

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Consumo de agua azucarada en etapa prenatal y posnatal en ratas macho: distribución celular de acuaporina 2 y GLUT4 en los túbulos renales

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

Verónica Velázquez Orozco

Director

Dr. Jorge Rodríguez Antolín

Tlaxcala, Tlax.

Julio, 2021.



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Consumo de agua azucarada en etapa prenatal y posnatal en ratas macho: distribución celular de acuaporina 2 y GLUT4 en los túbulos renales

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

Verónica Velázquez Orozco

Comité Tutorial

Dr. Jorge Rodríguez Antolín
Dr. Francisco Castelán
Dra. Margarita Cervantes Rodríguez
Dr. Arturo Ortega Soto

Tlaxcala, Tlax.

Julio, 2021.

Financiamiento

Esta investigación fue realizada en el Centro Tlaxcala Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, Unidad Periférica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. El proyecto fue financiado por el CONACyT a través de la beca 295860-VVO.

El programa de Doctorado en Ciencias Biológicas está registrado en el Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC).



**Universidad
Autónoma de
Tlaxcala**

Secretaría de Investigación Científica y Posgrado
Coordinación de la División de Ciencias Biológicas
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA

**COMITÉ ACADÉMICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA**

Sirva este medio para describir el proceso de revisión de la tesis realizada por el estudiante **Verónica Velázquez Orozco** titulada **“Consumo de agua azucarada en etapa prenatal y posnatal en ratas macho: distribución celular de acuaporina 2 y GLUT4 en los túbulos renales”** para optar por su grado de **Doctor en Ciencias Biológicas**.

El documento de tesis de **Verónica Velázquez Orozco** fue revisado por su servidor como director de tesis antes de presentarse en el examen de grado, los miembros de su comité tutorial realizaron también sus respectivas observaciones. De manera que el documento, llevó un proceso de revisión por varios profesores expertos en el tema. En el mes de julio, el documento final de la tesis fue procesado con el programa Turnitin marcando un texto con 25% de similitud. Examinando los detalles de la búsqueda se observó que las similitudes están marcadas en los textos donde se citan marcas, instituciones, tiempos, siglas, abreviaturas, particularmente en la metodología y en el análisis estadístico. Adicionalmente, se encontró coincidencia en algunas tablas y pies de figuras, pero dicho texto corresponde a términos clínicos de uso común y cuando corresponde, contiene las respectivas citas que indican de donde fue tomada la información. Otras similitudes se observaron en la sección del índice, correspondiendo a lenguaje común por lo que esta similitud no podría ser considerada como plagio.

Por lo anterior, confirmo que **la mencionada estudiante no incurrió en ninguna práctica de plagio** en la presente tesis.

CORDIALMENTE

Tlaxcala, Tlax., julio 2021

Dr. Jorge Rodríguez Antolín
Director de tesis



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado bajo la Norma:
ISO 9001:2015-NMX-CC-9001-IMNC-2015

**COORDINACIÓN DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E**

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que **Verónica Velázquez Orozco** realiza para la obtención del grado de **Doctora en Ciencias Biológicas**, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es **“Consumo de agua azucarada en etapas prenatal y posnatal en ratas macho: distribución celular de acuaporina 2 y GLUT4 en los túbulos renales”**.

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
TLAXCALA, TLAX., JULIO 05 DE 2021



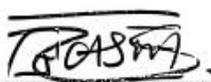
DRA. MARGARITA MARTÍNEZ GÓMEZ



DRA. MARGARITA CERVANTES RODRÍGUEZ



DR. ARTURO ORTEGA SOTO



DR. FRANCISCO CASTELÁN



DRA. LETICIA NICOLÁS TOLEDO

Agradecimientos

Al posgrado del Centro Tlaxcala Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, por su apoyo académico durante mi estancia.

Agradezco al CONACyT por el apoyo recibido de la beca 295860-VVO para la realización de este proyecto de tesis. Al apoyo económico del posgrado del CTBC, UATx.

A mi director de tesis Dr. Jorge Rodríguez Antolín, por su valiosa guía y aporte de conocimientos en este proyecto y especialmente por su confianza y por creer en mi incluso cuando yo no lo hacía o decaía en el arduo camino de la investigación, gracias por confiar en mí.

Agradezco infinitamente la valiosa asesoría de mi comité tutorial formado por la Dra. Margarita Cervantes Rodríguez, de los Doctores Francisco Castelán, Arturo Ortega Soto, que me enseñaron no solamente conocimientos en nuestro ámbito si no cuestiones de la vida misma y sin duda me hicieron crecer bastante como persona. Agradezco al biólogo Jesús Ramsés Chavéz Ríos y a la QFB. Laura García Rivera por su valioso apoyo técnico para la realización de esta tesis.

Al programa de posgrado en ciencias biológicas registrado en el Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) por el apoyo para la realización de este proyecto de tesis.

Agradecimientos y dedicatorias a título personal

¿Agradecer? Las palabras se quedan cortas para agradecer a Dios y a la vida por permitirme vivir y hacer lo que disfruto. ¡Gracias!

Agradezco infinitamente a mis padres por haberme dado la vida y llenarme de tanto amor desde mi nacimiento, pues no recuerdo nada más que abrazos y besos; el calor de hogar y el saber con ejemplos que siempre contaré con ustedes es incomparable. Su apoyo, sus consejos, su calor y todo su ser, ¡Gracias papis por estar conmigo en cada paso! Les dedico este trabajo que tanto disfruté, porque si algo he aprendido de ustedes es a saborear la vida. Dios no me pudo premiar con tan bonita familia, gracias porque mis triunfos se los debo a ustedes, quienes me dejaron un día fuera del preescolar, tal vez con la zozobra de qué sería de mi vida y vean con orgullo que han hecho un excelente trabajo formando una familia increíble. ¡¡¡Los amo!!! Son los mejores padres del mundo!!!

A mis hijos que sin duda aprendieron también de esta etapa, desde ausencias hasta días que también les toco cuidar a las ratitas blancas conmigo, gracias por ser ustedes y darme amor con esos abrazos que reinician el alma. Ustedes son ejemplo de lucha ante la vida y adaptación ante las tempestades, gracias por tanto aprendizaje, ¡mis compañeros de aventuras!

A mis hermanos (Marco, Arthur y Jana), mis cuñados (Heydi y Edgar), sobrino y sobrinas (Marquiño, Vale y Andy) les dedico este trabajo también porque sentir su apoyo es algo que no se puede describir, el saber que estarán y que todos con una sonrisa me cambian mis días y que con sus abrazos me hacen saber que la vida a veces no es tan fácil pero que sin duda vale la pena vivir.

A mis amigos, Vero, Sharet, Lupita porque sin duda hicieron mi paso por el posgrado aún más placentero, las esperas de cada experimento eran mejor a su lado, espacios entre transferencias y corrimientos electroforéticos o una lectura de un artículo y poder voltear detrás o al lado de mi silla y saber que estaban ahí fue muy bonito. Gracias porque no sólo

compartimos unos años de preparación profesional si no que hemos compartido nuestras vidas. ¡Gracias por su amistad!

Vero, Irving, Saret gracias por todas sus enseñanzas tanto profesionales como de vida, desde cómo preparar una solución, diseñar un experimento y sus enseñanzas en las técnicas que no conocía, gracias por ser grandes maestros y compartir su conocimiento conmigo.

Abstract

The high consumption of sugary drinks in different stages of life has been linked to metabolic diseases and organs injury. The effect of its consumption during pregnancy-lactation and its implication that it could have on the offspring health has been little studied. An imbalance on diet during this period could modify the genetic information of the fetus and it could trigger metabolic diseases in its adult life. It has been shown that one of the organs that could be affected in these individuals is the kidney, which is responsible for very important functions including the formation of urine. This is achieved with the participation of various proteins, such as aquaporins (AQPs), intramembrane channel-forming proteins that allow the passage mainly of water through the cell. Some are expressed differentially along the renal ducts. AQP2 is located in the principal cells of the collecting tubule where antidiuretic hormone (ADH) triggers its translocation to the apical membrane to allow the passage of water. Glucose transporters (GLUTs) are also involved, which are responsible for transporting glucose within the cell. The expression of these proteins is altered in metabolic pathologies such as diabetes mellitus. The objective of this project is to determine the effect of sucrose water consumption during gestation-lactation period on the expression of AQP2 and GLUT4 in the kidney of the offspring in their adulthood. Twelve female rats were mated and grouped in control-dams consumed tap-water and sucrose-dams consumed sucrose-water during gestation-lactation. Male pups were weaned and assigned into four groups (n=6 each): those from control-mothers that continued drinking tap-water (CM-CO group) or sucrose-water (CM-SO group) until adult life; and those from sucrose-mothers that drank tap-water (SM-CO group) or continued drinking sucrose-water (SM-SO group) until adult life. Male rats were sacrificed at 17 weeks of age and the expression of AQP2 and GLUT4 in kidney was determined by solid phase immunodetection. The results show an increase in the levels of AQP2 and GLUT4 in renal cortex in those animals that consumed sucrose water throughout the experiment (gestation-lactation and postnatal life). These results suggest that the kidney is susceptible to the consumption of sucrose at certain stages of development increasing the vulnerability of renal pathologies in adult life.

ÍNDICE

	Pág.
1. Introducción	1
1.1 Nutrición durante la gestación y epigenética	1
1.1.1. Mecanismos epigenéticos	3
1.1.2. Metilación del DNA	5
1.2 Obesidad y consumo de bebidas azucaradas	8
1.3 Riñón y nefronas	11
1.3.1.1 El Aparato Yuxtaglomerular	12
1.3.1.2 Corpúsculo renal	13
1.3.1.3 El Túbulo Proximal	14
1.3.1.4 El Asa de Henle	15
1.3.1.5 El Túbulo Distal	15
1.3.1.6 Túbulo colector	16
1.4 Acuaporinas	17
1.4.1 Acuaporinas y riñón	18
1.4.2 Acuaporina 2	19
1.4.2.1 Almacenamiento y transporte de AQP2	20
1.4.2.2 AQP2 en patologías	22
1.5 Transportadores renales de glucosa	24
1.5.1 Transportador GLUT4	25
2. Antecedentes	29
2.1 Trastornos metabólicos y su efecto en el riñón	29
2.2 Efectos de malnutrición durante la gestación en el riñón de crías adultas	30
2.3 Acuaporina 2 y GLUT 4 en riñón	31
3. Justificación	33
4. Hipótesis	34
Predicciones	34

5. Objetivo general	35
6. Objetivos específicos	35
7. Metodología	36
7.1 Grupos experimentales	36
7.1.1 Grupos experimentales de las madres	36
7.1.2 Grupos experimentales de las crías	36
7.2 Diseño experimental	37
7.3 Obtención del riñón	38
7.4 Inclusión y corte de riñón	38
7.5 Inmunohistoquímica	38
7.6 Inmunotransferencia de AQP2 y GLUT4	39
8. Resultados	41
8.1 Peso corporal y consumo de agua y alimento	41
8.2 Expresión de AQP2 en corteza renal	42
8.3 AQP2 en médula renal	44
8.4 GLUT4 en corteza renal	46
8.5 GLUT4 en médula renal	46
9. Discusión	48
10. Referencias	52
11. Anexos	61
12. Publicaciones (Artículos y resúmenes de congresos)	63

1. Introducción

1.1 Nutrición durante la gestación y epigenética

La nutrición equilibrada durante todas las etapas de la vida confiere una buena salud a los individuos. Por ello es importante investigar los fundamentos fisiológicos y metabólicos que confieren las respuestas a la dieta y a las enfermedades crónicas. Se debe considerar la variabilidad individual en la dieta, estilo de vida, medio ambiente y la genética para precisar una nutrición adecuada (Srinivasan y cols. 2017). Esto es de vital importancia ya que la malnutrición afecta a un tercio de la población mundial y la mayoría de los afectados tienen bajas posibilidades de incluso determinar si están en un estado de malnutrición (Martínez 2005). Cabe mencionar que desafortunadamente el ingreso económico en cada país influye en la manera de alimentarse de los individuos. La ingestión promedio diaria de nutrientes tiene una relación directa con el ingreso. En México los hogares pobres que constituyen el 10% de la población cubren sólo el 66% de las calorías y el 60% de las proteínas que se requiere, mientras que, en el grupo de hogares con más ingresos se cubre el 95% de las calorías y el 117% de las proteínas que se necesitan (Martínez 2005).

Un individuo puede malnutrirse en las distintas etapas de la vida, desde la niñez hasta la etapa senil. Sin embargo, en la mujer la etapa más drástica es durante la gestación, debido a que en este periodo no sólo se ve afectada ella, sino también la descendencia (Ramírez-Veléz 2012). La malnutrición de la madre se ha asociado con implicaciones para la salud a corto y largo plazo tanto para la madre como para el producto, lo que incluye complicaciones durante el embarazo y el parto, rendimiento deficiente de la lactancia, aumento en la mortalidad de las madres e incluso se puede comprometer el crecimiento fetal (Hall 2007). Estudios epidemiológicos en humanos han mostrado que factores adversos durante la gestación, como exposición a drogas, hipoxia, estrés oxidante, alimentación inadecuada entre otros, predisponen a desequilibrios metabólicos en la vida adulta. Lo anterior se sustenta en la hipótesis de Barker, actualmente

conocida como hipótesis de los orígenes del desarrollo de la salud y la enfermedad, la cual menciona que el impacto de las condiciones de vida intrauterina tiene influencia sobre la aparición de algunas enfermedades en la vida adulta ligadas a alteraciones metabólicas como obesidad, sobrepeso, diabetes mellitus, hipertensión arterial, entre otras (Langley-Evans 2006).

Se han estudiado diversos sucesos a lo largo de la historia que muestran resultados muy interesantes con respecto al desarrollo de enfermedades en la vida adulta de los individuos, por ejemplo, en la época de la segunda guerra mundial a finales de 1944 y principios de 1945 en Holanda se vivió un período complicado debido a que los ferroviarios levantaron una huelga con la que esperaban paralizar el transporte de las tropas alemanas, ayudando indirectamente a las fuerzas aliadas, sin embargo, lejos de ayudar perjudicaron a su pueblo debido a que murieron miles de personas por inanición, ya que los nazis bloquearon el suministro de alimentos a gran parte del país. Este terrible episodio ha pasado a la historia como “el invierno holandés del hambre” (Dutch Hunger Winter)(Heijmans y cols. 2008). Los hechos han sido de gran interés de estudio, debido a que hombres y mujeres, niños y niñas y en general toda la población sufrió de una malnutrición severa por restricción de nutrientes. En específico las mujeres embarazadas fueron el grupo poblacional más vulnerable lo que llevó a realizar grandes estudios retrospectivos, los cuales han arrojado datos muy interesantes, por ejemplo, que los niños nacidos de aquellas madres malnutridas padecieron en la vida adulta obesidad, diabetes, esquizofrenia entre otras en una proporción superior al resto de la población (Manley 2013). Los efectos de la hambruna parecían depender del momento de la gestación y de los órganos y tejidos sometidos a periodos críticos del desarrollo en ese momento (Roseboom y cols. 2011). Por ejemplo, las personas concebidas durante la hambruna tuvieron un mayor riesgo de esquizofrenia y depresión, perfil lipídico aterogénico así como enfermedades coronarias; y por otro lado las personas expuestas al reto durante cualquier periodo de la gestación presentaron en mayor proporción diabetes mellitus tipo 2 (Roseboom y cols. 2011).

Asimismo, con el objetivo de intentar dilucidar el origen del desarrollo de la salud y la enfermedad, se han propuesto varias hipótesis, entre ellas se ha mencionado que ello podría suceder porque las células endoteliales de las células madre tienen menor potencial angiogénico, así se explica la vasodilatación disminuida, la menor densidad capilar y el diámetro vascular

disminuido, no suministrándole al producto el suficiente riego sanguíneo (Ramírez-Vélez 2012). Por otro lado, se ha planteado que los fetos de madres que estuvieron expuestas a la drástica restricción alimenticia en la época de la hambruna holandesa, modificaron sus genes y con ello la expresión de proteínas lo cual perduró por el resto de su vida. Lumey y colaboradores estudiaron en las muestras de DNA de individuos nacidos durante este periodo de tiempo, comparadas con las de los hermanos nacidos antes o después de este acontecimiento y que no pasaron por el reto de restricción alimenticia en el útero, los patrones de metilación y encontraron disminución en la metilación del DNA del gen *IGF2* (factor de crecimiento similar a la insulina) en las muestras de individuos expuestos a la restricción alimenticia comparadas con aquellos que no estuvieron expuestos a tal reto (Heijmans y cols. 2008). Los datos han aportado información valiosa apoyando la hipótesis de que las condiciones ambientales en la vida temprana pueden causar cambios epigenéticos que logran persistir a lo largo de la vida (Heijmans y cols. 2008; Roseboom y cols. 2011).

1.1.1. Mecanismos epigenéticos

Ha sido tanto controversial como complicado, particularmente cuando se habla de nutrición, dilucidar como contribuye la genética a los fenotipos que evolucionan constantemente, sin embargo, las variaciones genéticas, per se, no explican las diferencias entre los individuos con base en su exposición dietética (Stover y cols. 2018). Se ha tratado de explicar con la epigenética, las diferencias individuales de las respuestas metabólicas a las exposiciones ambientales, así como a la susceptibilidad a desarrollar enfermedades metabólicas (Stover y cols. 2018), la cual describe los cambios en el genoma, que no son mutaciones, es decir no hay cambios en las secuencias del ADN, sino que son modificaciones en el material genético o en proteínas implicadas en el nucleosoma llamadas histonas (Franks y Ling 2010), como puede ser adición de grupos funcionales que no cambian la secuencia del ADN pero sí alteran la manera en que se lee; sin embargo son mecanismos heredables que alteran la expresión génica. Se sabe que algunos nutrientes como mencionaré mas adelante, regulan la expresión génica a través de varios mecanismos, incluso como ligandos para los factores de transcripción regulando su

expresión (Stover y cols. 2018)(Fig 1). El ADN está perfectamente empaquetado en nucleosomas que involucran una relación estrecha entre él y las histonas, esta relación es mantenida por medio de uniones electrostáticas entre las proteínas cargadas positivamente y el ADN cargado negativamente. Las histonas son proteínas que facilitan el empaquetamiento del ADN en el núcleo y la regulación de la expresión de genes. Los nucleosomas están compuestos por 147 pares de bases de DNA perfectamente enredado en las histonas llamadas, H2A, H2B, H3 Y H4 (Lee 2015).

