  $\pm$  error estándar de la media. n=5-6; \*p < 0.05 versus control.



**Figura 10. Efecto del ayuno en la lesión renal isquémica (24 horas).**

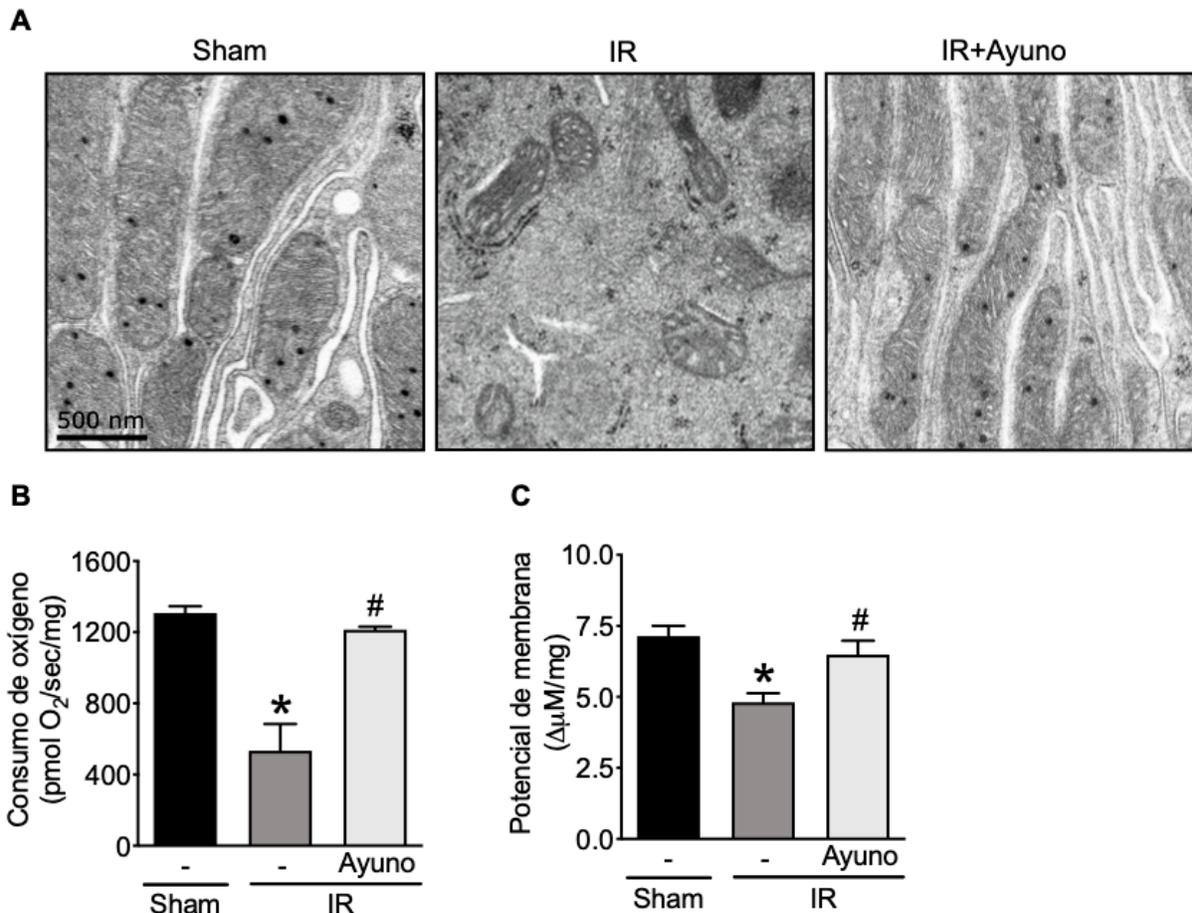
(A) Secciones de riñón teñidas con hematoxilina y eosina a las 24 horas después de la isquemia y reperfusión (IR). Los asteriscos indican necrosis tubular y la punta de fecha indica la presencia de depósitos hialinos (B) Cuantificación de la lesión tubular. (C) Niveles plasmáticos de urea. (D) Niveles plasmáticos de creatinina. (E) Niveles de expresión de la molécula de lesión renal 1 (KIM-1) en homogeneizados de corteza renal. Los datos se expresan como el promedio  $\pm$  error estándar de la media.  $n=5-6$ , \* $p < 0.05$  versus sham, # $p < 0.05$  versus IR.



**Figura 11. Efecto del ayuno sobre el estrés oxidante (24 horas).**

(A) Inmunodetección de 3-nitrotirosina en secciones de corteza renal a las 24 horas después de la isquemia y reperfusión (IR). (B) Niveles de proteínas oxidadas en homogeneizados de riñón. (C) Actividad total de la superóxido dismutasa (SOD). (D) Actividad total de la glutatión peroxidasa (GPx). Los datos se expresan como el promedio  $\pm$  error estándar de la media.  $n=5-6$ , \* $p < 0.05$  versus sham, # $p < 0.05$  versus IR.

La IR promovió la fragmentación de las mitocondrias y la pérdida de las crestas mitocondriales, mientras que el ayuno preservó la morfología y la ultraestructura normal de las mitocondrias en las células epiteliales del túbulo proximal (**Figura 12A**). El consumo del oxígeno de mitocondrias aisladas de la corteza renal en estado 3 (ADP) disminuyó con la IR mientras que el ayuno evitó este decremento (**Figura 12B**). También, el ayuno mantuvo el potencial de membrana mitocondrial durante la IR (**Figura 12C**).

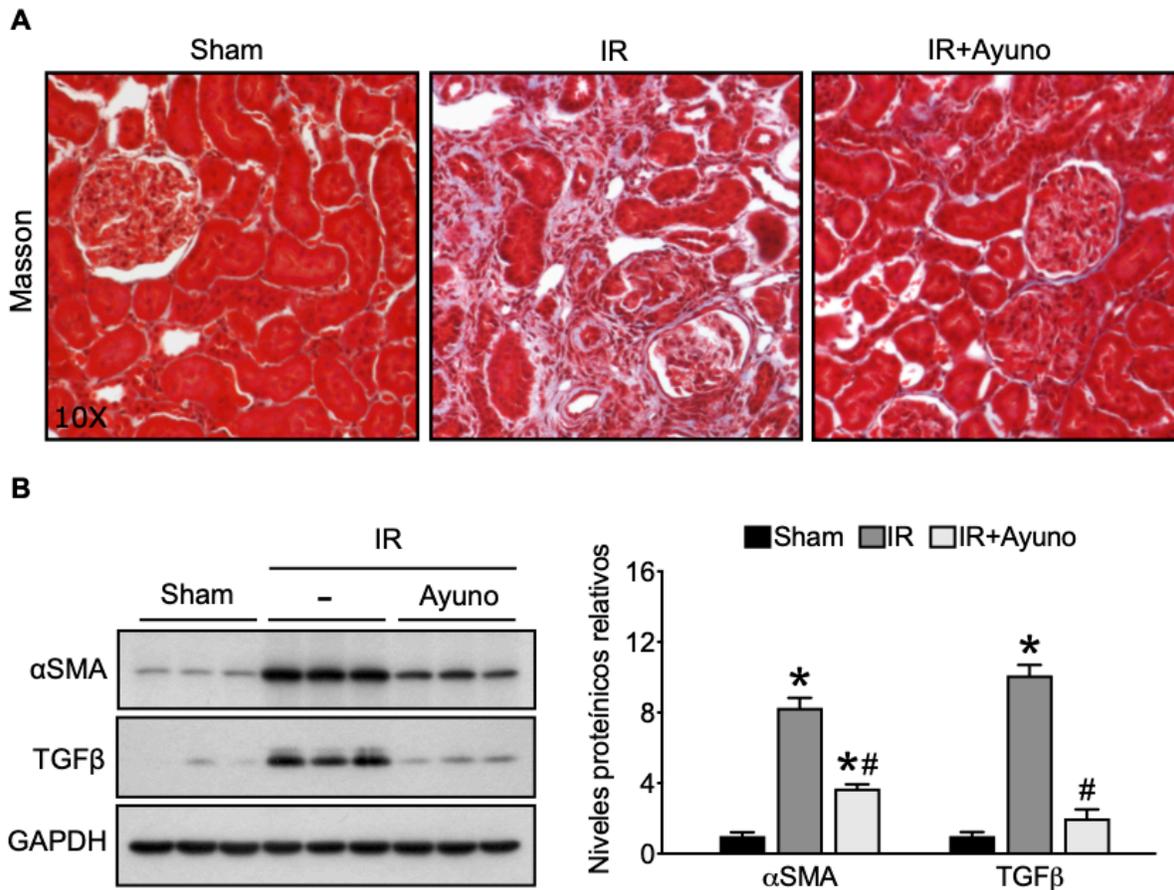


**Figura 12. Efecto del ayuno sobre la estructura y función mitocondrial (24 horas).** (A) Micrografías representativas de las mitocondrias en las células epiteliales del túbulo proximal a las 24 horas después de la isquemia y reperfusión (IR). (B) Tasa del consumo del oxígeno en mitocondrias aisladas en estado 3 (presencia de ADP) usando malato y glutamato como sustratos. (C) Potencial de membrana mitocondrial. Los datos se expresan como el promedio  $\pm$  error estándar de la media.  $n=5-6$ , \* $p < 0.05$  versus sham, # $p < 0.05$  versus IR.

#### 7.4 El ayuno reduce la fibrosis en la fase crónica

A las dos semanas después de la IR (fase crónica), los riñones desarrollaron fibrosis intersticial evidenciada por la tinción de Masson (que indica la presencia de fibras de colágeno) y el aumento en los niveles de expresión del factor de crecimiento transformante beta (TGF $\beta$ ) y de la alfa actina de músculo liso ( $\alpha$ SMA), ambos marcadores clásicos de fibrosis (Figura 13A, B). El ayuno previno la fibrosis intersticial,

ya que disminuyó la presencia de colágeno (coloración azul) y los marcadores de fibrosis.