La expresión genética está mediada por modificaciones postraduccionales como acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación entre otras. La naturaleza de la estructura impide la unión de factores de transcripción, sin embargo, una clase de proteínas que son capaces de interactuar con las histonas son las histonas acetiltransferasas (HAT), las cuales funcionan acetilando aminoácidos en el extremo C terminal de las histonas (Fish y cols. 2004). Por ejemplo, la acetilación de residuos de lisina en la histona 3 (H3) neutraliza las cargas y relaja la interacción histona-DNA permitiendo la unión de factores de transcripción activando la transcripción de genes. Por otro lado, existe el proceso contrario que es la desacetilación de histonas (HDAC) lo que suprime la expresión génica (Fish y cols. 2004). Los principales mecanismos epigenéticos involucrados en la propagación del estado de actividad del genoma u la estructura de la cromatina, son la metilación del DNA, modificación en las histonas y en el micro RNA (Lee 2015).

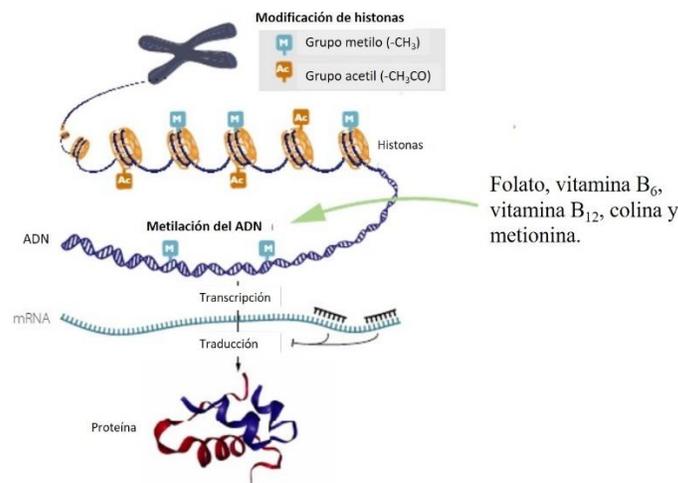


Figura 1. Grupos metilo y acetilo derivados de la dieta modifican la cromatina y regulan la expresión génica (Modificado de Stover y cols. 2018; Cooney y cols. 2002).

1.1.2 Metilación del DNA

La metilación es la adición de un grupo metilo ($-\text{CH}_3$) al DNA, la cual ocurre principalmente en el carbono 5 de la citosina en las llamadas islas CpG, las cuales son regiones del material genético abundantes en citosinas y guaninas enlazados por fosfatos y conforman aproximadamente un 40% de promotores de los genes. La presencia de este grupo funcional en la porción promotora está asociada con el silenciamiento de genes (Stratton y cols. 2019) debido a que interfiere en la unión de factores de transcripción inhibiendo este proceso. Además, la metilación del ADN actúa como un sitio de acoplamiento para otras proteínas de remodelación de la cromatina. Tanto la hipo e hipermetilación del material genético resulta de la exposición a agentes químicos exógenos que están presentes en la dieta como zinc, vitamina B12, metionina, folatos y ácido fólico (Cooney y cols. 2002). Para algunos genes cualquier cambio en las islas CpG es capaz de alterar la expresión de los genes incrementando el riesgo de presentar alguna enfermedad (Perera y Herbstman 2011). Este proceso está regulado por metiltransferasas del DNA (DNMTs)(Lee 2015), DNMT1, es una metiltransferasa involucrada en el mantenimiento la cual copia el patrón de metilación de las hebras de DNA; la función de DNMT2 aún no es clara todavía sin embargo se sabe que participa mayoritariamente como metiltransferasa de

tRNA; y por último la familia de DNMT3 que la comprenden, DNMT3a, DNMT3b y DNMT3-L, la cuales median la metilación de novo (Kato y Natarajan 2019).

Además, la adición de los grupos metilo al material genético depende de la vía del metabolismo de un carbono y de enzimas que son suministradas en micronutrientes en la dieta. A través de una reacción impulsada por ATP, metionina se convierte en S-adenosilmetionina (SAM) y por otro lado Metil-tetrahidrofolato (THF) actúa como un donante de grupo metilo para la producción de THF y es un precursor para la conversión de homocisteína a metionina. Las DNMTs unen covalentemente grupos metilo de SAM a la posición de carbono-5 de las bases de citosina, generando 5mC (Cooney 2002). Nutrientes involucrados en el metabolismo de un carbono, como folato, vitamina B6, vitamina B12, colina y metionina, juegan un papel importante en la metilación del ADN a través de su influencia en los niveles de SAM y los niveles de inhibidor de la metiltransferasa S-adenosylhomocysteine (SAH)(Lee 2015)(Cooney y cols. 2002). Algunos de estos nutrientes se evalúan actualmente en la nutrición materna para modular los mecanismos epigenéticos.

El estudio de los mecanismos que involucran estos procesos epigenéticos es crítico durante el desarrollo y la diferenciación celular. El estado epigenético que se asienta durante el desarrollo persiste en algún locus en la vida del individuo. Existen evidencias que demuestran la participación epigenética en el desarrollo de enfermedades ya que son marcas críticas que persisten en la descendencia, así como la importancia del ambiente nutricional intrauterino en el epigenoma y el fenotipo de la descendencia (Lee 2015). Alteraciones en la metilación de DNA y modificaciones en las histonas, contribuye a la aparición de enfermedades relacionadas con la edad y con un estilo de vida, como enfermedades metabólicas y cardiovasculares principalmente (Wang y cols. 2012). Asimismo, se han utilizado diversos modelos animales, en los cuales se manipula la dieta en diferentes ventanas del desarrollo (gestación, lactancia, vida posnatal), por ejemplo: restricción de proteínas (Nicolás y cols. 2018), dietas con agua azucarada (Ozkan y cols. 2019), ricas en grasas y carbohidratos (Jackson y cols. 2011) (Tzanetakou 2011) o cambios específicos en la alimentación durante la gestación y/o lactancia; y se ha observado que estos retos modifican el fenotipo de la descendencia desarrollando ciertas patologías principalmente de tipo metabólicas y cambios en el funcionamiento de algunos órganos.

Considerando lo anteriormente descrito, se ha demostrado que los cambios metabólicos y moleculares dentro del útero muestran una asociación con patologías desarrolladas en la vida adulta; sin embargo, también tiene relación con el estilo de vida y otros factores de riesgo adquiridos en el medio ambiente (Ramírez-Vélez 2012). La forma en que los individuos se han alimentado a lo largo del tiempo se ha ido modificando de una manera negativa alterando el ambiente interno del organismo y ha obligado al sistema a adaptarse al consumo excesivo de nutrientes llevando al individuo a presentar enfermedades que antes no se desarrollaban o tardaban más tiempo en aparecer, por ejemplo, por exponer algunas cifras, la prevalencia combinada de obesidad y sobrepeso en hombres adultos pasó de 71.2% en el año 2012 a 72.5% en 2016; siendo las prevalencias tanto de sobrepeso como de obesidad y de obesidad mórbida más altas en el sexo femenino (ENSANUNT 2016), lo que resulta un tema muy importante de salud pública el cual merece la pena investigar debido a que son una población en edad reproductiva y como ya ha sido tratado anteriormente el producto también se ve modificado ya que el ambiente en el cual se desarrolla no es el óptimo.

Actualmente se ha estudiado el consumo de productos con alta concentración de carbohidratos asociando su alto consumo con aparición de sobrepeso, obesidad y enfermedades cardiovasculares, así como diabetes mellitus y daño a órganos específicos como el riñón. La ENSANUT reporta que el grupo de alimentos de mayor consumo son las bebidas no lácteas endulzadas en un 85%, interesantemente, la mayoría de la población (92.2%) considera que el consumir esta clase de productos favorece el desarrollo de obesidad, presión alta (86.2%) y diabetes (93%); sin embargo aunque saben que estos productos son dañinos los siguen consumiendo y la preferencia por el consumo de bebidas azucaradas y comida chatarra (31.6%) lo reportan como un obstáculo para alimentarse saludablemente (ENSANUNT 2016). La OMS ha reportado que México ocupa el segundo lugar en el consumo de bebidas azucaradas seguido de Estados Unidos y en tercer lugar Chile mostrando que un mexicano en promedio ingiere 163 litros de refrescos por año.

1.2 Obesidad y consumo de bebidas azucaradas

La obesidad es definida como la acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud (OMS 2017). Es una de las mayores preocupaciones en salud pública, debido a que es un factor de riesgo clave para el desarrollo de enfermedades crónicas, siendo una de las principales la diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Las personas con obesidad son 60 veces más propensas a desarrollar DM2 que aquellas que no lo son (OMS 2017).

El índice de masa corporal (IMC) es un indicador de sobrepeso y obesidad en adultos que funciona para determinar si una persona se encuentra en riesgo cardiovascular (Tabla 1), se calcula dividiendo el peso de una persona en kilos, entre el cuadrado de su talla en metros (kg/m^2) (OMS 2017).

Clasificación	IMC (Kg/m^2)	Riesgo
Normal	18.5 – 24.9	Promedio
Sobrepeso	25 – 29.9	Aumentado
Obesidad grado I	30 – 34.9	Moderado
Obesidad grado II	35 – 39.9	Severo
Obesidad grado III	Más de 40	Muy severo

Tabla 1. *Clasificación de riesgo cardiovascular por IMC.*

México ocupa el segundo lugar después de Estados Unidos con obesidad dentro de los países incluidos en la OCDE (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos) (Figura 2).

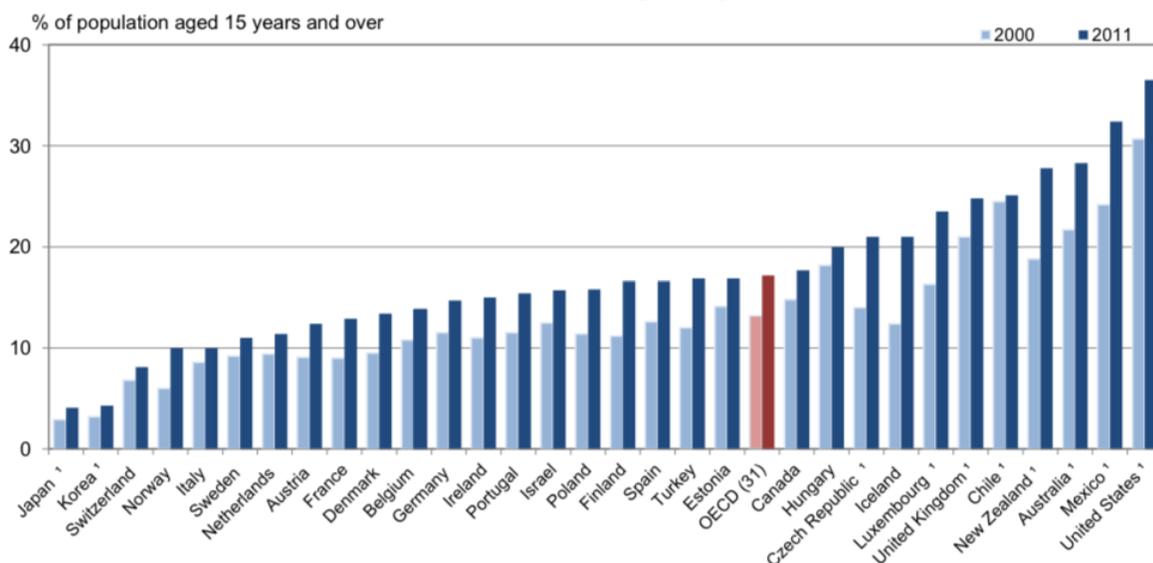


Figura 2. Población con obesidad en los países de la OECD.

El aumento en la prevalencia de obesidad en México ha sido el más rápido a nivel mundial. En el periodo de 1988 a 2012, el sobrepeso en mujeres de 20 a 49 años de edad se incrementó de 25 a 35.3% y la obesidad de 9.5 a 35.2%. Lo que refleja que la prevalencia de sobrepeso incrementó 47.6% y la de obesidad 42.1%. En los hombres, la prevalencia de sobrepeso aumentó 3.1% y la de obesidad 38.1%, en el periodo de 2000 a 2012 (ENSANUT 2012).

En niños de 5 a 11 años, la ENSANUT reportó una prevalencia nacional combinada de sobrepeso y obesidad en 2012, de 34.4% (19.8% y 14.6%, respectivamente), para las niñas de 32% y para los niños 36.9%, lo que representan alrededor de 5,664,870 niños con sobrepeso y obesidad a nivel nacional (ENSANUT 2012).

El sobrepeso y la obesidad son desarrollados debido a un consumo excesivo de calorías, una disminución en la actividad física y un aumento en la vida sedentaria (OMS 2018). Estudios observacionales y ensayos clínicos respaldan un vínculo entre el consumo de bebidas azucaradas y el aumento de peso corporal, así como la presencia de una variedad de problemas cardiometabólicos. Existen estudios en animales que sustentan estos resultados, por ejemplo un estudio en roedores en el que consumieron bebidas azucaradas reduce la ingesta de alimentos

sólidos, pero no lo suficiente para evitar un equilibrio calórico positivo y el lento desarrollo de obesidad (Bray y cols. 2004).

La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición determinó que el consumo de bebidas azucaradas, como aguas frescas, jugos de frutas y vegetales, leches de sabor, soda, café y té calórico, ha aumentado en comparación con la ingesta de leche con alto contenido de grasa y disminuyó en niños de 1 a 11 años y en mujeres en edad reproductiva. Además, la proporción de consumo de agua simple disminuyó en los mismos grupos de edad (Havel y cols. 2018). El agua no aporta energía ya que los macronutrientes contenidos en los alimentos sólidos aportan las kilocalorías necesarias para el mantenimiento celular.

En los últimos 20 años el consumo de bebidas azucaradas en nuestro país ha ido en aumento, lo que es preocupante ya que éstas bebidas representan el 21% del consumo total de energía de adolescentes y adultos mexicanos. El promedio de ingesta energética proveniente de bebidas calóricas en mayores de dos años ha aumentado de 100 a 300 kcal por día, para los diferentes grupos de edad en ambos sexos (ENSANUT 2016).

Por otro lado, estudios clínicos y experimentales han demostrado que la obesidad y el consumo de bebidas azucaradas además de causar diversas patologías daña a órganos vitales como el riñón siendo una pieza fundamental para la eliminación de sustancias tóxicas del cuerpo. Por ejemplo, en pacientes obesos se encontró que el sistema renina-angiotensina-aldosterona presente en el riñón está marcadamente activado, siendo los adipocitos una fuente fundamental para estas hormonas, además de que el aumento en el tejido adiposo aumenta la presión glomerular vascular localizada (Hall 2002)(Praga y Morales 2006). Por otro lado, se demostró que la prevalencia de enfermedad renal crónica (ERC) aumenta al consumir más de cuatro porciones de bebidas azucaradas o carbonatadas al día (Yuzbashian y cols. 2016). Aunque existen estudios acerca de la asociación del consumo de bebidas azucaradas con daño renal, aún es poca información para dilucidar cómo es que se modifica la función del mismo, es por eso que es importante conocer la anatomía, función e histología normal de este órgano.

1.3 Riñón y nefronas

Los riñones forman parte del aparato urinario, en su superficie externa están rodeados por una capa fibrosa (cápsula renal). Si se realiza un corte sagital en el riñón, se distinguen macroscópicamente dos zonas: a) corteza, es una zona superficial rojiza ya que acumula gran parte de la sangre del riñón y b) médula, es una zona pálida, está formada por unas estructuras cónicas conocidas como pirámides de Malpighi, con sus bases dirigidas hacia la corteza y sus vértices o papilas hacia el hilio (Guyton 2009). La médula renal está compuesta de 8 a 12 pirámides de Malpighi, cuyos vértices presentan unos orificios que conectan con los llamados conductos excretores de Bellini. Dichos vértices papilares conectan a su vez con el sistema excretor externo, formado por los cálices menores que convergen a su vez con los cálices mayores y por último en la pelvis renal (Guyton 2009).

Su función es limpiar el plasma sanguíneo y aclararlo de aquellas sustancias que no se precisa mantener, como la urea, la creatinina, iones (sodio, potasio, cloruro) que son desechos del metabolismo. Esta importante función la realizan a través de las nefronas las cuales se encuentran distribuidas en todo el riñón y son llamadas la unidad funcional de este órgano. Existen de 1 a 2 millones de nefronas en humanos por cada riñón y en ratas alrededor de 30 000 nefronas (Hill y cols. 2006)(Figura 3).

Desde un punto de vista morfológico, la nefrona se divide en un extremo proximal, compuesto por el corpúsculo renal, formado por redes de capilares o glomérulo y la cápsula de Bowman. Dicha cápsula constituye la parte inicial del sistema tubular de la nefrona y recibe el filtrado glomerular. A continuación del corpúsculo renal se extiende la porción tubular, que se divide en: túbulo contorneado proximal, asa de Henle, túbulo contorneado distal y túbulos colectores (Figura 3).