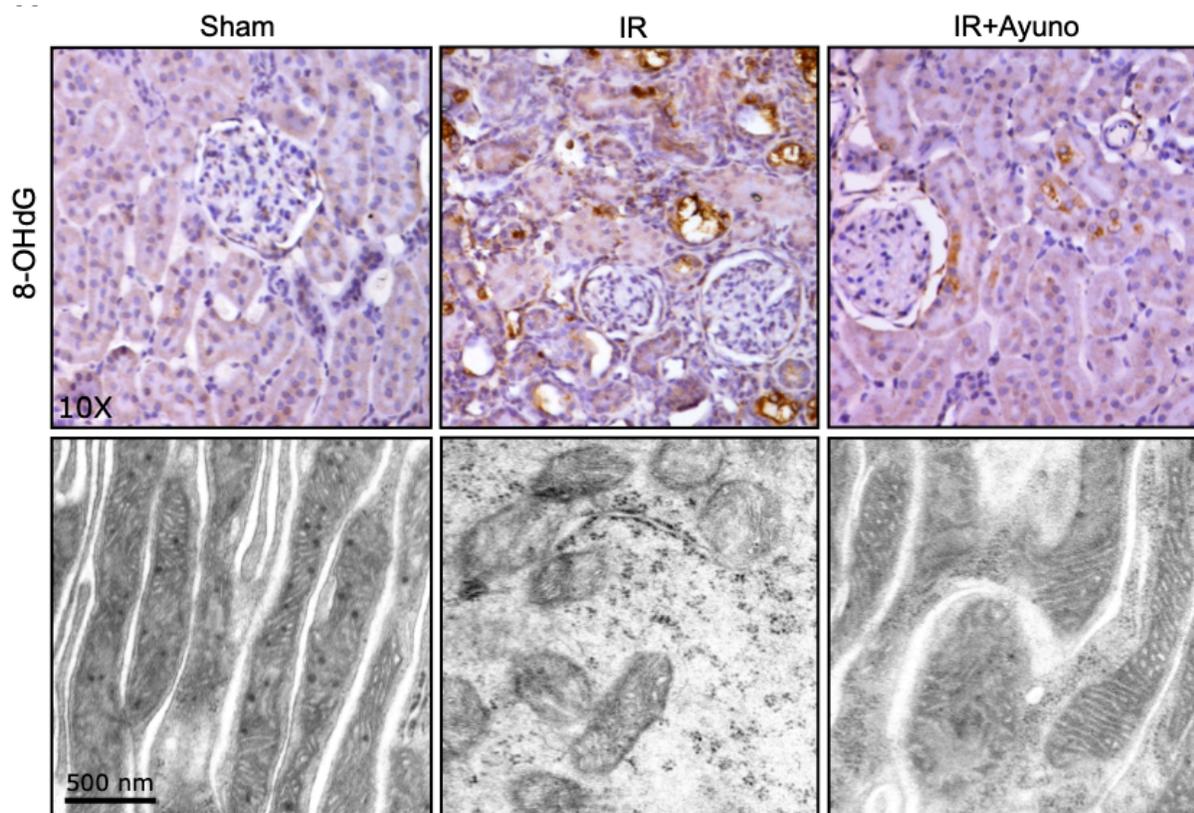
**Figura 13. Efecto del ayuno en la lesión renal isquémica (2 semanas).**

(A) Secciones de riñón teñidas con tricrómica de Masson que muestra las fibras de colágeno (azul) a las 2 semanas después de la isquemia y reperfusión (IR). (B) Niveles de expresión de la alfa actina de músculo liso ( $\alpha$ SMA) y del factor de crecimiento transformante beta (TGF $\beta$ ) en homogeneizados de corteza renal. Los datos se expresan como el promedio  $\pm$  error estándar de la media.  $n=5-6$ , \* $p < 0.05$  versus sham, # $p < 0.05$  versus IR.

### 7.5 El ayuno reduce el estrés oxidante y el daño mitocondrial en la fase crónica

Se evaluó el efecto del ayuno en la persistencia del estrés oxidante y del daño mitocondrial en la fase crónica (2 semanas) de la lesión renal isquémica. Para esto se evaluó el daño oxidante de los ácidos nucleicos mediante la determinación de 8-hidroxi-2-desoxiguanina (8-OHdG) por inmunohistoquímica y la morfología mitocondrial por microscopía electrónica (**Figura 14**). Así como en la fase aguda, el ayuno previno

tanto el estrés oxidante como la fragmentación mitocondrial en la fase crónica de la lesión.

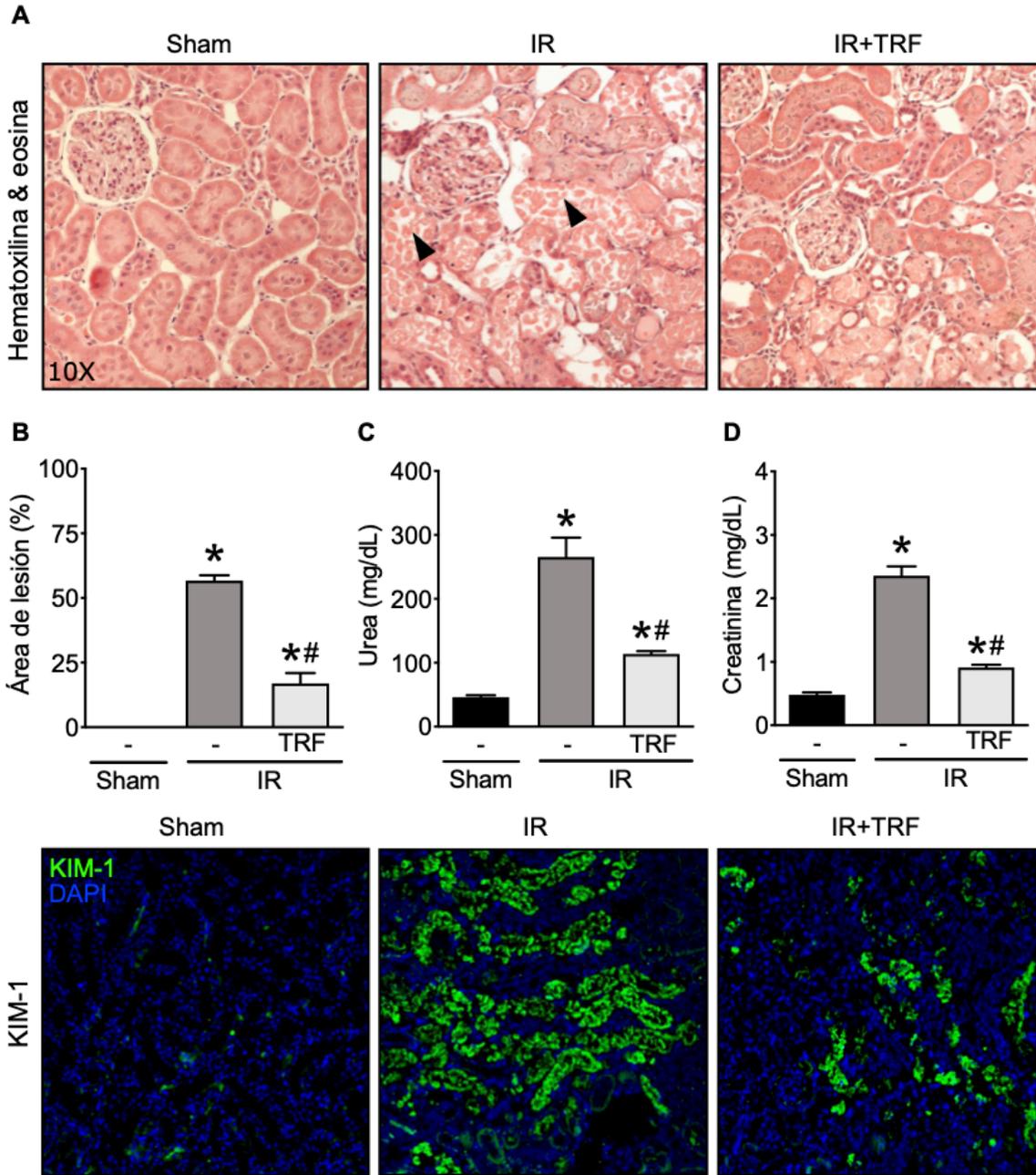


**Figura 14. Efecto del ayuno sobre el estrés oxidante y la fragmentación mitocondrial (2 semanas).**

(Panel superior) Detección por inmunohistoquímica de 8-hidroxi-2-desoxiguanina (8-OHdG) en secciones de corteza renal a las 2 semanas después de la isquemia y reperfusión (IR). (Panel inferior) Micrografías representativas de las mitocondrias en las células epiteliales del túbulo proximal.

## 7.6 La TRF protege contra la lesión renal isquémica

Con la idea de encontrar una intervención nutricional que pudiera proteger de la IR renal pero que fuera menos severa que el ayuno, se evaluó el efecto de la TRF por una semana antes de la IR renal. Esta intervención, también previno tanto el daño tubular (área de lesión tubular y presencia de KIM-1) (**Figura 15A, B, E**) así como la disfunción renal (estimada indirectamente con la determinación de la urea y la creatinina en plasma) que ocurren a las 24 horas después de IR renal (**Figura 15C, D**).

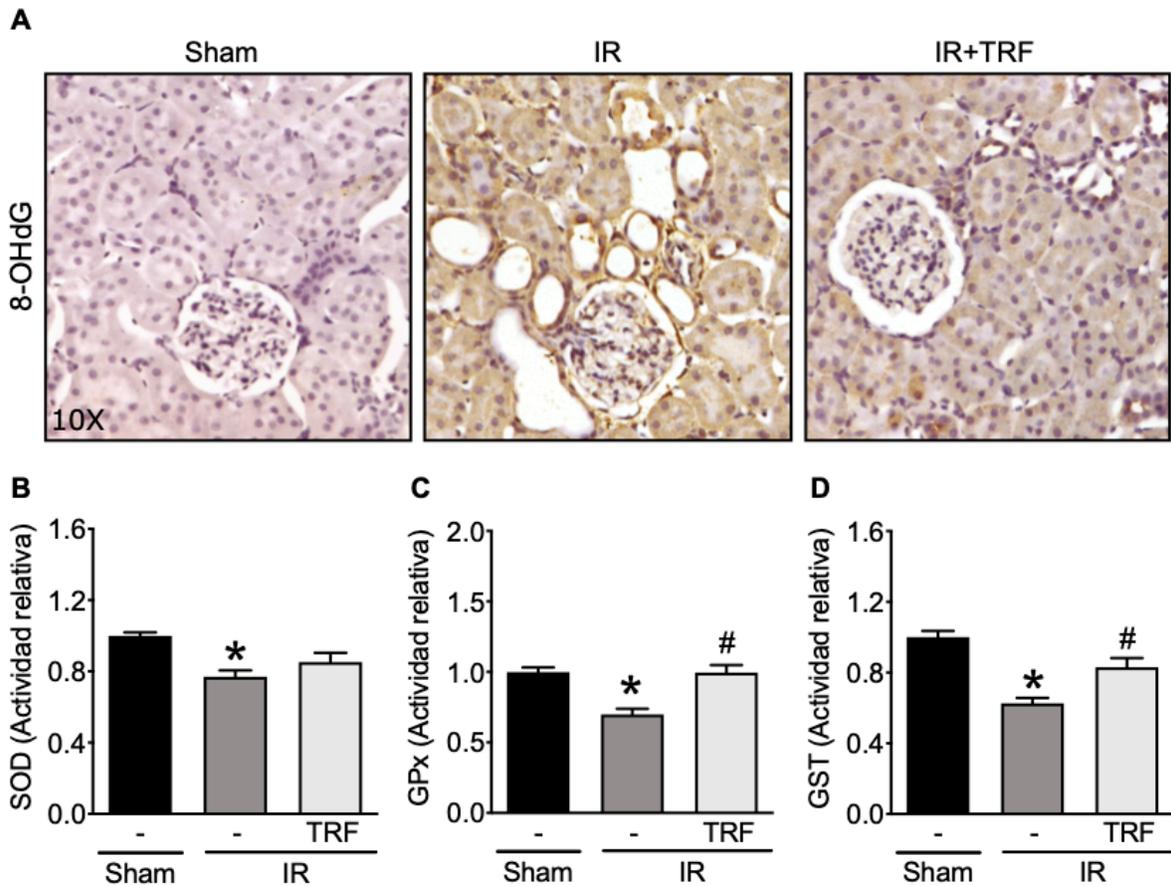


**Figura 15. Efecto de la restricción temporal del alimento (TRF) en la lesión renal isquémica (24 horas).**

(A) Secciones de riñón teñidas con hematoxilina y eosina a las 24 horas después de la isquemia y reperfusión (IR). Las puntas de flecha indican necrosis tubular (B) Cuantificación de la lesión tubular. (C) Niveles plasmáticos de urea. (D) Niveles plasmáticos de creatinina. (E) Detección por inmunofluorescencia de la molécula de lesión renal 1 (KIM-1) en secciones de corteza renal. Los datos se expresan como el promedio  $\pm$  error estándar de la media.  $n=5-6$ , \* $p < 0.05$  versus sham, # $p < 0.05$  versus IR.

## 7.7 La TRF reduce el estrés oxidante y la fragmentación mitocondrial

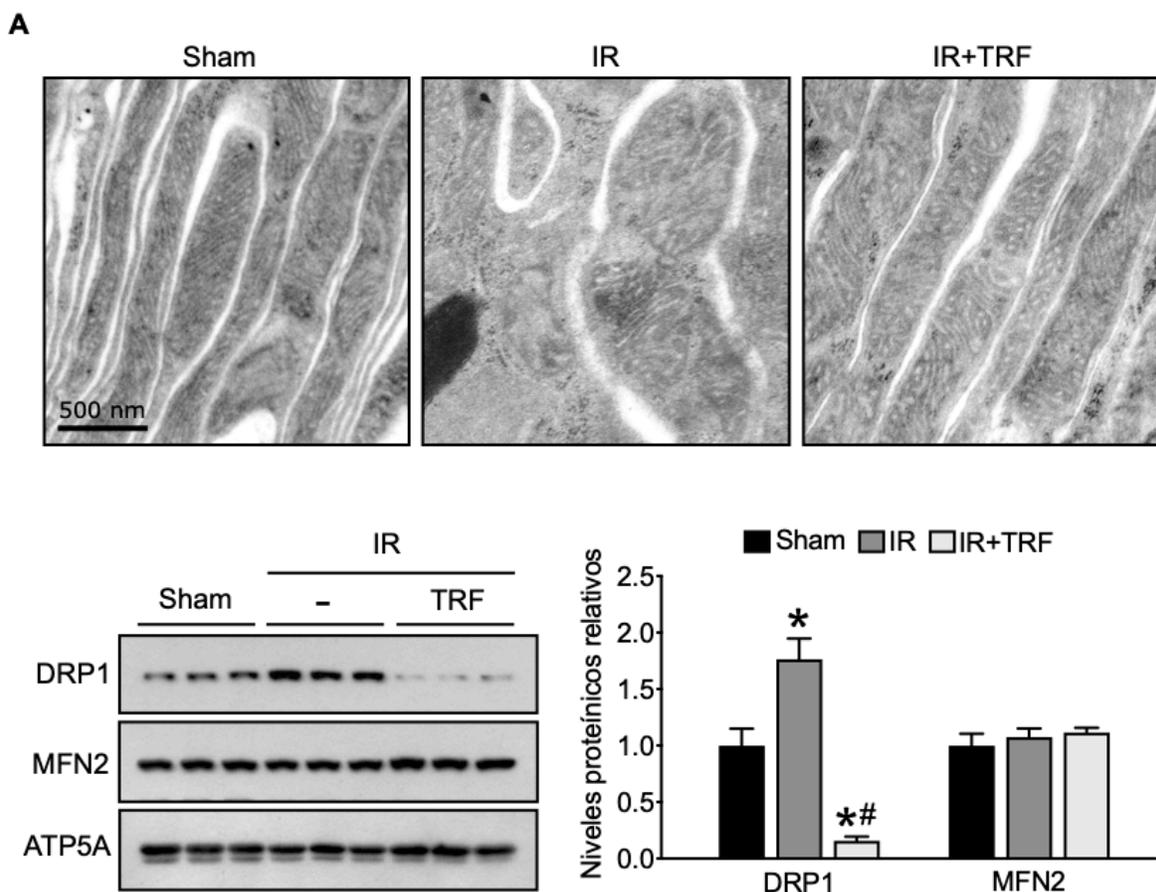
La TRF previno el incremento en los niveles de oxidación de los ácidos nucleicos (8-OHdG) inducidos por la IR renal (**Figura 16A**). Aunque la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, GPx y GST disminuyó a las 24 horas después de la IR renal, la TRF solamente previno el decremento de la actividad de la GPx y la GST (**Figura 16B-D**).



**Figura 16. Efecto de la restricción temporal del alimento (TRF) sobre el estrés oxidante (24 horas).**

(A) Detección por inmunohistoquímica de 8-hidroxi-2-desoxiguanina (8-OHdG) en secciones de corteza renal a las 24 horas después de la isquemia y reperusión (IR). (B) Actividad total de la superóxido dismutasa (SOD). (C) Actividad total de la glutatión peroxidasa (GPx). (D) Actividad total de la glutatión S-transferasa (GST). Los datos se expresan como el promedio  $\pm$  error estándar de la media.  $n=5-6$ , \* $p < 0.05$  versus sham, # $p < 0.05$  versus IR.

La TRF previno la fragmentación mitocondrial y la pérdida de las crestas mitocondrias a las 24 horas depures de la IR (**Figura 17A**). Este efecto se asoció con cambios en los niveles mitocondriales de la proteína de fisión mitocondrial DRP1: mientras que la IR aumentó los nivel de DRP1 en la mitocondria, la TRF causó una disminución de esta proteína. No se detectaron cambios en los niveles mitocondriales de la proteína de fusión mitocondrial MFN2 en ninguno de los grupos a las 24 horas después de la IR (**Figura 17B**).

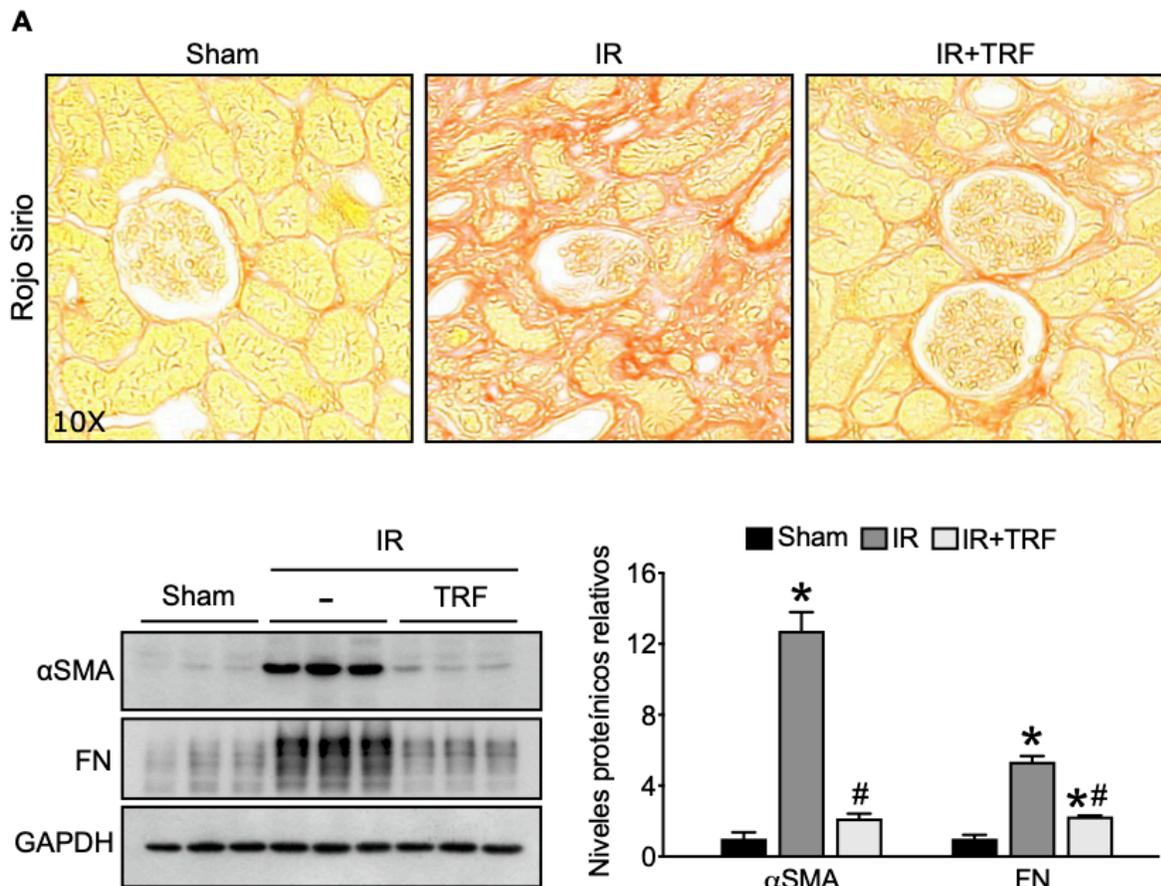


**Figura 17. Efecto de la restricción temporal del alimento (TRF) sobre la fragmentación mitocondrial (24 horas).**

(A) Micrografías representativas de las mitocondrias en las células epiteliales del túbulo proximal a las 24 horas después de la isquemia y reperfusión (IR). (B) Niveles de expresión de la proteína relacionada a la dinamina 1 (DRP1) y de la mitofusina 2 (MFN2) en mitocondrias aisladas de la corteza renal. Los datos se expresan como el promedio  $\pm$  error estándar de la media.  $n=5-6$ , \* $p < 0.05$  versus sham, # $p < 0.05$  versus IR.