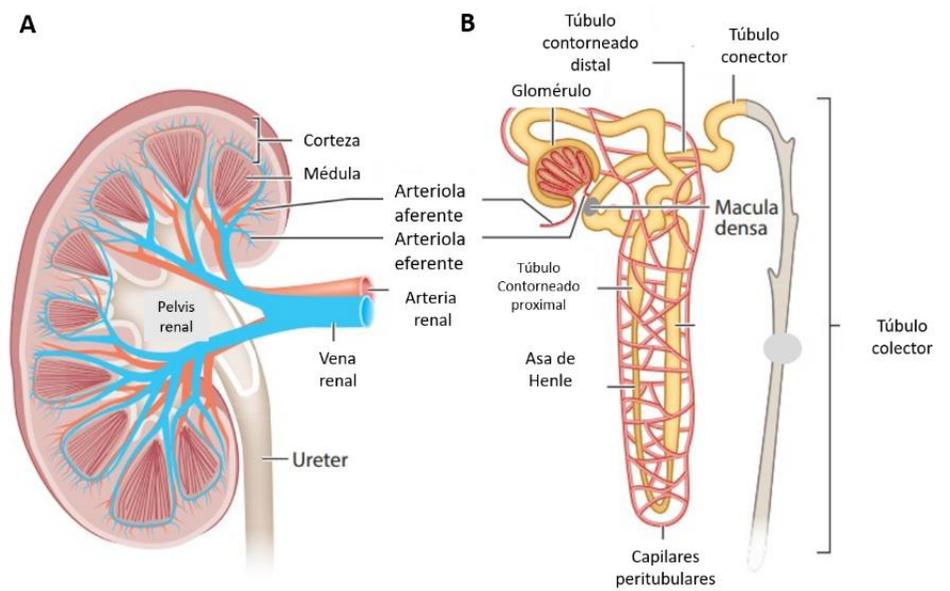


Figura 3. Estructura de riñón humano. **A.** Corte sagital de riñón, se observa la vasculatura y partes macroscópicas. **B.** Representación esquemática de una nefrona (Modificado de Oxburgh 2018).

1.3.1.1 El Aparato Yuxtaglomerular

El aparato yuxtaglomerular es una estructura microscópica en el riñón que se compone básicamente de: las células yuxtaglomerulares y la denominada mácula densa. El aparato yuxtaglomerular se encarga principalmente de la regulación de la presión arterial a través del control del sistema renina-angiotensina (RAS) mediante la secreción de renina (Oxburgh 2018) (Figura 4).

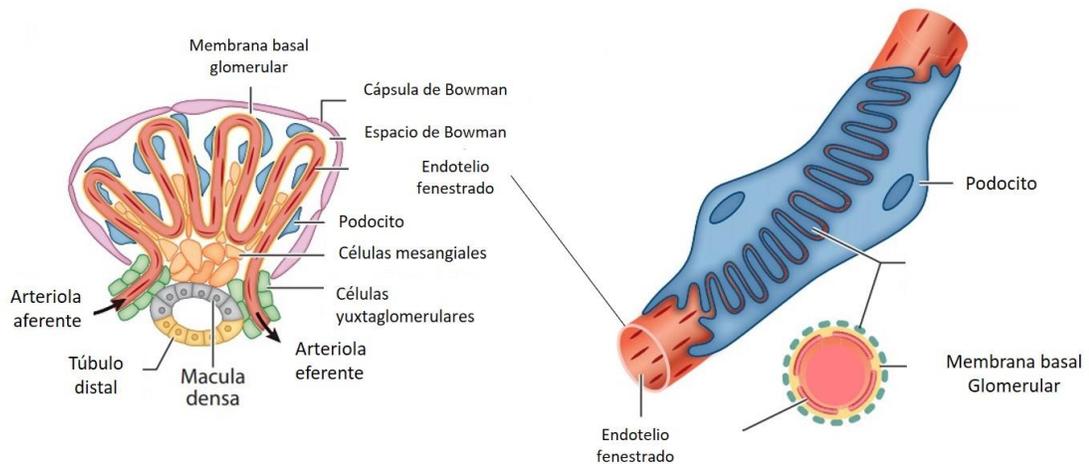


Figura 4. Aparato yuxtaglomerular y membrana basal glomerular (Modificada de Oxburgh 2018).

1.3.1.2 Corpúsculo renal

El corpúsculo renal (corpúsculo de Malpighi) se encuentra al comienzo de la nefrona, es esférico y tiene un diámetro promedio de 200 μm , está formado por un ovillo de capilares (glomérulo), rodeado por una cápsula de Bowman, que consta de dos hojas, una interna o visceral, apoyada sobre el ovejillo capilar, está compuesta por podocitos y otra hoja parietal o externa, que rodea el espacio de Bowman, conformada por células epiteliales escamosas simples (orientada hacia los capilares sanguíneos del glomérulo) (Junqueira 2015). Entre las dos hojas de cápsula de Bowman está el espacio capsular o urinario, que recibe el líquido filtrado a través de la pared de los capilares y de la hoja visceral de la cápsula de Bowman. Cada corpúsculo renal tiene un polo vascular por el que penetra la arteriola aferente y sale la arteriola eferente, y un polo urinario, donde nace el túbulo contorneado proximal (Junqueira 2015). En el corpúsculo renal se produce la ultrafiltración de la sangre en la que sólo permanece las células y las proteínas; en este sitio, el agua y todas las otras sustancias disueltas de un peso molecular de hasta 5 kDa se filtran con libertad.

1.3.1.3 El Túbulo Proximal

Los túbulos renales proximales se originan en el polo urinario de los glomérulos. Consisten en largos segmentos cilíndricos de trayectoria enrollada que desembocan en el asa de Henle. Por su interior circula el filtrado glomerular que madurará a lo largo de su recorrido hasta convertirse en orina. Se distinguen dos componentes: la parte inicial cortical contorneada, inmediata continuación del epitelio de la cápsula de Bowman y la parte recta que sigue de manera rectilínea adentrándose hacia las zonas más internas en las proyecciones medulares. En el túbulo proximal se pueden distinguir tres segmentos morfológicamente diferentes: S1, S2 y S3. El segmento S1 es la porción inicial del túbulo y transcurre en la parte contorneada constituyendo las primeras dos terceras partes del túbulo (Oxburg 2018). El segmento S2 incluye el tercio restante y el principio de túbulo proximal recto. En segundo lugar, el segmento S3 comprende el resto del túbulo proximal recto situado en la corteza interna y en la zona externa de la médula. Las características funcionales y morfológicas de las células epiteliales van variando a lo largo del túbulo de manera que en cada segmento se distingue un tipo celular propio conocido también como S1, S2 y S3 (Junquera 2015).

La célula tubular epitelial es cuboide y presenta una membrana apical con ribete en cepillo o brush border muy desarrollada. Esta altamente polarizada y su compartimentalización apical/basolateral resulta esencial para la función tubular (Junquera 2015).

Las células de la porción S1 presentan una amplia membrana apical del tipo ribete en cepillo que incrementa la superficie de contacto con la luz del túbulo e incrementa así su capacidad para reabsorber pequeños compuestos orgánicos del filtrado glomerular. Las microvellosidades que conforman el ribete están recubiertas por glicocálce y contienen una gran variedad de enzimas fosfatasa alcalina, peptidasa, involucradas en la degradación de péptidos y otras sustancias en productos que pueden ser transportados al interior celular (Oxburg 2018). Poseen también un aparato vacuolar y lisosomal muy desarrollado, cuya función es la endocitosis y degradación de macromoléculas de ultrafiltrado, como la albúmina u otras proteínas plasmáticas de bajo peso molecular. El núcleo es grande y se encuentra en el centro de la célula. La superficie basolateral de estas células también se amplifica por prolongaciones

que se interdigitan con las prolongaciones de las células adyacentes dejando un espacio intercelular. Contienen un gran número de mitocondrias que se pueden observar largas y tortuosas en el microscopio electrónico y se localizan en los procesos laterales próximos a la membrana plasmática (Junqueira 2015).

1.3.1.4 El Asa de Henle

Es un segmento del túbulo renal en forma de asa, situado entre el túbulo proximal y el túbulo distal que penetra en la médula renal, está formada por un primer brazo descendente, un brazo delgado ascendente un brazo grueso ascendente (Oxburgh 2018). El asa de Henle comienza en la corteza, recibiendo el filtrado desde el túbulo proximal, se extiende en la médula, y finalmente vuelve a la corteza para terminar en el túbulo distal. Su función principal es concentrar las sales en el intersticio, reabsorbiendo alrededor de un 25% de los iones de sodio y cloro filtrados y un 15% de agua. El brazo descendente comienza al final del segmento S3 del túbulo proximal. Los brazos descendentes poseen una baja actividad sodio/potasio ATPasa, debido a esto no son capaces de un transporte activo significativo. La salida preferentemente de sodio en relación con el agua, determina una hipertoniá del intersticio renal, indispensable para concentrar o diluir la orina y por tanto mantener el balance hídrico del organismo (Oxburgh 2018).

1.3.1.5 El Túbulo Distal

El túbulo distal es una porción de la nefrona que se encuentra entre el asa de Henle y el tubo colector. Es el segmento final de la nefrona y se caracteriza por poseer un gran número de mitocondrias, plegamientos basales e invaginaciones de la membrana lateral (Junqueira 2015). El túbulo distal está formado por tres segmentos morfológicamente diferenciados: el brazo grueso del asa de Henle, la mácula densa (localizada en el aparato yuxtaglomerular) y el túbulo distal contorneado. Este tramo de la nefrona es en el que se concentra la mayor actividad Sodio/Potasio ATPasa basolateral entre todos los segmentos y por ello resulta muy importante en el transporte transcelular de Sodio (Ross 2015).

1.3.1.6 Túbulo colector

Al final de su recorrido el túbulo distal dirige su filtrado hacia el tubo colector, la estructura tubular del riñón que recoge orina de diferentes nefronas, confluye con otros tubos colectores y desemboca finalmente al conducto papilar de Bellini (Ross 2015). Está formado por dos segmentos: el medular y el cortical y es el responsable del mantenimiento del balance hídrico. Está recubierto por un epitelio cuboideo que progresivamente se hace más bajo, no presenta ribete de cepillo y tiene un citoplasma claro. Los segmentos del tubo colector son muy importantes para la regulación final de sodio, potasio, iones hidrógeno y agua (Ross 2015).

Los conductos colectores corticales y medulares determinan la osmolalidad final de la orina mediante la reabsorción de agua y urea (mediante el transportador de urea A1). Existen dos tipos celulares: las células principales y las células intercalares con (Weiner y cols. 2015).

A esta porción de la nefrona también se le conoce como porción concentradora dado que allí la permeabilidad al agua es muy elevada debido a la presencia de proteínas en membrana especializadas en el transporte de la misma, llamadas acuaporinas (Nielsen y cols. 2015), además en esta sección se encuentran receptores a la hormona antidiurética (ADH) o vasopresina, (V_2), los cuales desencadenan vías de señalización intracelulares para evitar la pérdida de agua y de esta manera concentrar la orina (Noda 2014).

1.4 Acuaporinas

El agua puede difundir a través de las capas lipídicas pero esta difusión no es lo suficientemente rápida para satisfacer las necesidades de las células. Se han descrito un grupo de proteínas llamadas acuaporinas (AQPs) las cuales tienen la función de transportar agua rápidamente a través de las membranas biológicas (Nielsen y cols. 2015).

Las acuaporinas tienen propiedades como la selectividad, permeabilidad y mecanismos de activación. Una molécula de AQP pesa 28 kDa y posee 270 aminoácidos aproximadamente, además tiene la característica de formar tetrámeros en la membrana de la célula, teniendo un canal de agua independiente por cada monómero. Además, tienen seis dominios transmembranales con sus dominios carboxi y amino terminal dentro del citoplasma (Takata 2008). Los seis dominios están unidos por cinco lazos conectores (A,B,C,D,E) (Echevarria y Zardoya 2006). Dos de los lazos se pliegan hacia la membrana y se aproximan para formar el poro. La estructura resultante encierra una zona central estrecha que se ensancha abriéndose hacia ambos lados de la membrana. Este particular plegamiento pone en contacto las dos secuencias conservadas de asparagina-prolina-alanina (NPA) para formar el poro (Echevarria y Zardoya 2006) (Figura 5).

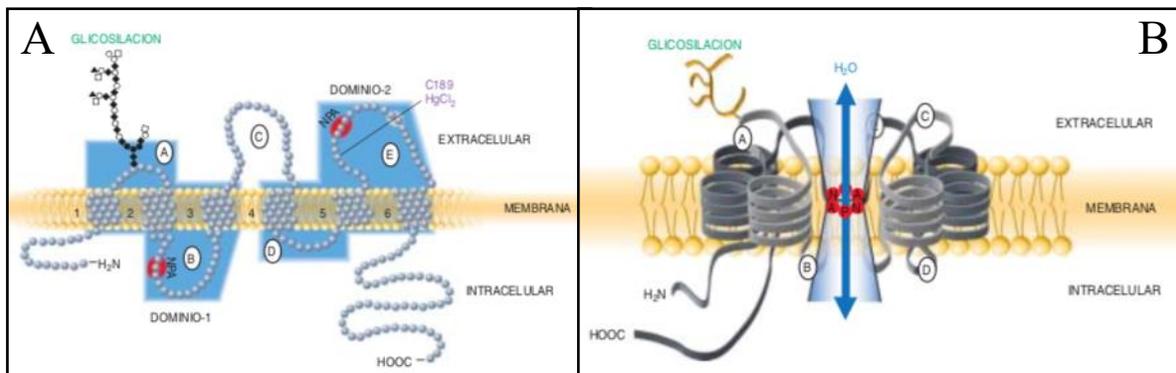


Figura 5. A. Acuaporina se compone de dos dominios, imagen especular uno de otro, se organiza en seis segmentos que atraviesan la membrana de lado a lado unidos por cinco lazos conectores (A,B,C,D,E). B. El lazo B y E se pliegan hacia la membrana para formar el poro acuoso. En el sitio más estrecho se ponen en contacto los tripletes de NPA (Echevarria y Zardoya, 2006).

Se han encontrado acuaporinas en distintas partes del organismo como en el ojo, el riñón, pulmón, en el tracto gastrointestinal, páncreas, próstata, vejiga, cerebro, entre otros. De las trece acuaporinas que hasta ahora se conocen, cuatro de ellas (AQP3, AQP7, AQP9 y AQP10) forman un subgrupo de las acuagliceroporinas, que son permeables además de al agua, a urea, glicerol y a otros solutos de tamaño reducido (Echeverría y Zardoya 2006). Interesantemente de las trece acuaporinas descritas hasta ahora, siete de ellas han sido reportadas en riñón distribuidas a lo largo de la nefrona.

1.4.1 Acuaporinas y riñón

En el riñón se expresan siete acuaporinas (AQP1, AQP2, AQP3, AQP4, AQP6, AQP7 y AQP8) (Treviño y Valdez 2006 ; Terris y cols. 2017) (Figura 6). AQP1 está presente en el túbulo proximal y en la parte delgada del asa de Henle. Las AQP3 y AQP4 se expresan en las células principales del túbulo colector y ambas se expresan en la membrana basolateral. AQP6 está presente en las células intercales del túbulo colector, sin embargo, su función aún no ha sido definida. AQP7 se expresa en el borde en cepillo del túbulo proximal especialmente en el segmento 3. La AQP8 está presente en mayor proporción en el túbulo proximal y en las células del túbulo colector. AQP2 se encuentra localizada en las células principales del túbulo colector en vesículas citoplasmáticas y en membrana apical (Terris y cols. 2017). Esta última acuaporina ha llamado la atención de varios investigadores debido a su importancia en la concentración de la orina y se ha incluso pensado en utilizar su cuantificación como método diagnóstico de daño renal.

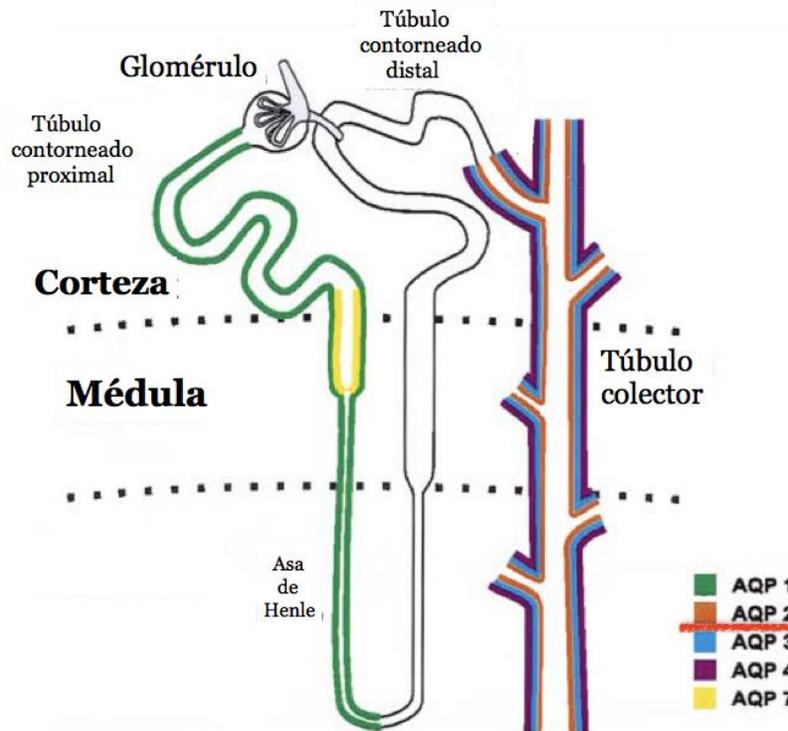


Figura 6. Acuaporinas distribuidas a lo largo de la nefrona (Modificado de Terris y cols. 2017).

1.4.2 Acuaporina 2

La proteína AQP2 tiene una importancia relevante ya que, a nivel de túbulo colector en la nefrona, se lleva a cabo la mayor parte de reabsorción de agua regulada por la hormona vasopresina u hormona antidiurética (ADH). La secreción de la ADH se produce a nivel de la neurohipófisis y es regulada en respuesta a los cambios de osmolaridad (≥ 280 mOsm/kg) o a la disminución del volumen circulante efectivo (5-10%) (Noda 2014).

En el riñón, la ADH se une al receptor V2 de vasopresina en la membrana basolateral del tubo colector. El receptor V2 actúa ligado a proteínas G y mediante la activación de la adenilato ciclasa (AC), aumenta el adenosín monofosfato cíclico (AMPC), originando una respuesta celular que tiene como evento final la inserción de los canales de agua en la membrana apical, facilitando de esta manera el transporte de agua a través de ella (Terris y cols. 2017). AQP2 está limitada dentro de vesículas citoplasmáticas, cuando el organismo necesita retener

agua, se traslada hacia la membrana apical, permitiendo su reabsorción en el túbulo urinario hacia dentro de la célula (Noda 2014).

1.4.2.1 Almacenamiento y transporte de AQP2

AQP2 se encuentra almacenada en vesículas en la región supra nuclear, en un compartimento positivo para Rab11, lo que quiere decir que los endosomas tempranos tienen una función fundamental en el transporte de AQP2 a través del citoplasma. Además, se ha demostrado que es un proceso fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3C) dependiente (Takata 2008).

ADH desencadena la movilización intracelular de calcio y la subsecuente activación de calmodulina, la cual estimula la quinasa de cadena ligera de miosina lo que resulta en la fosforilación de la cadena ligera de miosina para el transporte de la AQP2. La endocitosis y su posterior clasificación en cuerpos vesiculares parece estar regulada por la ubiquitinación de AQP2 (Nedvetsky y cols 2009).

Por otro lado, la ADH al unirse con el receptor específico V2 en la membrana basolateral, provoca la activación de PKA y con ello la fosforilación de la serina 256 (S256) (Takata 2008) localizada en la porción citoplasmática de la molécula, lo que conlleva al transporte de AQP2 a la membrana apical. Se sabe de la fosforilación de otras serinas (261, 264 y 269) y de treonina 269, sin embargo, se ha demostrado que la activación de S256 es imprescindible para este proceso (Nedvetsky y cols 2009, Horsefield 2020) (Figura 7).

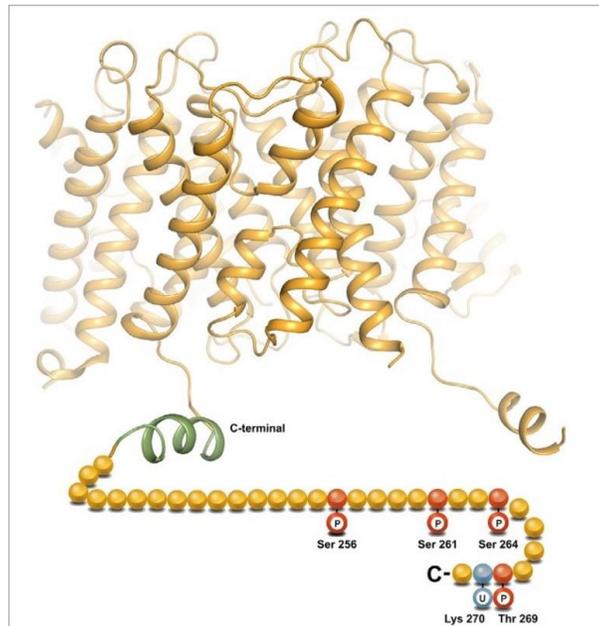


Figura 7. Estructura de acuaporina 2. Se muestran en rojo los sitios de fosforilación (serinas 256, 261, 264, treonina 269) y en azul el sitio de ubiquitinación (Horsefield 2020).

Se ha demostrado que el citoesqueleto es fundamental para el tráfico de AQP2. La ADH promueve la despolimerización de los filamentos de actina lo cual permite el transporte de vesículas hacia la membrana apical. Por otro lado, cuando las vesículas son endocitadas, los filamentos cumplen la función de prevenir la exocitosis descontrolada ya que retiene las vesículas en el citoplasma (Nedvetsky y cols 2009). La exposición a ADH tiene una regulación a corto plazo en la que como ya se ha mencionado anteriormente provoca el tráfico e inserción de las vesículas intracelulares que contienen AQP2 hacia la membrana apical, lo que tarda unos cuantos minutos. Asimismo, se ha descrito una regulación a largo plazo que puede tomar de horas a días y es causada por una regulación génica, resultando en un incremento en la cantidad producida de esta proteína (Jensen y cols. 2013) (Figura 8).

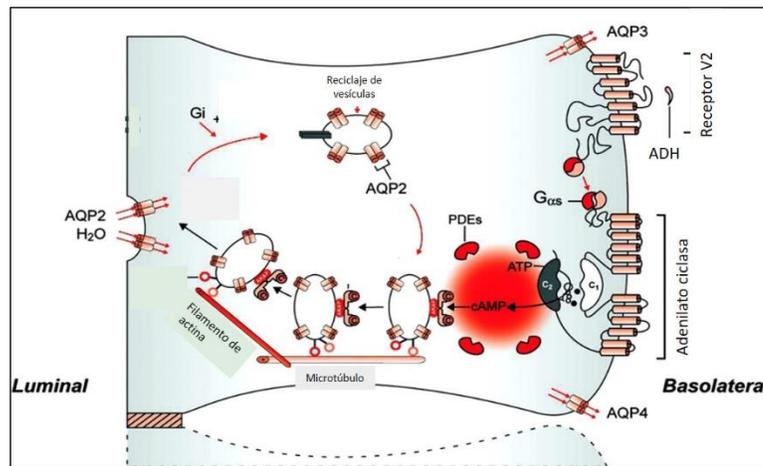


Figura 8. Transporte de AQP2 a la membrana apical de las células principales del túbulo colector en riñón (Bichet 2006).

1.4.2.2 AQP2 en patologías

AQP2 se ha relacionado con fisiopatologías asociadas con retenciones severas de agua y por defectos en la concentración urinaria. En el primer caso se han descrito condiciones como la falla cardíaca congestiva, cirrosis hepática y preeclamsia, en las cuales se han encontrado niveles elevados de ADH y de AQP2 (Boone y Deen 2008). Por el contrario, existen enfermedades caracterizadas por una desregulación en la capacidad de concentración urinaria, por ejemplo, la diabetes insípida, condición en la cual los individuos son capaces de orinar volúmenes grandes de orina. Esta condición puede ser de origen central, nefrogénica o psicógena (Lamas 2014). En pacientes con diabetes insípida central se ha observado que la cantidad de ADH se encuentra disminuida lo que con lleva a una regulación a la baja, debido a que no hay suficiente cantidad de hormona para desencadenar toda la respuesta celular. Otra clasificación para este tipo de diabetes es la nefrogénica y no tiene que ver con la cantidad de hormona si no con la incapacidad de la célula de desencadenar las vías de señalización intra y extracelulares, esta condición es congénita y pueden ser debido a la mutación del gen *AVPR2*, el cual codifica para el RV2 o mutaciones en el gen *AQP2*.

Además, se ha propuesto medir AQP2 urinaria como predictor de daño renal y en aplicaciones tanto fisiológicas como de diagnóstico como un posible biomarcador de nefropatía

diabética, resultando de gran importancia debido a que es una enfermedad en la cual se va perdiendo de manera lenta y progresiva la función renal (Rossi y cols. 2017). Jensen y colaboradores midieron la excreción urinaria de AQP2 (u-AQP2) en individuos sanos después de haber dado una carga de agua (20 mL/Kg; 1605 mL) encontrando una disminución del 17% después de 240 minutos así como una disminución de ADH y osmolaridad plasmática, así se demostró que la u-AQP2 disminuye durante la diuresis después del consumo de agua por vía oral (Jensen y cols. 2013). Además, en este mismo estudio se midió la u-AQP2 en individuos después de una infusión de solución glucosada al 5% (aporte calorico: 170 Kcal/L) vía intravenosa y observaron un decremento de u-AQP2, lo cual resulta interesante estudiar debido que al ser una solución isotónica se esperaría que la concentración de acuaporina 2 aumentara o permaneciera sin cambio (Jensen y cols. 2013). Por otro lado, es común que se traten pacientes con deshidratación y con hipoglucemia con este tipo de soluciones, pero en mujeres embarazadas o lactancia se maneja con muchas precauciones debido a que no se sabe sí puede afectar al producto (Vademecum 2010).

El riñón es un órgano altamente especializado en el cual participan una cantidad enorme de moléculas y cada una con una función en particular. Como ya lo he mencionado uno de sus objetivos principales es la formación de orina y ello se logra debido a la filtración del plasma en el glomérulo y la subsecuente reabsorción de agua, aminoácidos, glucosa entre otros. Resulta interesante de manera particular el transporte de glucosa a este nivel ya que se sabe que el 99% de la glucosa filtrada es reabsorbida en túbulos proximales a través de co-transportadores de glucosa acoplados a sodio tanto de tipo 1 como 2 (SGLT1,2). Además, se han descrito transportadores de glucosa (GLUT) a lo largo de la nefrona, en particular, el GLUT4. Albiston y colaboradores describieron su distribución en riñón, pero aún no ha sido comprendida de manera completa la participación de estas proteínas en el transporte de glucosa específicamente en este órgano (Albiston 2011).

1.5 Transportadores renales de glucosa

La glucosa es la fuente principal de energía en los organismos vivos. Su paso a través de las membranas celulares depende del gradiente de concentración y la difusión facilitada por un transportador. La glucosa experimenta biotransformación por oxidación (glicólisis) o se almacena en forma de glucógeno, principalmente en hígado y en músculo estriado. La concentración plasmática de glucosa en pacientes sanos es de alrededor de 90 mg/dL debido a un equilibrio entre la absorción intestinal de glucosa, glucogenólisis hepática, reabsorción, excreción renal y la gluconeogénesis producida tanto en hígado como en riñón (Segura y Ruilope 2013).

La glucosa es eliminada del torrente sanguíneo por dos proteínas: los transportadores de glucosa asociados a sodio (SGLT) y por transportadores de glucosa (GLUT) presentes en diferentes tejidos, estos últimos con un peso molecular de 50-63 kDa compuestos por 12 dominios transmembranales. Transportan la glucosa por gradiente de concentración y de manera independiente de energía. La mayoría de las células de mamíferos son consumidores netos de éste carbohidrato por lo que mantienen su concentración intracelular baja para favorecer su entrada (Castrejón y cols. 2007). La familia de GLUTs está compuesta por 13 miembros y están divididos en tres clases basados en sus características estructurales. Clase I, GLUT1-4, son los que han sido más estudiados. Clase II, formado por GLUT5 (específico de fructosa) y GLUT 7,9 Y 11. Clase III, incluye a GLUT 8, 10,12 (Castrejón y cols. 2007).

En el riñón se han descrito la expresión de cuatro transportadores de glucosa acoplados a sodio (SGLT1, SGLT2, SGLT4, SGLT6). A los SGLT1 y SGLT2 se les ha dado más importancia debido a que han sido estudiados como blanco farmacológico para controlar la concentración aumentada de glucosa en sangre (Segura y Ruilope, 2013).

El SGLT2 se expresa en mayor cantidad en la primera porción del túbulo contorneado proximal (segmentos S1 y S2). Este cotransportador es de baja afinidad y alta capacidad. Varios estudios han demostrado que el 90% de la reabsorción de glucosa es llevada a cabo por esta proteína y el 10% restante es atribuida al SGLT1, el cual se ha descrito en segmento S3 del túbulo proximal.

En la membrana basolateral de las células epiteliales de los segmentos S1 y S2 del túbulo proximal, se ha descrito al GLUT2, el cual libera la glucosa reabsorbida del túbulo proximal al torrente circulatorio. Esta misma función pero en el segmento S3 la lleva a cabo el transportador GLUT1 (Segura y Ruilope 2013).

El GLUT4 está presente en tejidos que responden a la presencia de insulina (músculo y adipocitos), pero recientemente se ha descrito en el riñón (Albiston y cols. 2011) en los rayos medulares, asa delgada de Henle, en las células yuxtaglomerulares, en los túbulos distales y en glomérulo (podocitos). Se sabe que la glucosa es reabsorbida en su mayoría en el túbulo proximal y ahora se ha descrito el paso de glucosa a través de GLUT4 en podocitos que son sensibles a insulina. De esta manera se ha propuesto que la resistencia a la insulina a este nivel se podría asociar al desarrollo y progresión de la enfermedad renal (Wasik y Lehtonen 2018).

1.5.1 Transportador GLUT4

El GLUT4 es una proteína de 509 aminoácidos con doce dominios intramembranales dentro de lo que se ha descrito es que la arginina y glicina de los segmentos 4 y 10, así como el triptófano de la hélice 10 y las secuencias de glicina/arginina o arginina/lisina, localizadas en las asas que unen a las hélices 2 y 3 y las que unen a las hélices 8 y 9 son también sitios de unión a la glucosa (figura 9). El GLUT4 es codificado por el gen *SLC2A4* ubicado en el cromosoma 17 y se encuentra principalmente en los tejidos sensibles a insulina como el músculo, adipocitos, corazón (Castrejón y cols. 2007) y en algunas estructuras específicas del riñón (Albiston y cols. 2011; Wasik y Lehtonen 2018). La insulina estimula la translocación del GLUT4 de sitios de almacenamiento intracelular hacia la membrana.

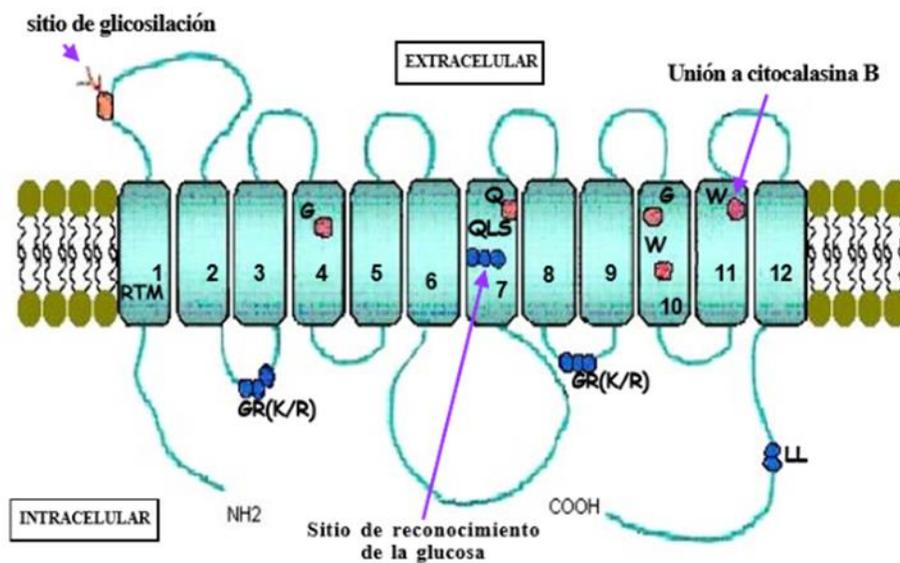


Figura 9. Estructura molecular del transportador de glucosa GLUT4. Contiene 12 regiones transmembranales, conectados de lazos hidrofílicos. La parte tanto amino como carboxi terminal se encuentran intracitoplasmáticamente. G: glicina, R: arginina, Q: glutamina, L: leucina, K: lisina, S: serina y W: triptófano (Castrejón y cols. 2007).

El receptor de la insulina actúa como una cinasa que fosforila residuos de tirosina del propio receptor y es un complejo heterotetramérico compuesto por dos subunidades extracelulares α (porción que se une a la insulina) y dos subunidades β transmembranales con actividad tirosina-cinasa (Wasik y Lehtonen, 2018). Cuando esta hormona se une a su receptor se induce un cambio conformacional que estimula la actividad tirosina-cinasa. El receptor activado se autofosforila y a otras proteínas también iniciando diferentes cascadas de señalización. Las principales proteínas fosforiladas por el receptor son las IRS (Insulin receptor substrate), una de las más importantes la llamada sustrato del receptor de la insulina (IRS-1), la cual activa dos vías intracelulares: la cascada de las cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas) y la vía de la fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K) que desencadena, entre otros, la translocación de las vesículas a la membrana celular, lo que aumenta el número de GLUT4 en la misma y por consiguiente la cantidad de glucosa que entra a la célula (Gómez-Zorita y Urdampilleta 2012). Las IRS interactúan con la porción reguladora p85 de la PI3K, lo que permite la activación y traslocación hacia la membrana plasmática. PI3K cataliza la

fosforilación de 4,5-bifosfato a la forma fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP₃). El aumento de PIP₃ estimulado por insulina resulta en la fosforilación y activación de la serina/treonina cinasa (AKT) también llamada proteína cinasa B (PKB), provocando cascadas de señalización intracelulares que coordinan el tráfico de GLUT4 a la membrana plasmática (figura 10) (Wasik y Lehtonen, 2018). Cuando el estímulo se termina, se desencadena la endocitosis y las proteínas acarreadoras de glucosa regresan en vesículas de almacenamiento (GCVs, GLUT4-containing vesicles) al citoplasma de la célula.

Los estudios han demostrado que los podocitos, así como los adipocitos y células musculares, responden a insulina vía activación de PI3K y también a la vía de señalización de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK; Mitogen-Activated Protein Kinases) también denominada ERK, que es una serín-treonín cinasa que es capaz de translocarse al núcleo para regular la transcripción modificando la actividad de proteínas; pero sólo la PIK3 está implicada en la captación de glucosa por la célula. En los podocitos la insulina induce la rápida translocación de GLUT4 a la membrana plasmática similar en músculo y adipocitos (Wasik y Lehtonen, 2018). Mediante procesos de endocitosis y exocitosis se regula el número de transportadores presentes en la membrana para la captación de glucosa (Gómez-Zorita y Urdampilleta, 2012). Es importante conocer la cantidad y la distribución de los transportadores de glucosa en estados de enfermedad ya que la disminución de las concentraciones intracelulares de este transportador resulta un estado de resistencia a la insulina.

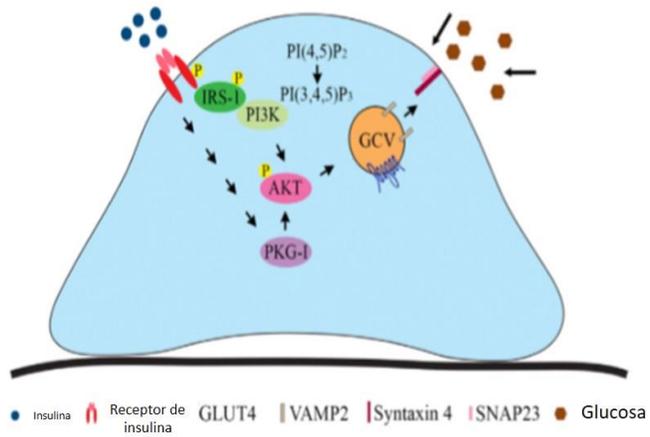


Figura 10. Translocación de vesículas con GLUT4 estimuladas por la unión de Insulina con su receptor (RI) en podocitos. La insulina activa el receptor tirosina-cinasa el cual fosforila a IRS, la cual se une a PIK3 y fosforila a PIP2 (fosfatidil inositol 4,5-bifosfato) para formar PIP3 (fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato) el cual está ligado a la activación de Akt(PKB) lo que activa la translocación de GCVs a la membrana plasmática (Wasik y Lehtonen, 2018).