## 7.8 La TRF reduce la fibrosis en la fase crónica de la lesión

A las dos semanas después de la lesión (fase crónica), los riñones mostraron presencia de fibrosis intersticial evidenciada por la tinción de Rojo sirio y el aumento en los niveles de expresión de fibronectina (FN) y la  $\alpha$ SMA, ambos marcadores de fibrosis (**Figura 18A, B**). La TRF disminuyó la fibrosis intersticial ya que disminuyó la presencia de colágeno (coloración roja) y de los marcadores de fibrosis.

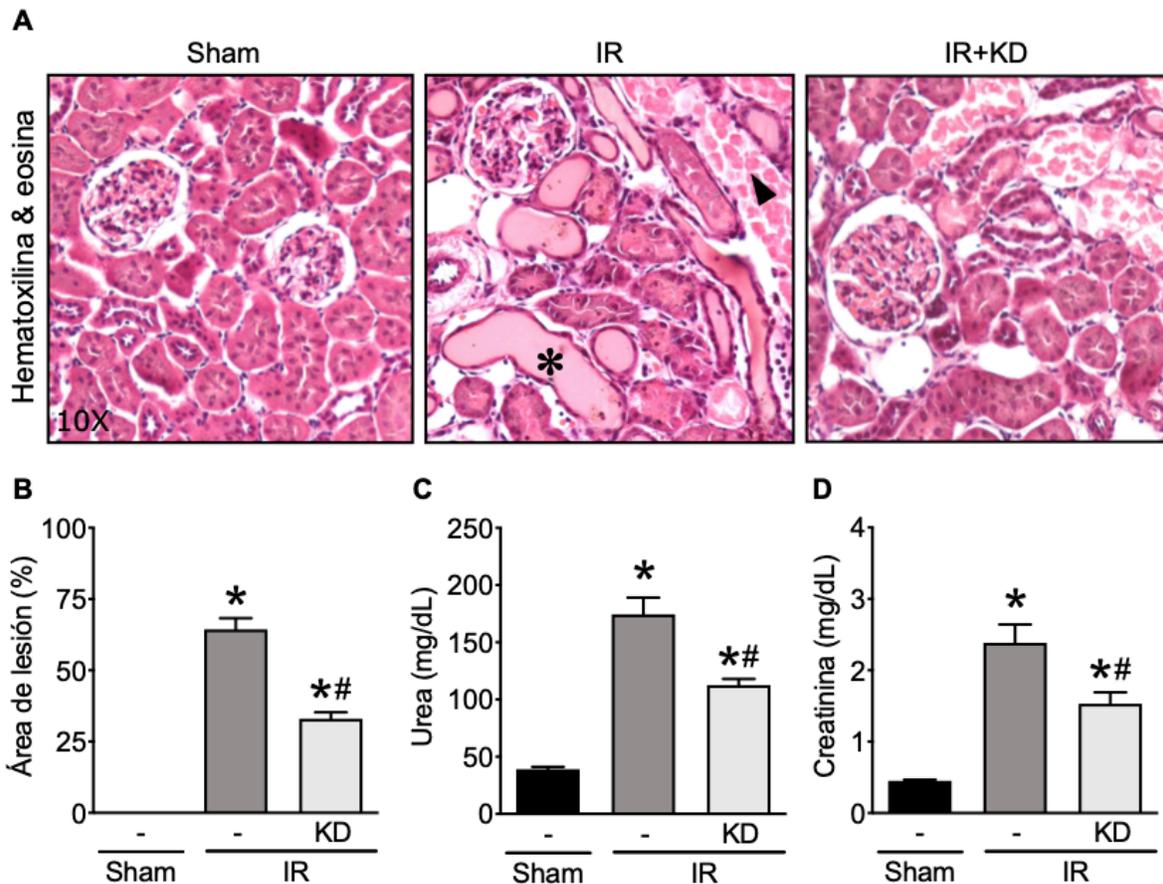


**Figura 18. Efecto de la restricción temporal del alimento (TRF) en la lesión renal isquémica (2 semanas).**

(**A**) Secciones de riñón teñidas con Rojo sirio que muestra las fibras de colágeno (color rojo) a las 2 semanas después de la isquemia y reperfusión (IR). (**B**) Niveles de expresión de la alfa actina de músculo liso ( $\alpha$ SMA) y de la fibronectina (FN) en homogeneizados de corteza renal. Los datos se expresan como el promedio  $\pm$  error estándar de la media.  $n=5-6$ , \* $p < 0.05$  versus sham, # $p < 0.05$  versus IR.

## 7.9 La KD previene la lesión renal isquémica

Se evaluó el efecto de la KD en la fase aguda (24 horas) de la lesión renal isquémica. Las ratas alimentadas con la KD durante 3 días antes de la IR renal presentaron un área de lesión reducida (**Figura 19A, B**) y una disminución en los niveles de urea y creatinina en comparación con las ratas alimentadas con la dieta control a las 24 horas después de la lesión (**Figura 19C, D**).

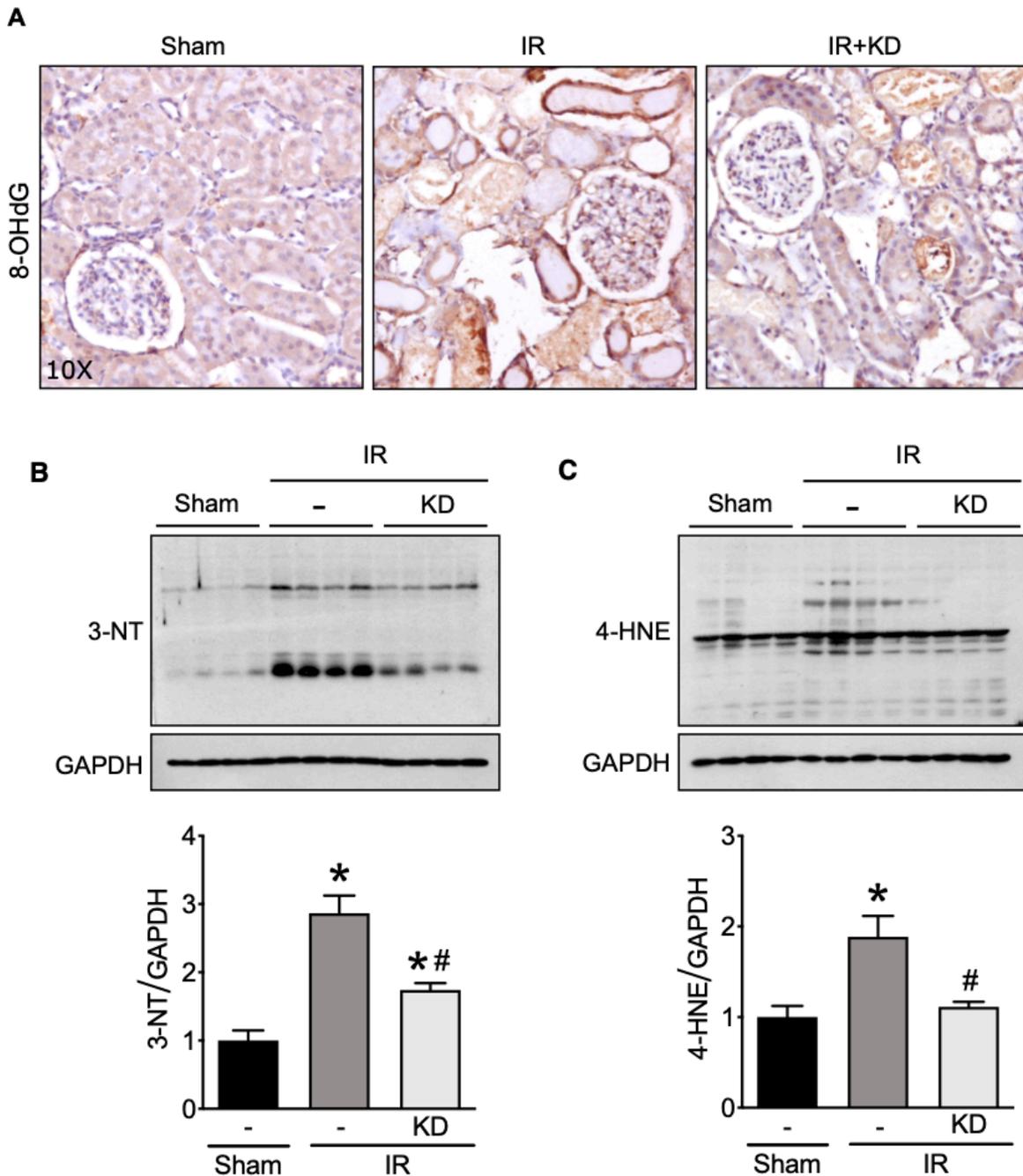


**Figura 19. Efecto de la dieta cetogénica (KD) en la lesión renal isquémica (24 horas).**

(A) Secciones de riñón teñidas con hematoxilina y eosina a las 24 horas después de la isquemia y reperfusión (IR). El asterisco indica la presencia de depósitos hialinos y la punta de flecha indica necrosis tubular (B) Cuantificación de la lesión tubular. (C) Niveles plasmáticos de urea. (D) Niveles plasmáticos de creatinina. Los datos se expresan como el promedio  $\pm$  error estándar de la media.  $n=5-6$ , \* $p < 0.05$  versus sham, # $p < 0.05$  versus IR.