2. Antecedentes

2.1 Trastornos metabólicos y su efecto en el riñón

Estudios epidemiológicos en humanos, confirman que existe un riesgo significativo de presentar proteinuria y daño renal en personas con obesidad que no padecen otras enfermedades (Praga y Morales 2006). Además, la obesidad *per se* aumenta el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, incluyendo hipertensión, diabetes, dislipidemias y disfunción renal (Havel y cols. 2018).

Por otro lado, investigaciones con animales obesos han demostrado un aumento en la reabsorción de sodio y también del volumen sanguíneo directamente relacionado con la presión arterial elevada y a la ganancia de peso corporal. Además, observan que el tejido adiposo encapsula casi completamente los riñones e incluso penetra en el hilio renal, lo que provoca compresión, incrementando la presión intrarenal (Hall y cols. 2002). Además, se ha observado que la obesidad, induce cambios hemodinámicos y favorece los depósitos glomerulares de lípidos, lo cual juega un papel importante en la patogénesis de la enfermedad renal, debido a que no se lleva a cabo la filtración glomerular correctamente (Praga y Morales 2006).

2.2 Efectos de malnutrición durante la gestación en el riñón de crías

adultas

La malnutrición es la forma más común del desafío durante el desarrollo ya que se ha demostrado que retrasa la formación de las nefronas. El resultado de una disminución en la cantidad de nefronas al nacimiento aumenta la susceptibilidad de daño y enfermedad renal en la vida adulta (Li y cols. 2010) y este órgano es extraordinariamente sensible a la programación fetal.

Estudios han reportado que una restricción de proteínas durante la gestación reduce el número de glomérulos en las crías y además programa tanto hembras como machos a padecer hipertensión sensible a sal. La ventana de sensibilidad de la presión sanguínea a una restricción de proteínas coincide con la nefrogénesis en la rata. Estos datos son consistentes con la hipótesis de que una restricción de proteínas materna causa una hipertensión en las crías adultas por un deterioro del desarrollo renal (Woods y cols. 2004). Asimismo, se ha demostrado que una malnutrición en ratas gestantes con una disminución en su dieta total del 50% (desnutrición), disminuye considerablemente la tasa de filtración glomerular y el flujo plasmático renal en las crías. Además, observaron una disminución en el número de glomérulos y la osmolaridad urinaria tiende a ser más baja, lo que podría estar relacionado con una respuesta compensatoria de producción de ADH para aumentar la cantidad de AQP2 (Lucas y cols. 1991).

Existen pocos trabajos en cuanto una dieta rica en carbohidratos durante la gestación y su relación con patologías presentes en la vida adulta, sin embargo, Colette y colaboradores formularon la hipótesis de que una combinación de dieta pre y posnatal alta en grasa y fructosa al 10%, aumenta el daño renal y metabólico en crías machos en la vida adulta, encontrando en dichos animales, aumento en la albúmina urinaria (450%), glomerulosclerosis (190%) y fibrosis tubulointersticial (101%) asociando estos cambios al aumento en la expresión de TGF- β . (Jackson y cols. 2011).

2.3 Acuaporina 2 y GLUT 4 en riñón

Se ha descrito la función de los túbulos renales para la reabsorción del agua y la formación de orina. Así como, la participación de la AQP2 para la entrada de agua a las células principales del túbulo colector (Noda 2014). En un modelo de Diabetes mellitus inducida en ratas, se observó un aumento en la expresión de la AQP2 en la membrana apical de las células principales, y de la AQP2 fosforilada, lo que sugiere un aumento de la traslocación de vesículas de AQP2, lo que está relacionado con un aumento en la concentración de vasopresina circulante en sangre. Hay reportes controversiales sobre la expresión de AQP2 en ratas diabéticas inducida por estreptozotocina. Algunos estudios muestran un aumento tanto en la expresión como la traslocación de la AQP2 en la médula renal (Nejsumy cols. 2017), mientras que otros han mostrado una disminución en el marcaje inmunohistoquímico (Leung y cols. 2005) y en otro grupo de investigación no observaron cambios en los niveles totales de AQP2 (Blanco y cols. 2002) (Ward y cols. 2001). En un trabajo en el cual manipulan la dieta posnatal con agua azucarada al 30%, se observa que la expresión de AQP2 disminuye en comparación con los animales control atribuido a la disminución de la corticosterona. Lo que demuestra que debido a ésta manipulación, la regulación de las proteínas encargadas de la formación de la orina se ven afectada (Solís 2018).

Así como existen en los túbulos renales transportadores de agua, se han descrito transportadores de glucosa (GLUT4), los cuales, anteriormente sólo se había demostrado su presencia en tejidos sensibles a insulina y aunque no se sabe certeramente su función se encuentran distribuidos difusamente en el riñón específicamente en las células epiteliales de los túbulos proximales, distales, la porción gruesa del asa de Henle, en los túbulos colectores (Albiston y cols. 2011) y podocitos (Wasik y Lehtonen 2018). En las células principales del túbulo colector la vasopresina induce la translocación de AQP2 hacia la membrana apical, lo cual es análogo al sistema de translocación mediado por la unión de hormona-receptor de GLUT4 en tejidos sensibles a insulina (Albiston y cols. 2011).

Tanto en adipocitos como en células musculares se ha descrito una proteína llamada aminopeptidasa regulada por insulina (IRAP). Al ser activado el receptor de insulina, la IRAP se activa iniciando la translocación de GLUT4 a la membrana basolateral y permitir el paso de la glucosa circulante hacia adentro de la célula.

En tejidos sensibles a insulina IRAP está colocalizada con GLUT4 tanto en vesículas citoplasmáticas como en membrana basolateral, lo que no sucede en riñón. Además se observó que en animales knockout para IRAP, la concentración de AQP2 fue dos veces más alto que los controles explicada por una regulación en conjunto con la vasopresina (Albiston y cols. 2011).

En experimentos con cultivos de células glomerulares en condiciones de concentración alta de glucosa, se ha observado una disminución en la concentración de GLUT4 y un aumento en la concentración de otros transportadores de glucosa como el GLUT1 Y GLUT3 (Moutzouris y cols. 2009). Aunque la función del GLUT4 a nivel de túbulo colector no es conocida aún, es posible que juegue un papel importante en facilitar el transporte de glucosa a través de las células y debido a que su número y localización celular es importante en estados fisiopatológicos que tienen que ver con trastornos metabólicos es interesante investigar qué está sucediendo en la distribución de estas proteínas.

3. Justificación

La ENSANUT reportó en el 2016, un aumento en la prevalencia de sobrepeso y obesidad, relacionado con el consumo de bebidas azucaradas como uno de los principales factores de riesgo para padecer dichas patologías. Asimismo, la ingesta de dichas bebidas se ha asociado con la presencia de diabetes mellitus tipo 2 y enfermedades cardiovasculares (Hu y Malik. 2010).

A la fecha, son escasos los estudios en animales que abordan los efectos de la ingesta de bebidas azucaradas durante la gestación y su participación respecto a la salud de las crías a pesar del notable aumento de su consumo y que ha sido paralelo a la epidemia de obesidad y aumento en las cifras de diabetes mellitus que presenta la población mexicana en la actualidad. Por otro lado, ratas a las que se les induce Diabetes mellitus, muestran un aumento en la expresión de AQP2 tanto en la membrana apical como en la intracelular, aunado al incremento de vasopresina circulante (Nejsun y cols. 2017). Es importante estudiar proteínas relacionadas con el transporte de agua y glucosa a nivel renal en la descendencia y su relación con el consumo de agua azucarada durante de la gestación debido a que tienen una función importante y específica, evidentemente éste trabajo será de gran utilidad para intentar dilucidar si el consumo de azúcar en etapas críticas del desarrollo pudiera estar modificando la expresión de AQP2 y GLUT4 en las nefronas y ello predisponer a la descendencia a un funcionamiento renal ineficiente en la vida adulta.

4. Hipótesis

El consumo de agua azucarada al 5% en etapa prenatal y posnatal, modifica la expresión de AQP2 y GLUT4 en el riñón de ratas macho adultas.

Predicciones:

- El consumo de agua azucarada al 5% en etapa prenatal, disminuye la expresión de acuaporina 2 y GLUT4 en corteza y médula del riñón de ratas macho.
- El consumo de agua azucarada al 5% en etapa posnatal, no cambia la expresión de AQP2 en médula, pero aumenta en corteza y la expresión de GLUT4 en corteza aumenta y en médula no cambia en el riñón de ratas macho.
- El consumo de agua azucarada al 5% durante la etapa prenatal y posnatal no modifica la expresión de AQP2 y GLUT4 en corteza y en médula tampoco modifica la expresión de AQP2 y aumenta la de GLUT4 en el riñón de ratas macho.

5. Objetivo general

Determinar la expresión de AQP2 y GLUT4 en el riñón de ratas macho que consumieron agua azucarada al 5% en etapas prenatal y posnatal.

6. Objetivos específicos

- Analizar la expresión de AQP2 de los túbulos colectores en la corteza y médula del riñón derecho por medio de Western blot.
- Determinar la expresión de GLUT4 en la corteza y médula del riñón derecho por medio de Western blot.

7. Metodología

Se utilizaron doce ratas adultas hembra de la raza Wistar de tres meses de edad de un peso de 220-250 gramos. Se mantuvieron en condiciones de bioterio con un fotoperiodo de 12/12 horas, con ciclo luz-oscuridad invertido y temperatura de 20 ± 2 °C, con alimento y agua *ad libitum*. Los procedimientos experimentales fueron regulados bajo los estatutos del Manual de Seguridad en el trabajo de laboratorio del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta y en las especificaciones descritas en la Norma Oficial Mexicana en el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio NOM-062-ZOO-1999.

7.1 Grupos experimentales

7.1.1 Grupos experimentales de las madres

Las ratas hembras fueron apareadas con machos expertos. El día del apareamiento se consideró el día 0 (cero) de gestación. A partir del día uno, se midió el consumo diario de agua, alimento y el peso corporal. Se asignaron aleatoriamente a las ratas en los diferentes grupos:

Grupo control (MS, madre simple), ratas alimentadas con una dieta Chow 5001 de Purina y agua simple de manera *ad libitum* durante la gestación y lactancia.

Grupo con tratamiento (MA, madre azúcar), ratas alimentadas con una dieta Chow 5001 de Purina y agua azucarada al 5% (5 g en 100 mL de agua) de manera *ad libitum* durante la gestación y lactancia.

7.1.2 Grupos experimentales de las crías

Después del parto, las camadas se ajustaron a diez crías para estandarizar la demanda alimenticia durante la lactancia. El destete se realiza el día veintidos de lactancia, y se asignan los machos aleatoriamente a los grupos experimentales correspondientes. Se formaron cuatro grupos en total: dos procedentes de las madres que tomaron agua simple durante la gestación y lactancia,

un grupo consumió agua simple (MS-CS, Madre Simple-Cría Simple) y el otro agua azucarada al 5% (MS-CA, Madre Simple-Cría Azúcar). De igual manera, dos grupos de las madres que consumieron agua azucarada durante la gestación y lactancia, un grupo con agua simple (MA-CS, Madre Azúcar-Cría Simple) y otro grupo con agua azucarada al 5% (MA-CA, Madre Azúcar-Cría Azúcar).

7.2 Diseño experimental

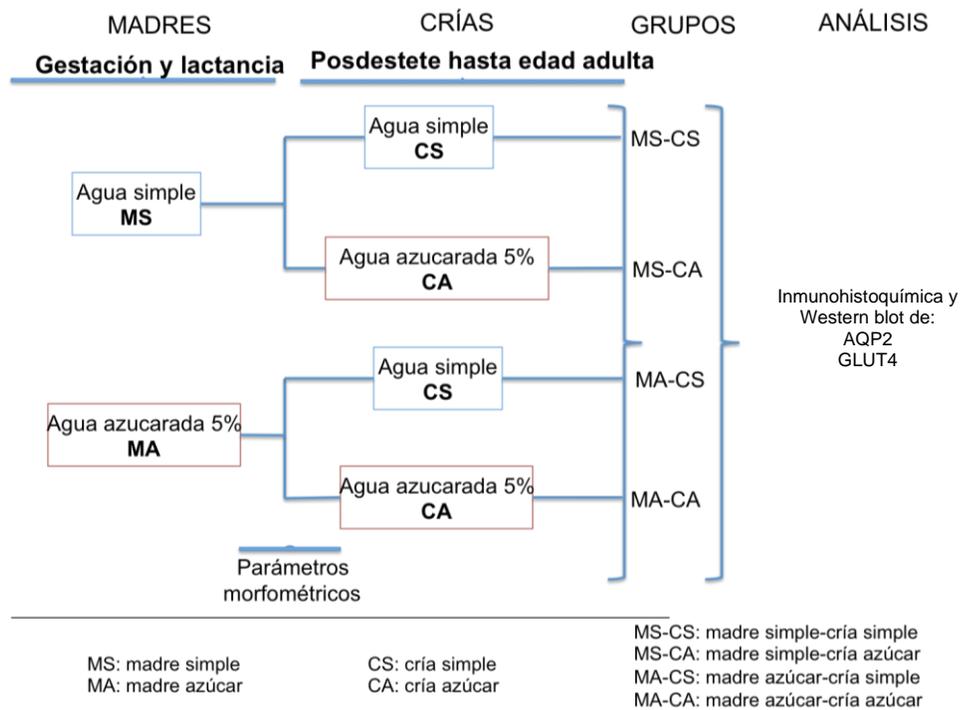


Figura 11. *Diseño experimental*

7.3 Obtención del riñón

Inmediato a la decapitación se realiza una incisión sobre la línea media ventral de la cavidad abdominal y se extraen ambos riñones, se pesan y guardan, el izquierdo para conservar en formalina (inmunohistoquímica) y el derecho se congela a -70°C (Western blot).

7.4 Inclusión y corte de riñón

Partiendo del hilio renal, se realizó un corte longitudinal y se utilizó la parte ventral del riñón izquierdo. Se deshidrató y aclaró el tejido, con alcohol etílico en concentraciones del 60 al 100% y xilol (Anexo 1). Posteriormente, se incluyó en paraplast X-tra (Sigma-Aldrich).

Una vez incluido el tejido se dejó reposar por 24 h, pasando este tiempo se realizaron cortes longitudinales en un micrótopo marca Leica a 7µm de grosor y se recolectaron en laminillas formando series de 3 cortes cada una. Los cortes se dejaron secar durante al menos una semana antes de ser utilizados para las pruebas de inmunohistoquímica.

7.5 Inmunohistoquímica

Se incubaron los cortes de riñón por 72 h en citrato de sodio (100mM, pH 6) a 4°C, para el desenmascaramiento de antígenos. Al término se realizaron tres lavados con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y después se incubó con agua oxigenada al 3% en PBS para agotar las peroxidases endógenas por 30 minutos. Se realizó un bloqueo inespecífico con suero normal de burro durante una hora.

Después de tres lavados con PBS/0.3% Tritón X-100, los cortes se incubaron con el anticuerpo primario (Anti AQP2 (C-17): sc-9882, Santa Cruz Biotechnology, Inc. 0.1 mg/ml diluido en

PBS / 0.1% Tritón X-100) a una concentración de 1:50 durante 72 h a 4°C; transcurrido este tiempo se realizaron tres lavados con PBS/0.3% Tritón X-100, y se incubó con el anticuerpo secundario anti-cabra desarrollado en burro (1:250) diluido en PBS/0.3% Triton-X-100 durante 2 h a temperatura ambiente.

El marcaje inmunohistoquímico se reveló con un sistema de detección Complejo Avidina-Biotina (Kit Vectastain® ABC). Utilizando diaminobencidina (DAB) como sustrato. Finalmente se montaron las laminillas para su análisis.

Se incubaron los cortes de riñones antes descritos por 72 h en citrato de sodio (100mM, pH 6) a 4°C, para el desenmascaramiento de antígenos. Al término se realizaron tres lavados con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y después se incubó con agua oxigenada al 3% en PBS para agotar las peroxidases endógenas por 30 minutos. Se realizó un bloqueo inespecífico con suero normal de cabra durante una hora.

Después de tres lavados con PBS/0.3% Triton X-100, los cortes se incubaron con el anticuerpo primario 1:50 (Anti GLUT4 diluido en PBS / 0.1% Triton X-100) durante 72 h a 4°C; transcurrido este tiempo se realizaron tres lavados con PBS/0.3% Triton X-100, y se incubó con el anticuerpo secundario anti-ratón desarrollado en cabra (1:250) diluido en PBS/0.3% Triton-X-100 durante 2 h a temperatura ambiente.

El marcaje inmunohistoquímico se revela con un sistema de detección Complejo Avidina-Biotina (Kit Vectastain® ABC). Utilizando diaminobencidina (DAB) como sustrato. Las laminillas se montaron para su análisis.