## 7.10 La KD reduce el estrés oxidante y la inflamación

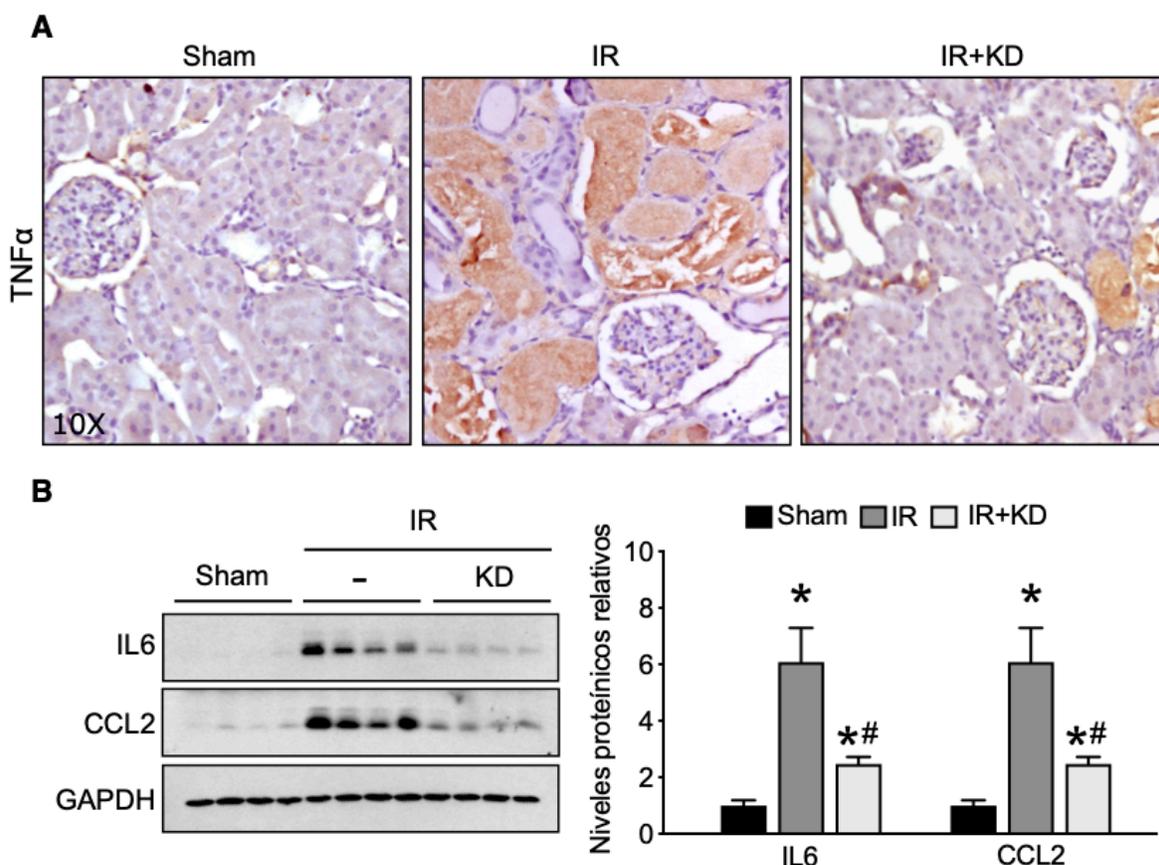
Las ratas alimentadas con KD presentaron una reducción en los niveles de 8-OHdG, 3-NT y 4-HNE en comparación con las ratas con dieta control a las 24 horas después de la IR renal (**Figura 20**).



### Figura 20. Efecto de la dieta cetogénica (KD) sobre el estrés oxidante (24 horas).

(A) Detección por inmunohistoquímica de 8-hidroxi-2-desoxiguanina (8-OHdG) en secciones de corteza renal a las 24 horas después de la isquemia y reperfusión (IR). (B) Niveles de proteínas nitradas (3-NT) y (C) proteínas con aductos 4-hidroxinonenal (4-HNE) en homogeneizados de corteza renal. Se cuantificaron todas las proteínas inmunoreactivas para 3-NT o 4-HNE. Los datos se expresan como el promedio  $\pm$  error estándar de la media.  $n=5-6$ ,  $*p < 0.05$  versus sham,  $\#p < 0.05$  versus IR.

En las ratas alimentadas con la dieta control, la IR renal incrementó los niveles de TNF $\alpha$ , IL6 y CCL2 en el riñón (Figura 21). Sin embargo, el incremento de los mediadores inflamatorios se redujo en las ratas alimentadas con KD.

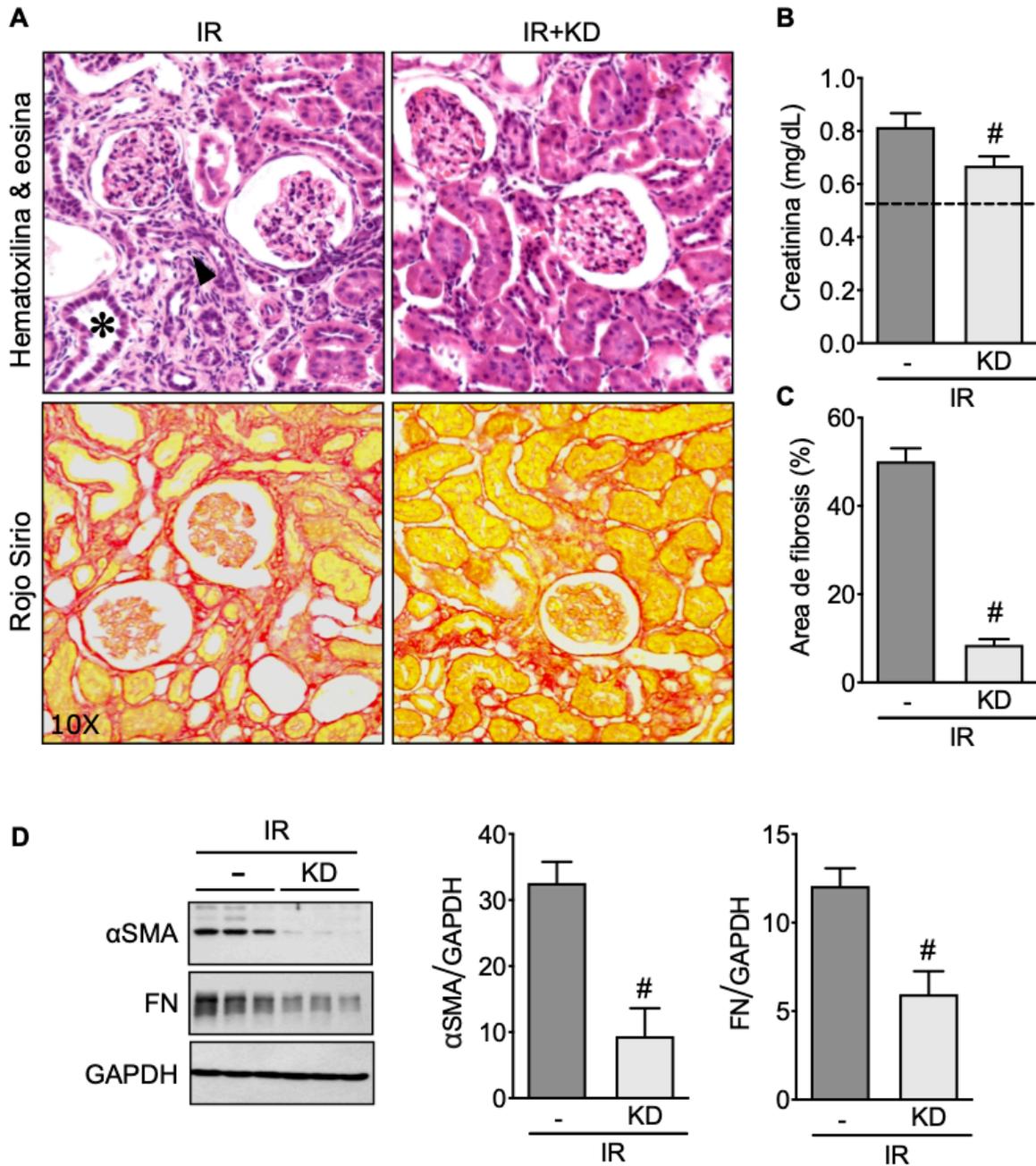


### Figura 21. Efecto de la dieta cetogénica (KD) sobre la inflamación (24 horas).

(A) Detección por inmunohistoquímica del factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) en secciones de corteza renal a las 24 horas después de la isquemia y reperfusión (IR). (B) Niveles de expresión de la interleucina 6 (IL6) y el ligando 2 de la quimiocina (CCL2) en homogeneizados de corteza renal. Los datos se expresan como el promedio  $\pm$  error estándar de la media.  $n=5-6$ ,  $*p < 0.05$  versus sham,  $\#p < 0.05$  versus IR.

## 7.11 La KD previene la disfunción renal y la fibrosis en la fase crónica

A las 2 semanas después de la IR renal, las ratas alimentadas con la dieta control presentaron atrofia tubular, infiltración celular, altos niveles de creatinina en plasma y desarrollaron fibrosis intersticial (**Figura 22**). No obstante, las ratas alimentadas con la KD presentaron una reducción en los marcadores mencionados.



## Figura 22. Efecto de la dieta cetogénica (KD) en la lesión renal isquémica (2 semanas).

(A) Secciones de riñón teñidas con hematoxilina y eosina y Rojo sirio (fibras de colágeno) a las 2 semanas después de la isquemia y reperfusión (IR). El asterisco indica la presencia de túbulos dilatados y la punta de flecha indica infiltración celular. (B) Niveles plasmáticos de creatinina. (C) Cuantificación de la fibrosis intersticial. (D) Niveles de expresión de la alfa actina de músculo liso ( $\alpha$ SMA) y de la fibronectina (FN) en homogeneizados de corteza renal. Los datos se expresan como el promedio  $\pm$  error estándar de la media. n=5-6, #p < 0.05 versus IR.

### 7.12 Resumen de resultados

Para facilitar la interpretación de los datos obtenidos, en la siguiente tabla se resume el efecto de las intervenciones nutricionales en la lesión renal isquémica.

**Tabla 4: Resumen de resultados**

	Ayuno	TRF	KD
Lesión tubular aguda	↓	↓	↓
Función renal	↑	↑	↑
Estrés oxidante	↓	↓	↓
Daño mitocondrial	↓	↓	ND
Inflamación	ND	ND	↓
Fibrosis	↓	↓	↓

ND, No determinado.

## 8 DISCUSIÓN

La lesión renal isquémica es un problema grave de salud pública para el que actualmente no existen terapias efectivas en la clínica [22]. Se caracteriza por un daño tubular severo en la fase aguda y el desarrollo progresivo de fibrosis intersticial en etapas avanzadas [17,19]. Tanto en la fase aguda como en la crónica participan múltiples mecanismos que propician el daño tubular y el deterioro de la función renal. De estos, el estrés oxidante, la inflamación y la disfunción mitocondrial persistentes parecen ser los más relevantes [21,23,82]. Por ejemplo, el TGF $\beta$ , quien promueve la síntesis y expansión de la matriz extracelular, favorece la activación de sistemas pro-oxidantes como la NADPH oxidasa y la supresión de las defensas antioxidantes [83-85]. El desequilibrio redox en cambio conduce a la disfunción mitocondrial y al mismo tiempo las mitocondrias dañadas sintetizan menos ATP y generan una mayor cantidad de radicales libres [86]. Además, el estrés oxidante y la disfunción mitocondrial contribuyen independientemente a la inflamación crónica y a la activación de señales pro-fibrogénicas como el TGF $\beta$ , creándose así un círculo vicioso que termina por eliminar la función renal remanente y propiciar la muerte de los individuos [30,87].

La restricción dietaria se conoce ampliamente como una fuerte intervención no farmacológica que incrementa la protección contra el estrés y reduce la incidencia de patologías asociadas con la edad, principalmente por sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias [43,44,46]. La restricción dietaria también preserva la estructura y la función mitocondrial en una gran variedad de escenarios patológicos [43]. Sin embargo, se sabe muy poco de sus efectos en el riñón [88]. En este trabajo estudiamos el efecto de tres intervenciones nutricionales (el ayuno, la TRF y la KD) sobre los mecanismos fisiopatológicos que se inducen en la lesión renal isquémica.

Primero, proporcionamos evidencia de que el ayuno prolongado previene el estrés oxidante y la disfunción mitocondrial tanto en la fase aguda como en la fase crónica de la lesión y que también tiene un efecto protector a largo plazo contra la fibrosis, enfatizando así el uso del ayuno como una opción preventiva no farmacológica de importancia médica para mejorar el resultado de la lesión renal isquémica [89,90].

Adicionalmente encontramos que las ratas sometidas durante una semana a un protocolo de TRF, el cual es menos severo que el ayuno dado que durante la intervención las ratas pierden solo el 5% del peso corporal, también se obtienen los mismos efectos benéficos sobre el estrés oxidante y el daño mitocondrial y se previene el desarrollo de fibrosis intersticial, limitándose así la transición de la AKI a CKD [91]. Estos resultados podrían tener implicaciones importantes para la clínica dado que no se requerirían protocolos largos de restricción dietaria para proporcionar protección renal. Actualmente, el ayuno prolongado y la TRF son intervenciones nutricionales cada vez más recomendadas para promover la salud metabólica y contrarrestar distintas enfermedades en humanos [46,49]. Sin embargo, aunque es benéfico a corto plazo, el protocolo de TRF utilizado en el presente trabajo implica un período de ayuno extremo (22 horas) en ratas y claramente podría no ser factible a largo plazo para los humanos. Por lo tanto, para que un protocolo similar de TRF se utilice como estrategia profiláctica en la isquemia renal, se requiere más investigación, empezando con el diseño e implementación de regímenes nutricionales en humanos que incluyan por ejemplo una sola comida al día. Por el momento, protocolos de TRF que involucran un periodo de ayuno de al menos 16 horas al día se han implementado exitosamente en humanos; se ha encontrado que imparten efectos positivos en la salud metabólica y reducen el estrés oxidante y la inflamación cuando se implementan por varias semanas o meses [92,93].

Impulsados por la idea de que la KD revierte la nefropatía diabética y la enfermedad renal poliquística [74,75] y confiere fuerte protección en modelos experimentales de isquemia cerebral y cardíaca [76,77], demostramos que esta protección se extiende a los riñones cuando la KD se proporciona durante tres días previos a la isquemia, atenuando la AKI y el desarrollo de fibrosis. Así como el ayuno y la TRF, la KD también previene el daño oxidante a los ácidos nucleicos (8OHdG), las proteínas (3-NT) y los lípidos (4-HNE) y además reduce la expresión de mediadores inflamatorios como las interleucinas IL6, CCL2 y TNF $\alpha$ . El daño tubular, el estrés oxidante y la inflamación persistentes después de la isquemia se amplifican mutuamente e inducen la activación y la proliferación de los fibroblastos residentes en el tejido, que luego se convierten en miofibroblastos (expresan el marcador de miocitos  $\alpha$ SMA) y sintetizan y secretan subsecuentemente grandes cantidades de proteínas de matriz extracelular, incluyendo

la FN y el colágeno, causando fibrosis intersticial, la cual es una característica distintiva de la CKD [13,26].

Dado que el ayuno y la TRF previnieron la fragmentación y el daño mitocondrial, queda por resolver cuál sería el efecto de la KD en la fisiología mitocondrial durante la lesión renal isquémica. También, aunque se encontró que las intervenciones nutricionales previenen el estrés oxidante, el daño mitocondrial y la inflamación que ocurren casi inmediatamente después de la IR renal, no se sabe mucho del efecto que éstas podrían ejercer sobre la homeostasis redox, la fisiología mitocondrial y la respuesta inflamatoria en el riñón sano, sin IR. Por ejemplo, ¿las intervenciones nutricionales activan las defensas antioxidantes y/o reducen el daño oxidante basal en el riñón antes de la IR? ¿Las intervenciones nutricionales promueven la fusión mitocondrial haciendo que las mitocondrias sean más resistentes a la fragmentación con la IR? ¿Las intervenciones nutricionales bloquean la respuesta inflamatoria local y reducen la expresión basal de mediadores inflamatorios antes de la IR? Todas estas preguntas requieren de mayor investigación.

Lo que sí es claro es que las vías de señalización asociadas a los efectos benéficos de las intervenciones nutricionales repercuten sobre la lesión renal isquémica. Por ejemplo, se ha observado que la falta del alimento y la baja disponibilidad de nutrientes conducen a la activación de la AMPK y a la inhibición de mTOR, mientras que la modulación de estas cinasas confiere protección contra la IR renal, al regular el metabolismo energético, la función mitocondrial, la autofagia y la inflamación [94-96]. Así mismo, la restricción dietaria activa la defensa antioxidante a través de NRF2 y FOXO3a, mientras que el tratamiento con antioxidantes naturales o sintéticos así como la inducción genética o la activación farmacológica de NRF2 y FOXO3a en el riñón aumentan la tolerancia contra la AKI después de la IR renal y evitan la progresión a CKD [43,97-99]. Por otro lado, la restricción dietaria reduce la expresión de mediadores inflamatorios tales como NF- $\kappa$ B e interleucinas y disminuye el número de mocitos circulantes y la infiltración [55,100]. Las citocinas, inducidas transcripcionalmente por NF- $\kappa$ B en las células renales lesionadas (especialmente las células epiteliales del túbulo proximal), promueven el reclutamiento de monocitos y macrófagos, quienes secretan factores pro-inflamatorios que exacerbaban la lesión renal [13,101,102]. Otros

elementos importantes son las sirtuinas. Particularmente las sirtuinas 1 y 3, quienes incrementan su expresión durante la falta del alimento, detectan cambios en la disponibilidad de energía a través del aumento en los niveles del NAD<sup>+</sup> y contrarrestan muchos de los mecanismos fisiopatológicos implicados en la lesión renal isquémica, como el estrés oxidante, la inflamación y la disfunción mitocondrial [43,103,104]. Todo esto sugiere la posibilidad de que las intervenciones nutricionales ejerzan protección contra la lesión renal isquémica a través de la regulación de AMPK, mTOR, las sirtuinas, y los factores de transcripción NF-κB, FOXO3 y NRF2.

Dado que las tres intervenciones nutricionales estudiadas incrementan (más del doble) la producción endógena de cuerpos cetónicos, también especulamos que el β-hidroxibutirato podría contribuir a los efectos benéficos observados en la lesión renal isquémica, dado que además de proporcionar energía a través de las mitocondrias, funciona como una molécula de señalización [105] que orquesta un programa antioxidante y antiinflamatorio ante distintas formas de estrés [67] y específicamente incrementa la tolerancia a la isquemia renal cuando se administra de manera exógena, previniendo el daño renal mediante la activación de FOXO3a e inhibiendo la muerte celular por piroptosis [106]. De igual manera, aunque en este estudio no se determinaron sus niveles, es importante considerar también al acetoacetato (pareja redox y precursor del β-hidroxibutirato), quien, además de proveer de energía a las células y a los tejidos tal como el β-hidroxibutirato, también hace frente a distintas formas de estrés [105]. Por otro lado, la relación [β-hidroxibutirato]/[acetoacetato] puede ser determinante en el mantenimiento del estado redox celular a nivel sistémico mediante la regulación del [NADH]/[NAD] en el hígado, donde los cuerpos cetónicos se producen, y en los tejidos extrahepáticos, donde los cuerpos cetónicos se utilizan. Dado que el ayuno, la TRF y la KD se asocian con cambios importantes en los niveles plasmáticos del β-hidroxibutirato (más que del acetoacetato) [107, 108], favoreciéndose así un ambiente más reducido, el aumento de la relación [β-hidroxibutirato]/[acetoacetato] podría explicar en parte la protección antioxidante observada con las intervenciones nutricionales en la lesión renal isquémica.

Otro aspecto que merece mayor estudio es la interacción recíproca entre la restricción dietaria y la fisiología circadiana. Por ejemplo, mientras que la restricción dietaria

aumenta la amplitud y corrige el desfase de los ritmos circadianos, se requiere de relojes moleculares intactos para observar los efectos de la restricción dietaria sobre el metabolismo y la longevidad [19-111]. Esta interacción podría ser relevante en la protección renal mediada por el ayuno, la TRF y la KD. En el caso de la TRF, sería importante también determinar si el efecto es similar cuando se implementa durante las horas activas de la rata, es decir durante la noche.

Finalmente, si las intervenciones nutricionales estudiadas tienen potencial traslacional merece un análisis experimental adicional. Por ejemplo, una limitación en este estudio es que solamente se emplearon ratas jóvenes, sanas y con función renal normal. Por lo tanto, nuestros hallazgos no podrían extrapolarse directamente a los ancianos, a las personas de mayor riesgo o a los enfermos, en quienes los efectos de las intervenciones podrían anularse e incluso resultar en una lesión exacerbada. Además, el tiempo del estudio fue demasiado corto y, por lo tanto, se deben diseñar protocolos futuros para descartar posibles efectos adversos, tal como la cetoacidosis y la nefrolitiasis que ocurren con frecuencia cuando la KD se implementa por varias semanas o meses [73,112]. Otra limitante es que solamente se usaron ratas macho. Dado que los estudios sugieren que sexo biológico influye en ciertos efectos impartidos por restricción dietaria (longevidad, resistencia a la insulina, etc) y que los hombres son más susceptibles a las enfermedades renales en general y muestran un mayor riesgo de desarrollar AKI en particular [113,114], podría ser posible que los resultados obtenidos tampoco apliquen para las mujeres.

## 9 CONCLUSIÓN

El ayuno prolongado, la TRF y la KD son potentes intervenciones nutricionales que previenen la lesión renal isquémica experimental, particularmente porque reducen el estrés oxidante, la disfunción mitocondrial, la inflamación y el desarrollo de fibrosis. Nuestros resultados amplían nuestra comprensión de los efectos de estas intervenciones en el riñón y sugieren nuevas aproximaciones no farmacológicas de gran valor clínico para promover la resistencia contra la lesión renal isquémica.