7.6 Inmunotransferencia de AQP2 y GLUT4

El riñón congelado se fraccionó en corteza y médula y se trató con un homogeneizador electrónico en buffer solución amortiguadora de lisis, inhibidores de proteasas (PIC), (PMSF) 1mM y ditiotreitól (DTT) 1mM. Los homogenados se centrifugaron a 13400 rpm por media hora a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se determinó la concentración de proteínas por el

método de Bradford. La separación electroforética de proteínas se realizó utilizando geles de poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio (SDS PAGE), se cargó 35 μ g de proteínas de extractos totales. Después se transfirió a membranas de nitrocelulosa y se tiñó con Rojo de Ponceau para verificar que la cantidad de proteína cargada fuera la misma. Las membranas se incubaron con una solución de 7% de leche en PBS-T (Na_2HPO_4 80 mM, NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 100 mM, Tween 20 al 0,1%, pH 7,5) durante 1 hora, posteriormente, se incubó durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente (mouse monoclonal Anti-AQP2 (E-2): sc-515770, Santa Cruz), (goat monoclonal Anti-GLUT4 (IF8): sc-53566, Santa Cruz Biotechnology, Inc). Posteriormente, se incubó durante 2 horas con el anticuerpo secundario correspondiente (mouse Anti-goat IgG-HRP, Santa Cruz y Goat Anti-mouse IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) 1:2000. Las bandas inmunorreactivas se revelaron utilizando un estuche de quimioluminiscencia (Super Signal West Pico, Pierce). Se obtuvo el cociente de la cantidad relativa de AQP2 y GLUT4 entre la columna total de cada grupo en la membrana teñida con Rojo de Ponceau con densitometría en el programa ImageJ versión 1.51 2015. Los resultados obtenidos se reportaron en porcentaje de expresión.

8. RESULTADOS

8.1 Peso corporal y consumo de agua y alimento

En la figura 12A se muestran los resultados del peso corporal de los animales al final del tratamiento. Se puede distinguir que los animales que consumieron agua azucarada ya sea durante la gestación/lactancia y/o vida posdestete muestran un aumento de peso comparados con el grupo control. El grupo que consumió agua azucarada durante toda su vida pesó 414.9 ± 3.633 g mostrando una diferencia significativa con el grupo control 379 ± 3.548 g. También se observaron diferencias entre los animales que consumieron azúcar sólo durante su vida posnatal 422.7 ± 3.762 y en aquellos provenientes de hembras que consumieron agua azucarada 401.7 ± 3.739 . MS-CS vs MS-CA (****P<0.0001), MS-CS vs MA-CS (**P=0.0020), MS-CS vs MA-CA (****P<0.0001) y MS-CA vs MA-CS (**P=0.0038). Se observan diferencias significativas en el factor prenatal (****P<0.0001) y en la interacción de ambos factores (**P=0.0005) sin mostrar diferencias significativas en el factor posnatal (P=0.0596).

Por otro lado, se puede observar en la figura 12B que los animales que consumieron agua azucarada de manera crónica (81.37 ± 7.225 mL) consumieron más agua que los animales control (46.54 ± 2.739 mL) y aquellos que sólo consumieron agua azucarada en su vida posdestete consumieron una cantidad similar al grupo MA-CA (86.98 ± 4.792 mL). Los grupos MS-CA, MA-CA mostraron diferencias significativas con el grupo control (***P=0.0003, **P=0.0014). Los animales que consumieron agua azucarada solamente durante la vida posnatal comparados con los que sólo tuvieron el estímulo durante la gestación y lactancia fueron diferentes (***P=0.003) y los grupos MA-CS y MA-CA también mostraron diferencias significativas (**P=0.0017). El factor prenatal muestra un valor de ****P<0.0001.

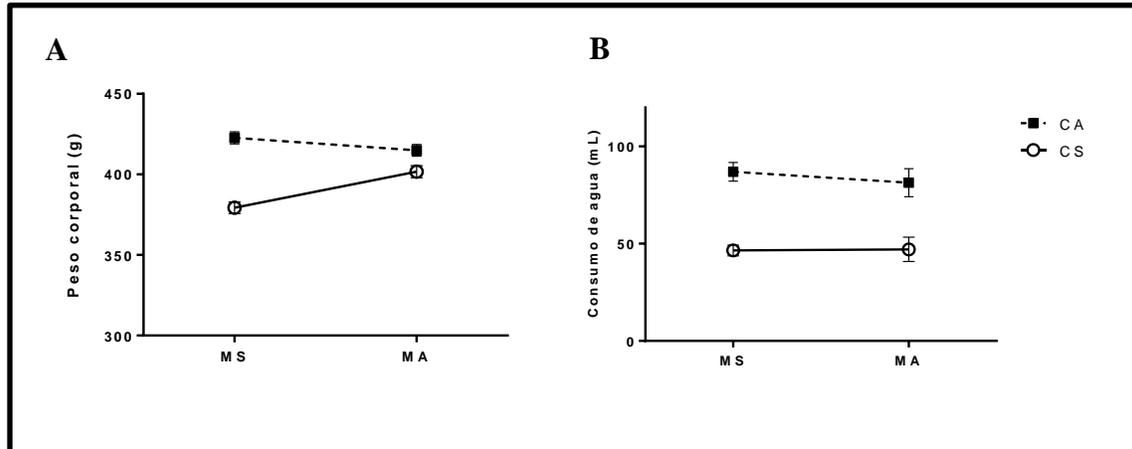


Figura 12. A. Peso corporal de las ratas macho (g) al finalizar el tratamiento. Se observan diferencias significativas en el factor prenatal (**** $P < 0.0001$) y en la interacción de ambos factores (*** $P = 0.0005$) sin mostrar diferencias significativas en el factor posnatal ($P = 0.0596$). **B.** Consumo de agua (mL). Se muestran las comparaciones de los cuatro grupos MS-CS, MS-CA, MA-CS Y MA-CA. El factor prenatal muestra un valor de **** $P < 0.0001$. Se muestran para ambas gráficas medias $\pm e.e.$ ANOVA, 2 vías pos hoc Bonferroni.

8.2 Expresión de AQP2 en corteza renal

Se observa en la figura 13A la inmunolocalización de la proteína AQP2 en las células principales del túbulo colector en los cuatro grupos. En la figura 13B se muestra la comparación de la expresión de los tres grupos experimentales contra el 100% de la expresión del grupo control, mostrando el grupo MA-CA una diferencia significativa de la expresión de AQP2 ($152.8 \pm 21.80\%$) en el grupo de animales que estuvieron expuestos al consumo de agua azucarada en ambas etapas (prenatal y posdestete), por el contrario se observa una marcada disminución en el grupo que consumió agua azucarada solamente durante la etapa posnatal ($65.83 \pm 15.43\%$) (* $P = 0.0246$) y el grupo en el cual los animales solo tuvieron el estímulo dentro del útero durante la etapa gestacional y lactancia tuvieron un porcentaje muy cercano al grupo control ($98.17 \pm 22.42\%$). Explicando un porcentaje alto en la fuente de variación la etapa prenatal (* $P = 0.0364$, $F_{(1,20)} = 5.030$) así como la interacción de ambos factores (* $P = 0.0298$, $F_{(1,20)} = 5.472$). Se observa una diferencia significativa entre los grupos MS-CA vs MA-CA (* $P = 0.0246$).

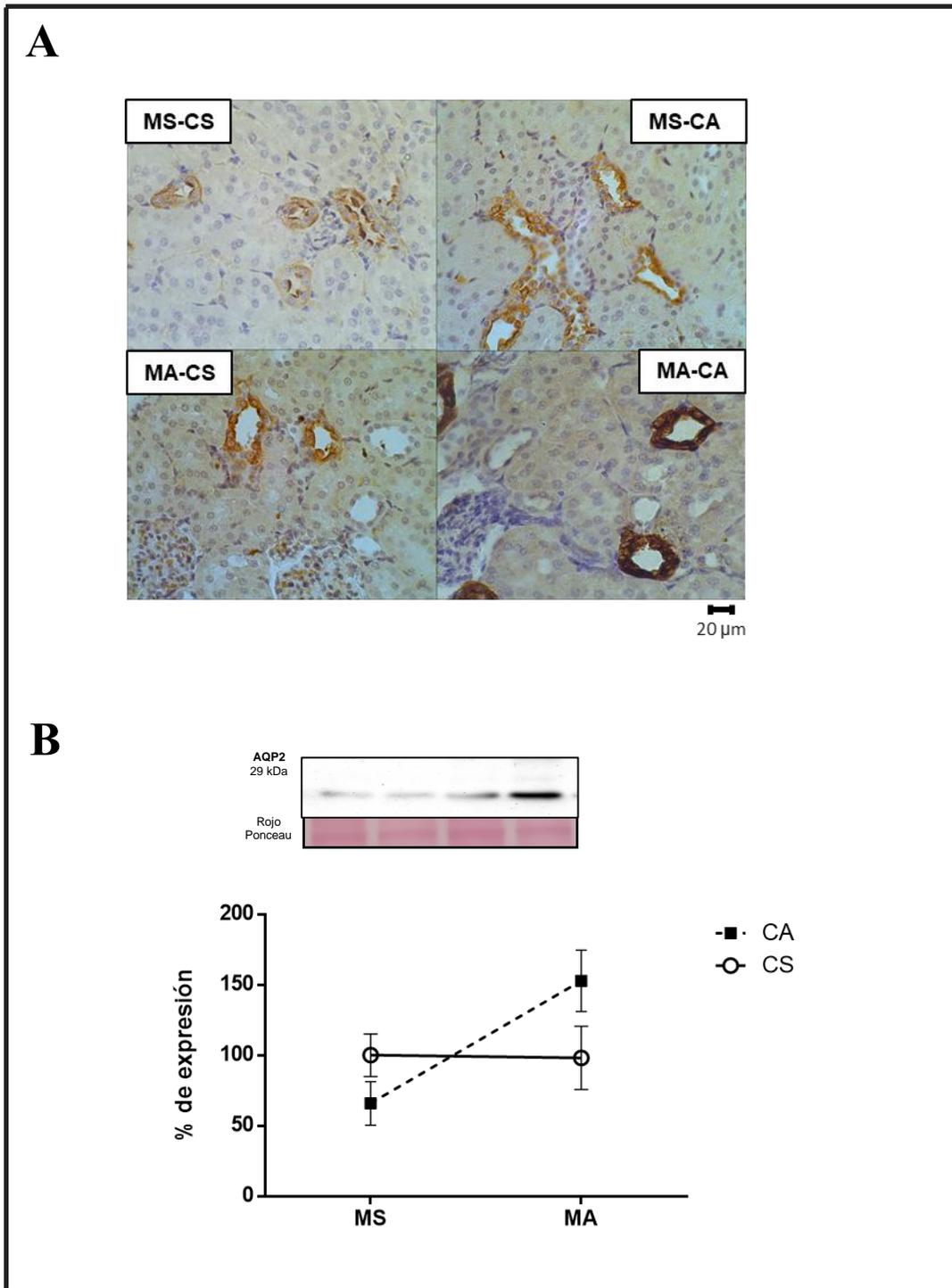


Figura 13. Expresión de AQP2 en corteza renal en los cuatro grupos MS-CS, MS-CA, MA-CS y MA-CA. **A.** Inmunolocalización de acuaporina 2 contrateñida con hematoxilina de Meyer. 40X. Escala 20µm. **B.** Porcentaje de expresión de AQP2. Western blot. Interacción* ($P=0.0298$, $F_{(1,20)}=5.471$) Prenatal* ($P=0.0364$, $F_{(1,20)}=5.030$) Postnatal ($P=0.5953$, $F_{(1,20)}=0.2914$). MS-CA vs MA-CA (* $P=0.0246$). Se muestran medias \pm e.e. ANOVA de dos vías. $n=6$.

8.3 AQP2 en médula renal

En la figura 14 se muestra la comparación de la expresión de AQP2 en médula renal de los cuatro grupos: MS-CS, MS-CA, MA-CS y MA-CA. Los grupos fueron comparados con el 100% de expresión de AQP2 en los animales del grupo control. El grupo que consumió agua azucarada sólo en la vida posnatal arrojó un porcentaje de $93 \pm 18.86\%$, el grupo de animales que consumieron agua azucarada sólo en la vida prenatal mostraron un $132.8 \pm 18.61\%$ y los animales expuestos al estímulo del consumo de agua azucarada durante la vida pre y posnatal mostraron un $107.3 \pm 15.71\%$. La fuente de variación tanto prenatal, posdestete así como la interacción no puede explicar el efecto observado. Factor prenatal $P=0.3684$, $F_{(1,20)}=0.8470$, factor posnatal $P=0.5367$, $F_{(1,20)}=0.3952$ y el valor de la interacción $P=0.7205$, $F_{(1,20)}=0.1317$.

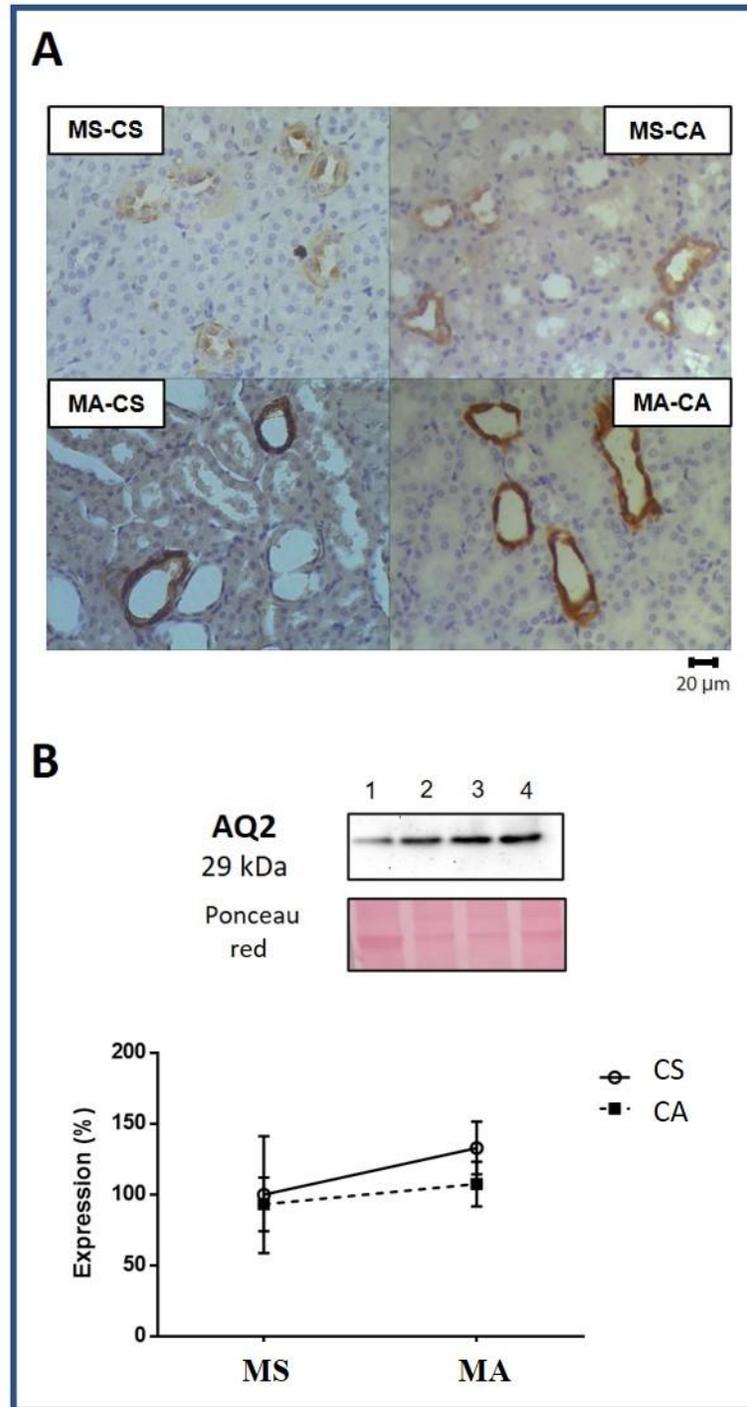


Figura 14. Expresión de AQP2 en médula renal en los cuatro grupos MS-CS, MS-CA, MA-CS y MA-CA. **A.** Immunolocalización de acuaporina 2 contrateñida con hematoxilina de Meyer. 40X. Escala 20 μ m **B.** Porcentaje de expresión de AQP2. Western blot. Interacción ($P=0.7205$, $F_{(1,20)}=0.1317$) Prenatal ($P=0.3684$, $F_{(1,20)}=0.8470$) Postnatal ($P=0.5367$, $F_{(1,20)}=0.3952$) Se muestran medias \pm e.e. ANOVA de dos vías. $n=6$.

8.4 GLUT4 en corteza renal

En la figura 15 muestro la expresión en porcentaje de GLUT4 en corteza de riñón de ratas de los cuatro grupos experimentales (MS-CS, MS-CA, MA-CS, MA-CA). Se compararon los grupos contra el 100% de expresión del grupo control. Se observa en la gráfica un aumento significativo en la expresión de GLUT4 de $155.3 \pm 32.39\%$ en el grupo expuesto tanto prenatal como posnatalmente al consumo de agua azucarada, por el contrario, los grupos intermedios muestran una disminución comparados con el grupo control, $89 \pm 11.80\%$ para el grupo MS-CA y para el grupo MA-CS fue de $82.17 \pm 15.18\%$. El factor de la vida posnatal tiene un efecto significativo (* $P=0.0401$, $F_{(1,20)}=4.855$) al igual que la interacción (* $P=0.0123$, $F_{(1,20)}=7.646$); el factor prenatal no tuvo un efecto significativo ($P=0.0800$, $F_{(1,20)}=3.420$).

8.5 GLUT4 en médula renal

En la figura 16 se observa el porcentaje de expresión de GLUT4 en corteza de riñón de ratas de los cuatro grupos experimentales (MS-CS, MS-CA, MA-CS, MA-CA) y todos los grupos se compararon contra el 100% de expresión del grupo control. Los grupos que consumieron agua azucarada durante toda su vida mostraron una expresión del $80 \pm 21.91\%$, mientras que los que recibieron el mismo estímulo solamente durante su vida posnatal revelaron una expresión de $89.50 \pm 14.77\%$ y un porcentaje similar ($88.67 \pm 18.45\%$) fue para el grupo que sólo durante la vida prenatal estuvo bajo el estímulo del agua azucarada. El factor prenatal no fue significativo ($P=0.6254$, $F_{(1,20)}=0.2458$) así como tampoco el posnatal ($P=0.6532$, $F_{(1,20)}=0.2081$) al igual que la interacción ($P=0.9656$, $F_{(1,20)}=0.0019$).