## 10 PERSPECTIVAS

- En este trabajo solamente se investigó el efecto de las intervenciones nutricionales antes de la isquemia renal, por lo que sería importante investigar cuál es el resultado cuando se implementan después del establecimiento de la lesión.
- Dado que se reportó que el  $\beta$ -hidroxibutirato reduce la lesión renal isquémica cuando se administra antes de la IR, también sería interesante probar si la suplementación dietaria con sales del  $\beta$ -hidroxibutirato o precursores biosintéticos de este (ésteres o alcoholes) después de la isquemia también reduce el estrés oxidante, la disfunción mitocondrial, la inflamación y la fibrosis.
- Es necesario investigar si la KD per se provoca daño renal cuando se implementa por varias semanas o meses.
- ¿Cuál sería el efecto de un protocolo de TRF en dónde se combinen el ayuno y la realimentación con KD antes de la isquemia renal?

## 11 REFERENCIAS

- [1] Lote C. Principles of renal physiology, 4th ed, Springer New York, 2014.
- [2] Hall JE & Hall ME. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology, 14th ed, Elsevier, 2020.
- [3] Baverel G, Ferrier B & Martin M. Fuel selection by the kidney: Adaptation to starvation, *Proc Nutr Soc.* **54** (1995) 197–212.
- [4] Bhargava P & Schnellmann RG. Mitochondrial energetics in the kidney, *Nat Rev Nephrol.* **13** (2017) 629–646.
- [5] Makris K & Spanou L. Acute kidney injury: Definition, pathophysiology and clinical phenotypes, *Clin Biochem Rev.* **37** (2016) 85–98.
- [6] Lewington AJ, Cerdá J & Mehta RL. Raising awareness of acute kidney injury: A global perspective of a silent killer, *Kidney Int.* **84** (2013) 457–467.
- [7] Kellum JA, Romagnani P, Ashuntantang G, et al. Acute kidney injury, *Nat Rev Dis Primers* **7** (2021) 52.
- [8] Basile DP, Anderson MD & Sutton TA. Pathophysiology of acute kidney injury, *Compr Physiol.* **2** (2012) 1303–1353.
- [9] Chawla LS & Kimmel PL. Acute kidney injury and chronic kidney disease: an integrated clinical syndrome, *Kidney Int.* **82** (2012) 516–524.
- [10] Kalantar-Zadeh K, Jafar TH, Nitsch D, et al. Chronic kidney disease, *Lancet* **398** (2021) 786–802.
- [11] Romagnani P, Remuzzi G, Glassock R, et al. Chronic kidney disease, *Nat Rev Dis Primers* **3** (2017) 17088.
- [12] Chen TK, Knicely DH & Grams ME. Chronic kidney disease diagnosis and management: A review, *JAMA* **322** (2019) 1294–1304.
- [13] He L, Wei Q, Liu J, et al. AKI on CKD: Heightened injury, suppressed repair, and the underlying mechanisms, *Kidney Int.* **92** (2017) 1071–1083.
- [14] Moore PK, Hsu RK & Liu KD. Management of Acute kidney injury: Core curriculum, *Am J Kidney Dis.* **72** (2018) 136–148.
- [15] Ronco C, Ricci Z, De Backer D, et al. Renal replacement therapy in acute kidney injury: Controversy and consensus, *Crit Care* **19** (2015) 146.
- [16] Bagshaw SM & Wald R. Acute kidney injury: Timing of renal replacement therapy in AKI, *Nat Rev Nephrol.* **12** (2016) 445–446.
- [17] Bonventre JV & Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury, *J Clin Invest.* **121** (2011) 4210–4221.

- [18] Eltzschig HK & Eckle T. Ischemia and reperfusion—From mechanism to translation, *Nat Med*. **17** (2011) 1391–401.
- [19] Sharfuddin AA & Molitoris BA. Pathophysiology of ischemic acute kidney injury, *Nat Rev Nephrol*. **7** (2011) 189–200.
- [20] Granger DN & Kvietys PR. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept, *Redox Biol*. **6** (2015) 524–551.
- [21] Clark AJ & Parikh SM. Mitochondrial metabolism in acute kidney injury, *Semin Nephrol*. **40** (2020) 101–113.
- [22] Han SJ & Lee HT. Mechanisms and therapeutic targets of ischemic acute kidney injury, *Kidney Res Clin Pract*. **38** (2019) 427–440.
- [23] Huen SC & Cantley LG. Macrophage-mediated injury and repair after ischemic kidney injury, *Pediatr Nephrol*. **30** (2015) 199–209.
- [24] Fattah H & Vallon V. Tubular recovery after acute kidney injury, *Nephron* **140** (2018) 140–143.
- [25] Kumar S. Cellular and molecular pathways of renal repair after acute kidney injury, *Kidney Int*. **93** (2018) 27–40.
- [26] Humphreys BD. Mechanisms of renal fibrosis, *Annu Rev Physiol*. **80** (2018) 309–326.
- [27] Basile DP. The endothelial cell in ischemic acute kidney injury: Implications for acute and chronic function, *Kidney Int*. **72** (2017) 151–156.
- [28] Lv W, Booz GW, Fan F, et al. Oxidative stress and renal fibrosis: Recent insights for the development of novel therapeutic strategies, *Front Physiol*. **9** (2018) 105.
- [29] Jiang M, Bai M, Lei J, et al. Mitochondrial dysfunction and the AKI-to-CKD transition, *Am J Physiol Renal Physiol*. **319** (2020) F1105–F1116.
- [30] Meng XM, Nikolic-Paterson DJ & Lan HY. Inflammatory processes in renal fibrosis, *Nat Rev Nephrol*. **10** (2014) 493–503.
- [31] Wang T, Hung CC & Randall DJ. The comparative physiology of food deprivation: From feast to famine, *Annu Rev Physiol*. **68** (2006) 223–251.
- [32] McCue MD. Starvation physiology: Reviewing the different strategies animals use to survive a common challenge, *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. **156** (2010) 1–18.
- [33] Longo VD & Mattson MP. Fasting: Molecular mechanisms and clinical applications, *Cell Metab*. **19** (2014) 181–192.
- [34] Anton SD, Moehl K, Donahoo WT, et al. Flipping the metabolic switch: Understanding and applying the health benefits of fasting, *Obesity (Silver Spring)* **26** (2018) 254–268.

- [35] Goldstein I & Hager GL. Transcriptional and chromatin regulation during fasting—The genomic era, *Trends Endocrinol Metab.* **26** (1015) 699–710.
- [36] Madrigal-Matute J & Cuervo AM. Regulation of liver metabolism by autophagy, *Gastroenterology* **150** (2016) 328–339.
- [37] Haller W & Bines JE. Starvation and fasting. Biochemical aspects. *En Encyclopedia of human nutrition, Elsevier*, 209–218, 2013.
- [38] Jensen TL, Kiersgaard MK, Sørensen DB & Mikkelsen LF. Fasting of mice: A review, *Lab Anim.* **47** (2013) 225–240.
- [39] Lempradl A, Pospisilik JA & Penninger JM. Exploring the emerging complexity in transcriptional regulation of energy homeostasis, *Nat Rev Genet.* **16** (2015) 665–681.
- [40] Rui L. Energy metabolism in the liver, *Compr Physiol.* **4** (2014) 177–197.
- [41] Jiang G & Zhang BB. Glucagon and regulation of glucose metabolism, *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **284** (2003) E671–8.
- [42] Jitrapakdee S. Transcription factors and coactivators controlling nutrient and hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis, *Int J Biochem Cell Biol.* **44** (2012) 33–45.
- [43] Fontana L & Partridge L. Promoting health and longevity through diet: From model organisms to humans, *Cell* **161** (2015) 106–118.
- [44] de Cabo R & Mattson MP. Effects of intermittent fasting on health, aging, and disease, *N Engl J Med.* **382** (2020) 298.
- [45] Fontana L, Partridge L & Longo VD. Extending healthy life span—From yeast to humans, *Science* **328** (2010) 321–326.
- [46] Di Francesco A, Di Germanio C, Bernier M & de Cabo R. A time to fast, *Science* **362** (2018) 770–775.
- [47] Brandhorst S, Harputlugil E, Mitchell JR & Longo VD. Protective effects of short-term dietary restriction in surgical stress and chemotherapy, *Ageing Res Rev.* **39** (2017) 68–77.
- [48] Mattson MP, Longo VD & Harvie M. Impact of intermittent fasting on health and disease processes, *Ageing Res Rev.* **39** (2017) 46–58.
- [49] Chaix A, Manoogian ENC, Melkani GC & Panda S. Time-restricted eating to prevent and manage chronic metabolic diseases, *Annu Rev Nutr.* **39** (2019) 404.
- [50] Mattson MP, Allison DB, Fontana L, et al. Meal frequency and timing in health and disease, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **111** (2014) 16647–16653.
- [51] Carrillo AE & Flouris AD. Caloric restriction and longevity: Effects of reduced body temperature, *Ageing Res Rev.* **10** (2011) 153–162.

- [52] Ruetenik A & Barrientos A. Dietary restriction, mitochondrial function and aging: From yeast to humans, *Biochim Biophys Acta* **1847** (2015) 1434–1447.
- [53] Luo H, Chiang HH, Louw M, et al. Nutrient sensing and the oxidative stress response, *Trends Endocrinol Metab.* **28** (2017) 449–460.
- [54] Ye J & Keller JN. Regulation of energy metabolism by inflammation: A feedback response in obesity and calorie restriction, *Aging (Albany NY)* **2** (2010) 361–368.
- [55] Kökten T, Hansmann F, Ndiaye NC, et al. Calorie restriction as a new treatment of inflammatory diseases, *Adv Nutr.* **12** (2021) 1558–1570.
- [56] Walsh ME, Shi Y & Van Remmen H. The effects of dietary restriction on oxidative stress in rodents, *Free Radic Biol Med.* **66** (2014) 88–99.
- [57] Hayes JD & Dinkova-Kostova AT. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism, *Trends Biochem Sci.* **39** (2014) 199–218.
- [58] Bagherniya M, Butler AE, Barreto GE & Sahebkar A. The effect of fasting or calorie restriction on autophagy induction: A review of the literature, *Ageing Res Rev.* **47** (2018) 183–197.
- [59] Lee S & Notterpek L. Dietary restriction supports peripheral nerve health by enhancing endogenous protein quality control mechanisms. *Exp Gerontol.* **48** (2013) 1085–1090.
- [60] Ruiz Herrero J, Cañedo Villarroya E, García Peñas JJ, et al. Safety and effectiveness of the prolonged treatment of children with a ketogenic diet, *Nutrients* **12** (2010) 306.
- [61] Moreno B, Crujeiras AB, Bellido D, et al. Obesity treatment by very low-calorie-ketogenic diet at two years: Reduction in visceral fat and on the burden of disease, *Endocrine* **54** (2016) 681–690.
- [62] Augustin K, Khabbush A, Williams S, et al. Mechanisms of action for the medium-chain triglyceride ketogenic diet in neurological and metabolic disorders, *Lancet Neurol.* **17** (2019) 84–93.
- [63] Ludwig DS, Willett WC, Volek JS & Neuhouser ML. Dietary fat: From foe to friend? *Science* **362** (2018) 764–770.
- [64] Lu Y, Yang YY, Zhou MW, et al. Ketogenic diet attenuates oxidative stress and inflammation after spinal cord injury by activating Nrf2 and suppressing the NF- $\kappa$ B signaling pathways, *Neurosci Lett.* **683** (2018) 13–18.
- [65] Pinto A, Bonucci A, Maggi E, et al. Anti-oxidant and anti-inflammatory activity of ketogenic diet: New perspectives for neuroprotection in alzheimer's disease, *Antioxidants (Basel)* **7** (2018) 63.
- [66] Newman JC & Verdin E. Ketone bodies as signaling metabolites, *Trends Endocrinol Metab.* **25** (2014) 42–52.