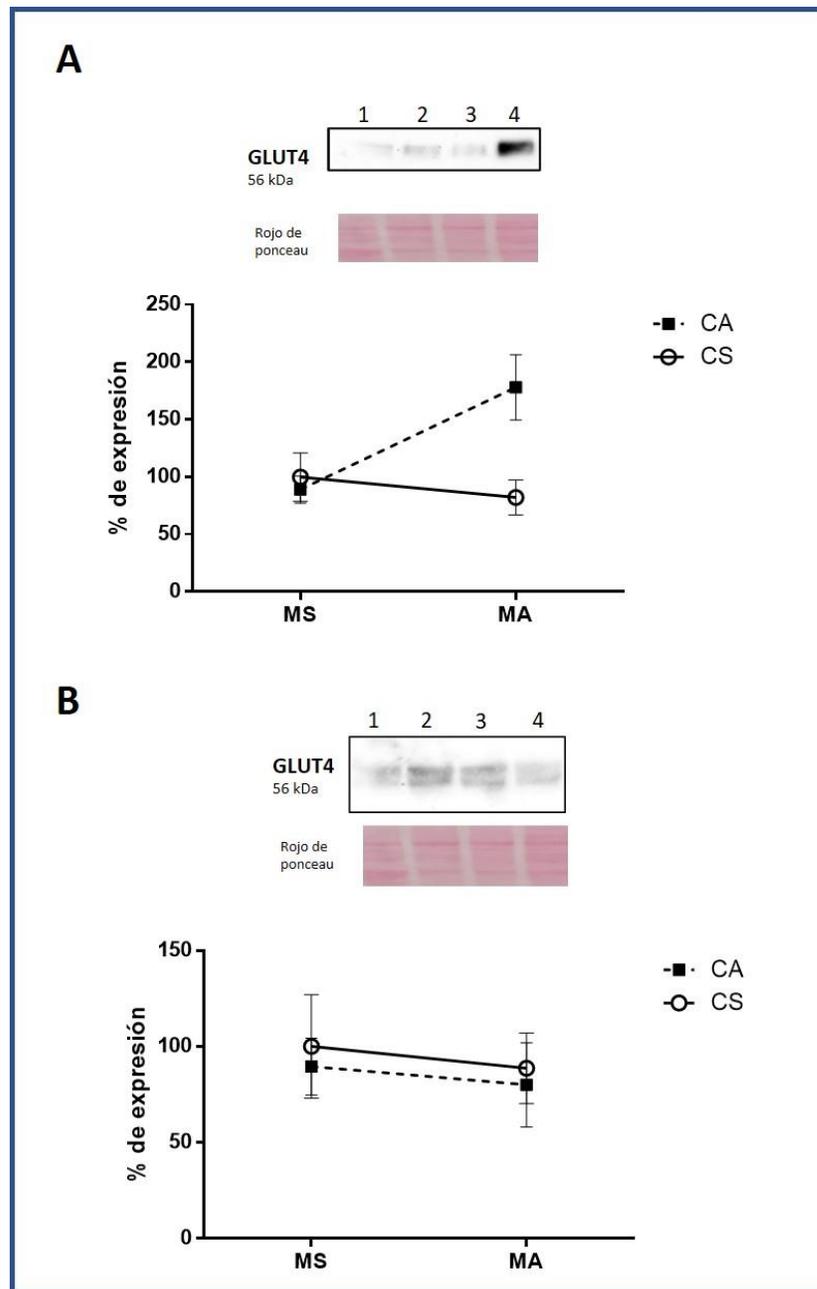


Figura 15. A. Se muestra la expresión de GLUT4 en corteza renal en los cuatro grupos MS-CS, MS-CA, MA-CS y MA-CA. El factor de la vida posnatal tiene un efecto significativo $*P=0.0401$, $F_{(1,20)}=4.855$). $*Interacción$ ($P=0.0123$, $F_{(1,20)}=7.646$). El factor prenatal ($P=0.0800$, $F_{(1,20)}=3.420$). MS-CA vs MA-CA $*P=0.0291$; MA-CS vs MA-CA $*P=0.0167$. Se muestran medias \pm e.e. ANOVA de dos vías. $n=6$. **B.** Expresión de GLUT4 en médula renal en los cuatro grupos MS-CS, MS-CA, MA-CS y MA-CA. A. Inmunolocalización de GLUT4 contrateñida con hematoxilina de Meyer. 10X. B. Porcentaje de expresión de GLUT4. Western blot. El factor prenatal ($P=0.6254$, $F_{(1,20)}=0.2458$). Posnatal ($P=0.6532$, $F_{(1,20)}=0.2081$). Interacción ($P=0.9656$, $F_{(1,20)}=0.0019$). Se muestran medias \pm e.e. ANOVA de dos vías. $n=6$.

9. Discusión

El peso corporal de los animales concordó con antecedentes donde se relaciona el consumo de bebidas azucaradas con aumento de peso (Havel y cols. 2018; Jackson y cols. 2011; ENSANUT 2016, Quintanilla y cols. 2021). En los animales de este trabajo se observó un incremento de peso corporal independientemente de la etapa en la fueron expuestos al estímulo del consumo de agua azucarada, 33.8 gramos más en promedio comparados con el grupo control; asimismo, se demostró que los animales que consumieron agua azucarada solamente posdestete (MC-CA) y durante toda su vida (MA-CA), bebieron más agua que aquellos que sólo consumieron agua simple durante todo el experimento (MS-CS) e incluso los que sólo durante la gestación estuvieron expuestos a éste estímulo (MA-CS), encontrando una diferencia en el consumo con el grupo control de 37.6 mL. Los animales que consumieron agua azucarada mostraron peso corporal mayor que el grupo control y aquellos que consumieron agua simple posdestete.

Por otro lado, los cambios significativos en la cuantificación de la expresión de proteínas se presentaron sólo en la corteza renal y no en médula, tanto para AQP2 y GLUT4, lo que resulta interesante debido a como ya se ha explicado en otros artículos las células de la médula renal, son células que están incluso en condiciones normales en un estado hiperosmolar perfectamente adaptadas a este tipo de ambiente (Radin y cols. 2012).

En el caso de AQP2, el grupo en el que se expresó de forma aumentada con una diferencia de 52.8% comparada con el grupo control fue aquel grupo expuesto al agua azucarada al 5% durante la vida tanto prenatal como posdestete, lo que pudiera estar explicando este comportamiento es que los animales además de estar consumiendo más agua, es agua azucarada, y como ya se ha demostrado antes tanto en humanos como en los animales el azúcar en los alimentos produce una conducta de adicción hacia estos productos (Lennerz y Lennerz 2018) prefiriendo su consumo comparados con el grupo control. El sistema de regulación de concentración y dilución de orina se da a nivel de túbulo colector en la nefrona gracias a la acción de la ADH, la cual es secretada por la hipófisis a nivel de sistema nervioso central regulado por la necesidad de ingestión de agua debido a una deshidratación sistémica. El

resultado de la liberación de ADH al torrente sanguíneo termina en un aumento en la expresión de AQP2 (Noda 2014) y en aquellos animales obedece a una necesidad interna de consumo de agua por sed debido probablemente al aumento en la osmolaridad plasmática captada por osmoreceptores. En los animales que sólo consumieron agua azucarada postdestete disminuyeron su expresión en 34.17% comparadas con el grupo control, lo que contrasta con otros trabajos que han utilizado agua azucarada al 30% (Sánchez y cols. 2018), lo que nos pudiera estar indicando una disminución en la regulación de la reabsorción de agua a nivel de túbulo colector o podría ser que estos individuos hayan regulado la necesidad de agua intracelular y por lo tanto no esté expresando AQP2 en la membrana apical para la retención de agua como lo demostraron en pacientes sanos a los cuales se les administró una carga de agua de 20 mL/Kg por 15 minutos y observaron que después de 210 minutos la expresión de u-AQP2 está disminuida al 17% explicado como una diuresis normal después de un consumo de abundante agua (Jensen 2013).

Por otro lado, la expresión de GLUT4 en la corteza renal se mostró aumentada en un 55.3% en los animales que consumieron agua azucarada durante toda su vida comparada con el grupo control, lo que pudiera estar indicando que el transporte de glucosa a este nivel del riñón pudiera estar mediado por este transportador presente en podocitos, en túbulo contorneado proximal, asa descendente de Henle y túbulo colector anteriormente descrito por Albiston y colaboradores en 2011. Además, nos pudiera dar una idea de que durante la gestación se pudiera estar programando a la descendencia a estar preparado para un insulto igual o mayor que el que estuvo en el útero de la madre. Asimismo, se ha descrito que en corteza las células expresan glucosa-6-fosfatasa por lo que hay liberación de glucosa *per se* (Segura y Ruilope 2013). Por el contrario, el grupo que al que a los críos se les cambio a agua simple después de haber estado bajo el estímulo de agua azucarada durante la fase prenatal, presentó una expresión similar al grupo control lo que concuerda con experimentos realizados en cultivos celulares de riñón a los que someten a las células a concentraciones de glucosa elevada y observan que la cantidad de GLUT4 disminuye en las células después de haber sido expuestas a altas concentraciones de glucosa, sin embargo, demuestran que otros transportadores de glucosa como el GLUT1 y el GLUT3 aumentan como una respuesta adaptativa al entorno (Moutzouris y cols. 2009).

A pesar de que los animales consumieron agua adicionada con carbohidratos y que aumentaron la ingesta de agua no se observaron cambios en médula renal probablemente el cambio de osmolaridad y el volumen no fueron significativos para modificar la expresión de ambas proteínas o el estado hiperosmolar bajo el cual se encuentran las células de médula están perfectamente adaptadas a estos cambios. Además, se sabe que la utilización de la glucosa es principalmente en la médula renal, así que pudiera ser que aunque estuviera llegando por circulación más cantidad de glucosa, se estaría utilizando mientras que la liberación de la misma se produce en la corteza y se ha descrito que la médula no expresa glucosa-6-fosfatasa lo que significa que no está liberando glucosa *per se* como sucede en la corteza (Segura y Ruilope 2013). A pesar de que no está muy estudiado el transportador 4 en riñón, se sabe que el GLUT1 y 2 liberan la glucosa absorbida por los SGLT1 y 2 a la circulación (Segura y Ruilope 2013), el transportador 4 pudiera tener una función parecida al GLUT1 y GLUT2. Cerca del cien por ciento de la reabsorción de la glucosa se da nivel de túbulo proximal por los cotransportadores SGLT1 Y SGLT2, así que la concentración de glucosa que alcanza el nivel de túbulo colector es muy baja, lo que pudiera explicar que no se encontraran cambios en los niveles de la expresión de GLUT4 en médula, además de que a este nivel no se libera glucosa a circulación al carecer de la enzima glucosa-6-fosfatasa; a diferencia de corteza, en la cual se observó un aumento en los niveles de GLUT4 en aquellos animales que consumieron agua azucarada durante todo el experimento, también no descartamos la posibilidad de que no se este degradando y por eso la cuantificación sea mayor; sin embargo, se sabe que a este nivel renal también se libera de manera normal glucosa a circulación debido a la presencia de la enzima glucosa-6-fosfatasa. Por otro lado, es interesante resaltar que los animales que consumen agua azucarada ingieren más cantidad y aun así, el transportador 4 no se ve alterado, posiblemente porque como se ha observado en pacientes diabéticos, los cotransportadores de glucosa se elevan para cumplir con la demanda de glucosa presente en el filtrado glomerular y se aumenta la cantidad de estos para evitar la pérdida de energía, así que reabsorbe más de lo normal no dejando que la glucosa se escape por orina, de esta manera pudiera no estar llegando al final del sistema tubular gran cantidad de glucosa no necesitando la reabsorción y liberación de la misma a circulación. Asimismo, en individuos con diabetes y daño renal se ha demostrado la presencia de esclerosis (Noshahr y cols. 2020) en el glomérulo lo que impide que se realice una filtración adecuada del

plasma sanguíneo (Jackson y cols. 2011) observando que los niveles de nitrógeno ureico aumentan en sangre, además demostramos en los riñones de los animales expuestos al consumo de agua azucarada la presencia de glomerulosclerosis (Velázquez 2016) independientemente de la etapa en la cual estuvieron expuestos a la ingesta (prenatal y/o posdestete). Se sabe que ello puede modificar las concentraciones de angiotensina II, el cual es un péptido cuya función es mantener la presión arterial y el balance hídrico del individuo (Díaz y cols. 2005), se ha demostrado que participa en la estimulación de la producción de aldosterona (Diaz y cols. 2005) la cual aumenta la concentración de la hormona antidiurética y con ello la ingesta de agua y retención de la misma a nivel de túbulo colector específicamente en las células principales aumentando la expresión de AQP2 (Scott y cols. 2021) y su translocación a la membrana apical permitiendo el paso de agua a través de la célula (Noda 2014), de esta manera se reduce el volumen urinario pero aumenta la presión arterial (Díaz y cols. 2005)(Figura 16). Asimismo, se sabe que la aldosterona tiene una participación importante en la formación de esclerosis glomerular (Shrestha y cols. 2019).

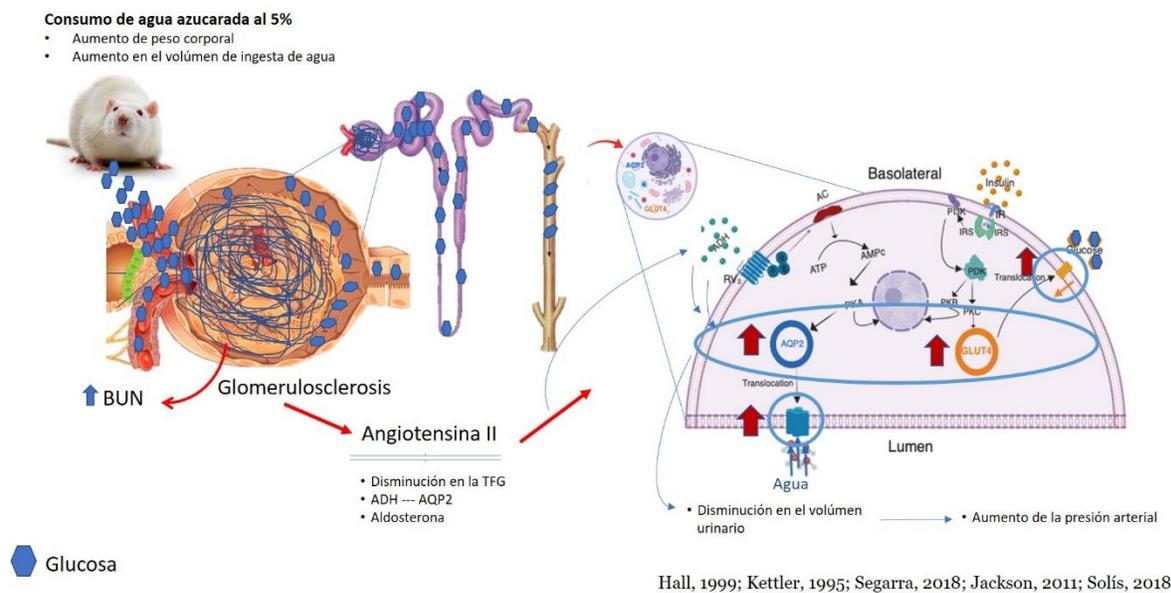


Figura 16. Mecanismo propuesto del consumo de agua azucarada y su efecto a nivel renal. ● Glucosa

10. Referencias

Albiston AL, Yeatman HR, Pham V, Fuller SJ, Diwakarla S, Fernando RN y Chai, S. Y. 2011. Distinct distribution of GLUT4 and insulin regulated aminopeptidase in the mouse kidney. *Regulatory Peptides* 166(1–3), 83–89.

Blanco OG, García MS, Traschel IC y Escriche EE. 2002. El citoesqueleto de actina: Una perspectiva desde la biología molecular del cáncer. *Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas* 21(2), 115–122.

Boone M y Deen PMT. 2008. Physiology and pathophysiology of the vasopressin regulated renal water reabsorption. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* 456(6), 1005 -1024.

Bray GA, Nielsen SJ y Popkin BM. 2004. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity *American Journal of Clinical Nutrition*, 79(4), 537–544.

Cooney CA, Apurva AD and Wolff GL. 2002. Maternal Methyl Supplements in Mice Affect Epigenetic Variation and DNA Methylation of Offspring. *The journal of nutrition* 132, 2393S-2400S.

Díaz PI, Hiriart M, Olivares RJA y Robles DG. 2006. Receptores para la angiotensina II diferentes a los clásicos receptores membranales AT₁ y AT₂: Características y su papel en el funcionamiento celular. *REB* 25(2): 55-60.

Echevarria M y Zardoya R. 2006. Acuaporinas : los canales de agua celulares.

Investigación y Ciencia, 60–67.

Fish EW, Shahronkh D, Bagot R, Caldji C, Bredy T, Szyf M y Meaney MJ. 2004. Epigenetic programming of stress responses through variations in maternal care. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1036, 167-180.

Franks PW, Ling C. 2010. Epigenetics and obesity: The devil is in the details. *BMC Medicine* 8:88.

Gómez ZS y Urdampilleta A. 2012. GLUT4: Effects of physical activity and nutrition on glucose uptake mechanisms and their application in type 2 diabetes. *Avances en diabetologia* 28(1), 19–26.

Guyton Arhur. 2009. Fisiología médica. 11va edición. Elsevier

Hall JE, Crook ED, Jones DW, Wofford MR Dubbert PM. 2002. Mechanisms of obesity associated cardiovascular and renal disease. *Am J Med Sci* 324(3): 127-137.

Hall MV. 2007. Nutritional status in pregnant adolescents: a systematic review of biochemical markers. *Maternal and child nutrition* 3, 74-93.

Havel PJ, Stern JS Teff K, Elliott SS y Keim NL. 2018. Fructose, weight gain and the insulin resistance syndrome. *The American journal of clinical nutrition* 76(5), 911-922.

Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, Putter H, Blauw GJ, Susser ES y Lumey. 2008. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (44): 17046-17049.

Hill RW, Gordon AW y Anderson. 2006. *Animal physiology*. Panamericana. 868-870

Horsefield ST. 2020. Phosphorylation of human AQP2 and its role in trafficking.