- [67] Rojas-Morales P, Pedraza-Chaverri J & Tapia E. Ketone bodies, stress response, and redox homeostasis, *Redox Biol.* **29** (2020) 101395.
- [68] Yu ZF & Mattson MP. Dietary restriction and 2-deoxyglucose administration reduce focal ischemic brain damage and improve behavioral outcome: Evidence for a preconditioning mechanism, *J Neurosci Res.* **57** (1999) 830–839.
- [69] Menezes-Filho SL, Amigo I, Prado FM, et al. Caloric restriction protects livers from ischemia/reperfusion damage by preventing Ca<sup>2+</sup>-induced mitochondrial permeability transition, *Free Radic Biol Med.* **110** (2017) 219–227.
- [70] Ahmet I, Wan R, Mattson MP, et al. Cardioprotection by intermittent fasting in rats, *Circulation* **112** (2005) 3115–3121.
- [71] Mitchell JR, Verweij M, Brand K, et al. Short-term dietary restriction and fasting precondition against ischemia reperfusion injury in mice, *Aging Cell* **9** (2010) 40–53.
- [72] Verweij M, Sluiter W, van den Engel S, et al. Altered mitochondrial functioning induced by preoperative fasting may underlie protection against renal ischemia/reperfusion injury, *J Cell Biochem.* **114** (2013) 230–237.
- [73] Acharya P, Acharya C, Thongprayoon C, et al. Incidence and characteristics of kidney stones in patients on ketogenic diet: A systematic review and meta-analysis, *Diseases* **9** (2021) 39.
- [74] Poplawski MM, Mastaitis JW, Isoda F, et al. Reversal of diabetic nephropathy by a ketogenic diet, *PLoS One* **6** (2011) e18604.
- [75] Torres JA, Kruger SL, Broderick C, et al. Ketosis ameliorates renal cyst growth in polycystic kidney disease, *Cell Metab.* **30** (2019) 1007–1023.
- [76] Yang Q, Guo M, Wang X, et al. Ischemic preconditioning with a ketogenic diet improves brain ischemic tolerance through increased extracellular adenosine levels and hypoxia-inducible factors, *Brain Res.* **1667** (2017) 11–18.
- [77] Al-Zaid NS, Dashti HM, Mathew TC & Juggi JS. Low carbohydrate ketogenic diet enhances cardiac tolerance to global ischaemia, *Acta Cardiol.* **62** (2007) 381–9.
- [78] Roberts MN, Wallace MA, Tomilov AA, et al. A Ketogenic diet extends longevity and healthspan in adult mice, *Cell Metab.* **26** (2017) 539–546.
- [80] Levine RL, Williams JA, Stadtman ER & Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins, *Methods Enzymol.* **233** (1994) 346–357.
- [81] Orozco-Ibarra M, Medina-Campos ON, Sánchez-González DJ, et al. Evaluation of oxidative stress in D-serine induced nephrotoxicity, *Toxicology* **229** (2007) 123–35.
- [82] Galvan DL, Green NH & Danesh FR. The hallmarks of mitochondrial dysfunction in chronic kidney disease, *Kidney Int.* **92** (2017) 1051–1057.
- [83] Huynh P & Chai Z. Transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) and related molecules in chronic kidney disease (CKD), *Clin Sci (Lond)*. **133** (2019) 287–313.

- [84] Jiang F, Liu GS, Dusting GJ & Chan EC. NADPH oxidase-dependent redox signaling in TGF- $\beta$ -mediated fibrotic responses, *Redox Biol.* **2** (2014) 267–272.
- [85] Liu RM & Desai LP. Reciprocal regulation of TGF- $\beta$  and reactive oxygen species: A perverse cycle for fibrosis, *Redox Biol.* **6** (2015) 565–577.
- [86] Cadenas E & Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging, *Free Radic Biol Med.* **29** (2000) 222–230.
- [87] Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, et al. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury, *Antioxid Redox Signal.* **20** (2014) 1126–1167.
- [88] Wang SY, Cai GY & Chen XM. Energy restriction in renal protection. *Br J Nutr.* **120** (2018) 1149–1158.
- [89] Rojas-Morales P, León-Contreras JC, Aparicio-Trejo OE, et al. Fasting reduces oxidative stress, mitochondrial dysfunction and fibrosis induced by renal ischemia-reperfusion injury, *Free Radic Biol Med.* **135** (2019) 60–67.
- [90] Rojas-Morales P, Tapia E, León-Contreras JC, et al. Mechanisms of fasting-mediated protection against renal injury and fibrosis development after ischemic acute kidney injury, *Biomolecules* **9** (2019) 404.
- [91] Rojas-Morales P, León-Contreras JC, Granados-Pineda J, et al. Protection against renal ischemia and reperfusion injury by short-term time-restricted feeding involves the mitochondrial unfolded protein response, *Free Radic Biol Med.* **154** (2020) 75–83.
- [92] Sutton EF, Beyl R, Early KS, et al. Early time-restricted feeding improves insulin sensitivity, blood pressure, and oxidative stress even without weight loss in men with prediabetes, *Cell Metab.* **27** (2018) 1212–1221.
- [93] Moro T, Tinsley G, Bianco A, et al. Effects of eight weeks of time-restricted feeding (16/8) on basal metabolism, maximal strength, body composition, inflammation, and cardiovascular risk factors in resistance-trained males, *J Transl Med.* **14** (2016) 290.
- [94] González A, Hall MN, Lin SC & Hardie DG. AMPK and TOR: The yin and yang of cellular nutrient sensing and growth control, *Cell Metab.* **31** (2020) 472–492.
- [95] Seo-Mayer PW, Thulin G, Zhang L, et al. Preactivation of AMPK by metformin may ameliorate the epithelial cell damage caused by renal ischemia, *Am J Physiol Renal Physiol.* **301** (2011) F1346–57.
- [96] Jiang M, Wei Q, Dong G, et al. Autophagy in proximal tubules protects against acute kidney injury, *Kidney Int.* **82** (2012) 1271–83.
- [97] Li L, Kang H, Zhang Q, et al. FoxO3 activation in hypoxic tubules prevents chronic kidney disease, *J Clin Invest.* **129** (2019) 2374–2389.
- [98] Nezu M, Souma T, Yu L, et al. Transcription factor Nrf2 hyperactivation in early-phase renal ischemia-reperfusion injury prevents tubular damage progression, *Kidney Int.* **91** (2017) 387–401.

- [99] Shokeir AA, Barakat N, Hussein AM, et al. Activation of Nrf2 by ischemic preconditioning and sulforaphane in renal ischemia/reperfusion injury: A comparative experimental study, *Physiol Res*. **64** (2015) 313–23.
- [100] Jordan S, Tung N, Casanova-Acebes M, et al. Dietary intake regulates the circulating inflammatory monocyte pool, *Cell* **178** (2019) 1102–1114.
- [101] Thurman JM. Triggers of inflammation after renal ischemia/reperfusion, *Clin Immunol*. **123** (2007) 7–13.
- [102] Kinsey GR, Li L & Okusa MD. Inflammation in acute kidney injury, *Nephron Exp Nephrol*. **109** (2008) e102–7.
- [103] Morigi M, Perico L & Benigni A. Sirtuins in renal health and disease, *J Am Soc Nephrol*. **29** (2018) 1799–1809.
- [104] Kitada M, Kume S & Koya D. Role of sirtuins in kidney disease, *Curr Opin Nephrol Hypertens*. **23** (2014) 75–9.
- [105] Puchalska P & Crawford PA. Multi-dimensional roles of ketone bodies in fuel metabolism, signaling, and therapeutics, *Cell Metab*. **25** (2017) 262–284.
- [106] Tajima T, Yoshifuji A, Matsui A, et al.  $\beta$ -Hydroxybutyrate attenuates renal ischemia-reperfusion injury through its anti-pyrototic effects, *Kidney Int*. **95** (2017) 1120–1137.
- [107] Miyamoto J, Ohue-Kitano R, Mukoyama H, et al. Ketone body receptor GPR43 regulates lipid metabolism under ketogenic conditions, *Proc Natl Acad Sci U S A*. **116** (2019) 23813–23821.
- [108] García-Gaytán AC, Miranda-Anaya M, Turrubiate I, et al. Synchronization of the circadian clock by time-restricted feeding with progressive increasing calorie intake. Resemblances and differences regarding a sustained hypocaloric restriction, *Sci Rep*. **10** (2020) 10036.
- [109] Sunderram J, Sofou S, Kamisoglu K, et al. Time-restricted feeding and the realignment of biological rhythms: Translational opportunities and challenges, *J Transl Med*. **12** (2014) 79
- [110] Longo VD & Panda S. Fasting, circadian rhythms, and time-restricted feeding in healthy lifespan, *Cell Metab*. **23** (2016) 1048–1059.
- [111] Katewa SD, Akagi K, Bose N, et al. Peripheral circadian clocks mediate dietary restriction-dependent changes in lifespan and fat metabolism in *Drosophila*, *Cell Metab*. **23** (2016) 143–54.
- [112] Lennerz BS, Koutnik AP, Azova S, et al. Carbohydrate restriction for diabetes: rediscovering centuries-old wisdom, *J Clin Invest*. **131** (2021) e142246.
- [113] Neugarten J & Golestaneh L. Female sex reduces the risk of hospital-associated acute kidney injury: A meta-analysis, *BMC Nephrol*. **19** (2018) 314.
- [114] Müller V, Losonczy G, Heemann U, et al. Sexual dimorphism in renal ischemia-reperfusion injury in rats: possible role of endothelin. *Kidney Int*. **62** (2002) 1364–71.