Vitamins and hormones 112.

Hu FB y Malik VS. 2010. Sugar sweetened beverages and risk of obesity and type 2 diabetes: Epidemiologic evidence. *Physiol Behav* 100(1):47-54.

Jackson CM, Alexander BT, Roach L, Haggerty D, Marbury DC, Hutchens ZM, Maric BC. 2011. Exposure to maternal overnutrition and a high-fat diet during early postnatal development increases susceptibility to renal and metabolic injury later in life. *American Journal of physiology renal physiology* 302(6), F774–F783.

Jensen JM, Mose FH, Bech JN, Nielsen S y Pedersen EB. 2013. Effect of volume expansion with hypertonic- and isotonic saline and isotonic glucose on sodium and water transport in the principal cells in the kidney. *BMC Nephrology* 14(1), 1.

Junqueira, L.A. y Carneiro J. 2015. *Histología básica*. Barcelona: Editorial médica panamericana.

Kato M y Natarajan R. 2019. Epigenetics and epigenomics in diabetic disease an metabolic memory. *Nat Rev Nephrol* 15(6): 327-345.

Lamas C, Del Pozo C y Villabona C. 2014. Clinical guidelines for managment of diabetes insipidus and syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion after pituitary surgery. *Endocrinology and nutrition* 61(4) e15-e24.

Langley-Evans SC. 2006. Developmental programming of health and disease. *Nutrition society Medal Lecture* 65, 97-105.

Lee HS. 2015. Impact of maternal diet on the epigenome during in utero life and the developmental programming of diseases in childhood and adulthood. *Nutrients* 7, 9492-9507.

Lennerz B y Lennerz JK. 2018. Food addiction, high glycemic index carbohydrates and obesity. *Clin chem* 64(1): 64-71.

Leung JCK, Chan LYY, Tsang AWL, Tang SCW y Lai KN. 2005. Differential expression of aquaporins in the kidneys of streptozotocin-induced diabetic mice. *Nephrology* 10(1), 63-72.

Li J, Khodus GR, Kruusmägi M, Kamali-Zare P, Liu XL, Eklöf AC, Aperia A. 2010. Ouabain protects against adverse developmental programming of the kidney. *Nature Communications* 1(4).

Lucas SR, Zaladek-Gil F, Costa-Silva VL, Miraglia SM. 1991. Function and morphometric evaluation of intrauterine undernutrition on kidney development of the progeny. *Brazilian*

Journal of Medical and Biological Research. 24: 967-970.

Nedvetsky PI, Tamma G, Beulshausen S, Valenti G, Rosenthal W, Klusmann E. 2009.

Regulation of Aquaporin-2 Trafficking. In: Beitz E. (eds) Aquaporins. Handbook of experimental Pharmacology, vol 190. Springer, Berlin, Heidelberg.

Nejsum LN, Kwon TH, Marples D, Flyvbjerg A, Knepper MA, Frøkiær J y Nielsen, S. 2017.

Compensatory increase in AQP2, p-AQP2, and AQP3 expression in rats with diabetes mellitus. American Journal of Physiology-Renal Physiology 280(4), F715-F726.

Nicolás TL, Cervantes RM, Cuevas RE, Corona QDL, Pérez SE, Zambrano E y Rodríguez AJ. (2018). Hitting a triple in the non-alcoholic fatty liver disease field: sucrose intake in adulthood increases fat content in the female but not in the male rat offspring of dams fed a gestational low-protein diet. Journal of Developmental Origins of Health and Disease 9(2), 151–159.

Nielsen S, Frøkiær J, Marples D, Kwon TH, Agre P y Knepper MA. 2015. Aquaporins in the Kidney: From Molecules to Medicine. Physiological Reviews, 82(1) 205–244.

Noda Y. 2014. Dynamic regulation and dysregulation of the water channel aquaporin-2: A common cause of and promising therapeutic target for water balance disorders. Clinical and Experimental Nephrology 18(4) 558–570.

Noshahr SZ, Salmani H, Rad KA y Sahebkar A. 2020. Animal models of diabetes associated renal injury. Journal of diabetes disease. eCollection: 9416419.

Manley G. 2013. Public Access NIH. 71(2), 233-236.

Moutzouris DD, Kitsiou PV, Talamagas AA, Drossopoulou GI, Kassimatis TI, Nikolaos K y Katsilambros NK. 2009. Chronic exposure of human glomerular epithelial cells to high glucose concentration results in modulation of high-affinity glucose transporters expression. *Renal failure* (29) 353-358.

Oxburgh. 2018. Kidney nephron determination. *Annual review of cell and developmental biology* 34: 21.1-21.24.

Ozkan H, Topsakal S y Ozmen O. 2019. Investigation of the diabetic effects of maternal high glucose diet on rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy* (110), 609–617.

Perera F y Herbstman J. 2011. Prenatal environmental exposures, epigenetics and disease. *Reproductive toxicology* 31(3), 363-373.

Praga M y Morales E. 2006. Obesity, proteinuria and progression of renal failure. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 15(5), 481–486.

Quintanilla CDL, Velázquez OV, Xicohténcatl RI, Lara GO, Cuervas E, Martínez GM, Nicolás TL and Rodríguez AJ. 2021. Sucrose exposure during gestation lactation and postweaning periods increases the pubococcygeus muscle reflex activity in adult male rats. *International journal of impotence research*.

Radin MJ Yu MJ, Lene SR, Lance M, Hoffert JD, Frokiaer J, Pisitkun T y Knepper MA. 2012. Aquaporin 2 regulation in health and disease. *Veterinary clinical pathology* 41(4) 455-470.

Ramírez-Vélez R. 2012. In utero fetal programming and its impact on health in adulthood. *Endocrinología y nutrición* 59:383-93.

Roseboom TJ, Painter RC, Abeelen AFM, Veenendaal MVE y Rooij SR. 2011. Hungry in the womb: What are the consequences? Lessons from the Dutch famine. *Maturitas* 70: 141-145.

Ross, M.H. y Wojciech, P. 2016. *Histología, texto y atlas color con biología celular y molecular*. Buenos aires: editorial Wolters Kluwer.

Rossi L, Nicoletti MC, Carmosino M, Mastrofrancesco L, Di Franco A, Indrio F, Procino G. 2017. Urinary Excretion of Kidney Aquaporins as Possible Diagnostic Biomarker of Diabetic Nephropathy. *Journal of Diabetes Research* 1–13.

Sánchez SCN, Cuevas RE, Muñoz A, Cervantes RM, Rodríguez AJ y Nicolás TL. 2018. Morphometric changes and AQP2 expression in kidneys of young male rats exposed to chronic stress and a high sucrose diet. *Biomedicine and pharmacotherapy* 105, 1098-1105.

Shrestha A, Che RC y Zhang AH. 2019. Role of aldosterone in renal fibrosis. *Advances in experimental medicine an biology* 1165: 325-346.

Scott HJ, Menoauar MJ y Dunn JR. 2021. Physiology, aldosterone. In: *StatPearls* PMID: 29261963.

Segura J y Ruilope LM. 2013. Contribución del riñón en la homeostasis de la glucosa. *Medicina Clinica* 141(2), 26–30.

Srinivasan B, Lee S, Erickson D y Mehta S. 2017. Precision nutrition-review of methods for point of care assessment of nutritional status. *Current opinion in biotechnology* 44:103-108.

Stover PJ, James WPT, Krook A y Garza C. 2018. Emerging concepts on the role of epigenetics in the relationships between nutrition and health. *Journal of internal medicine* 284: 37-49.

Stratton MS, Farina FM y Elia L. 2019. Epigenetics and vascular diseases. *Journal of molecular and cellular cardiology* 133, 148-163.

Takata K, Matsuzaki T, Tajika Y, Ablimit A y Hasegawa T. 2008. Localization and trafficking of aquaporin 2 in the kidney. *Histochem cell biol* 130: 197-209.

Terris J, Ecelbarger CA, Nielsen S y Knepper MA. 2017. Long-term regulation of four renal aquaporins in rats. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 271(2), F414–F422.

Tesis. Velázquez OV. 2016. Relación entre el consumo prenatal y posnatal de agua azucarada con la morfometría y expresión de acuaporina 2 en el riñón de ratas adultas. Tesis de maestría en ciencias biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Treviño RH y Valdez JC. 2006. Papel de las acuaporinas en los defectos de concentración y del síndrome nefrótico. *Medicina universitaria* 8(31): 99-104.

Tzanetakou IP. 2011. Nutrition During Pregnancy and the Effect of Carbohydrates on the Offspring's Metabolic Profile: In Search of the "Perfect Maternal Diet." *The Open Cardiovascular Medicine Journal* 5(1), 103–109.

Wang JJ, Wu ZL, Li DF, Li N y Dindot, SV, Satterfield MC, Bazer FW, Wu GY. 2012. Nutrition, epigenetics, and metabolic syndrome. *Antioxid. Redox Signal* 17: 282–301.

Ward DT, Yau SK, Mee AP, Mawer EB, Miller CA, Garland HO y Riccardi D. 2001. Functional, molecular, and biochemical characterization of streptozotocin-induced diabetes. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 12(4), 779–790.

Wasik AA y Lehtonen S. 2018. Glucose transporters in diabetic kidney disease friends or foes?. *Frontiers in Endocrinology* 9.

Weiner D, Mitch WE y Sands JM. 2015. Urea and ammonia metabolism and the control of renal nitrogen excretion. *Clinical journal of American society of nephrology* 10(8) 1444-1458.

Woods LL, Weeks DA y Rasch R. 2004. Programming of adult blood pressure by maternal protein restriction: Role of nephrogenesis. *Kidney International*, 65(4), 1339–1348.

Yuzbashian E, Asghari G, Mirmiran P, Zadeh-Vakili A y Azizi F. 2016. Sugar sweetened beverage consumption and risk of incident chronic kidney disease: Tehran lipid and glucose study. *Nephrology* 21(7), 608–616.

11. Anexos

A la par de mi trabajo doctoral de investigación, trabajé en dos proyectos más: **Sucrose exposure during gestation lactation and postweaning periods increases the pubococcygeus muscle reflex activity in adult male rats (publicado)**. Otro trabajo fue **Bulbospingiosus muscle frequency activity is modified in high sugared diet during pregnancy and postweaning offspring male rats (en proceso)** y mi proyecto doctoral, **Sucrose water consumption during gestation and postnatal life as a risk factor for kidney injury on adult Wistar rats (en proceso)**.

Los dos trabajos que están en proceso están adelantados en su escritura en un 90%. De los dos tenemos los datos completos. Los tres trabajos en conjunto forman parte de las contribuciones del cuerpo académico (CA) “Metabolismo y reproducción” calificado como CA consolidado por la SEP. Los integrantes de dicho cuerpo han involucrado a sus estudiantes de pregrado y posgrado en la generación de conocimientos sobre la anatomía y fisiología de los mecanismos involucrados en procesos como la continencia e incontinencia urinaria, por ejemplo nos hemos evocado a estudiar músculos estriados como el pubococcígeo y bulboesponjonso, así como vísceras, uretra y los riñones, implicados en tales procesos urinarios. Hemos probados la relación que existe entre estos músculos, vísceras y el consumo de agua azucarada. Los hallazgos han mostrado que el consumo prenatal y posnatal de sacarosa en la progenie adulta cambia los patrones de anatomía y de fisiología de la musculatura estriada y del riñón en la rata adulta.

1. Deshidratación e inclusión del riñón.

REACTIVO	TIEMPO
Alcohol al 60%	15 minutos (3 lavados de 5 minutos cada uno)
Alcohol al 70%	20 minutos
Alcohol al 80%	20 minutos
Alcohol al 80%	30 minutos
Alcohol al 96%	30 minutos
Alcohol al 100%	30 minutos
Alcohol-Xilol	30 minutos
Xilol I	30 minutos
Xilol II	30 minutos
Paraplast Extra II	6 horas
Paraplast Extra II	8 horas
Incluir tejido en Paraplast Extra	

12. Publicaciones

IJR: Your Sexual Medicine Journal
<https://doi.org/10.1038/s41443-021-00450-7>

ARTICLE



Sucrose exposure during gestation lactation and postweaning periods increases the pubococcygeus muscle reflex activity in adult male rats

Dora Luz Corona-Quintanilla¹ · Verónica Velázquez-Orozco² · Irving Xicohténcatl-Rugiero^{3,4} · Omar Lara-García¹ · Estela Cuevas¹ · Margarita Martínez-Gómez^{1,5} · Leticia Nicolás Toledo¹ · Jorge Rodríguez-Antolín¹ 

Received: 25 September 2020 / Revised: 28 April 2021 / Accepted: 10 May 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Limited 2021

Abstract

Erectile dysfunction is related to metabolic alterations produced by a high carbohydrate diet, which may affect muscle activity during penile reflex in adulthood. We determined whether sucrose water consumption during gestation lactation and postweaning affects pubococcygeus muscle (Pcm) activity during urethrogenital reflex in adult male rat offspring. Twelve female rats were mated and grouped in control mothers consumed tap water and sucrose mothers consumed sucrose water during gestation lactation. Male pups were weaned and assigned into four groups ($n = 6$ each): those from control mothers who continued drinking tap water (CM-CO group) or sucrose water (CM-SO group) until adult life, and those from sucrose mothers who drank tap water (SM-CO group) or continued drinking sucrose water (SM-SO group) until adult life. Body weight, Pcm activity during penile stimulation by bipolar electrodes and urethrogenital reflex were analyzed. A catheter was placed into the urethra to record variations in urethral pressure after mechanical stimulation. Two-way ANOVA followed by post hoc tests were used considering $P \leq 0.05$ as a significant difference. Males from the SM-SO group showed weight gain compared to the control group ($P < 0.001$). Also, sucrose intake promoted high Pcm activity ($P < 0.0001$) but reduced urethrogenital reflex duration CM-CO vs CM-SO ($P = 0.02$); CM-CO vs SM-CO ($P = 0.01$); CM-SO vs SM-SO ($P < 0.003$); and SM-CO vs SM-SO ($P < 0.002$). Our results suggest that a combination of a sucrose-rich diet during gestation lactation and postweaning modifies Pcm activation during penile reflex. The urethrogenital reflex is a spinal ejaculatory-like reflex, these rats could have penile dysfunction equivalent to premature ejaculation in men.



Universidad Autónoma de Tlaxcala

EDUCACIÓN



Certificate



To: *Verónica Velázquez-Orozco*



1st place
poster session I



“Sugared water consumption in relation with GLUT4
expression in male rat kindey”



“7th International Urogenital Science Meeting”
Tlaxcala, Tlax., November 5th-7th 2019



Dra. Yolanda Cruz Gómez
Organizadora

Dra. Margarita Martínez Gómez
Coordinadora CTBC



[Print this Page for Your Records](#)

[Close Window](#)

Control/Tracking Number: 2019-S-14913-SfN

Activity: Scientific Abstract

Current Date/Time: 5/2/2019 2:48:19 PM

Glut4 expression in relationship with prenatal and postnatal sugared water consumption in rats

AUTHOR BLOCK: *V. VELÁZQUEZ-OROZCO¹, L. NICOLAS-TOLEDO², E. CUEVAS-ROMERO², A. ORTEGA-SOTO³, F. CASTELÁN⁴, J. RODRÍGUEZ-ANTOLÍN²;

²Ctr. Tlaxcala Biología de la Conducta, ¹Univ. Autónoma De Tlaxcala, Tlaxcala, Mexico;

³Toxicología, Inst. Politécnico Nacional, México, Mexico; ⁴Inst. de Investigaciones Biomedicas, Univ. Nacional Autónoma De México, Tlaxcala, Mexico

Abstract:

Kidneys achieve the elimination of toxic substances from the organism. In this process, they also have to reabsorb important molecules that include glucose. Glucose uptake can be done through up to 14 glucose transporters (GLUTs) expressed in kidneys. One member of this family is the GLUT4 that is located in a specialized tubulovesicular compartment located beneath the plasma membrane. As a response to insulin, this reservoir of GLUT4 is then available to be recruited to the cell surface to raise glucose uptake. The consumption of sugary drinks has been associated with metabolic diseases including type 2 diabetes mellitus that is linked to renal failure. The aim of our present study was to determine whether the consumption of sugared water during pregnancy and lactation alters the expression of GLUT4 in the kidney of adult male offspring. We used female rats that mated and divided in a control group fed with a standard diet and tap water, and the experimental group fed with standard diet and 5% sucrose diluted in tap water (sugared water). At weaning, the two male rats were randomly selected per litter; one of them had free access to simple water while the other had free access to the sugared water. Male rats were sacrificed at four months old and the expression of GLUT4 in the left kidney was analyzed. In contrast to the group that consumed plain water, we observed that consumption of sugared water caused a GLUT4 overexpression



Renal expression of aquaporin 2 in the offspring of rats that consumed sugared water during pregnancy and lactation

Velázquez-Orozco Verónica¹, Castelán Francisco², Ortega-Soto Arturo³, Rodríguez-Antolín Jorge⁴

¹Doctorado en ciencias biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala. ²Universidad Nacional Autónoma de México. ³Departamento de toxicología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados. ⁴Centro Tlaxcala Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala.

The physiology of the urinary tract achieves the elimination of toxic substances from the organism, particularly in the kidneys. There are several types of aquaporins (AQPs), fourteen described until now, distributed in different parts of the organism. Some of them (1,2,3,4,6,7 and 8 AQPs) are differentially expressed along the kidney and are highly relevant for the water transport across the renal tubules. Particularly, AQP2 is located on the collecting duct where the urine will be diluted or concentrated because of the function of Antidiuretic hormone (ADH). The ADH link up with its specific receptor in principal cells, triggers the trafficking of AQP2 to the apical membrane to permit the water passage. When this process is altered, the organism can present a wide range of renal injuries. The high consumption of sugared drinks have been related with metabolic diseases, including type 2 diabetes mellitus that is linked to renal failure. The aim of this project is to determine whether the consumption of sugared water during the pregnancy and lactation, alters the expression of the aquaporin 2 in the kidney of adult male offspring. We use females rats that are mated and divided in a control group fed with standard diet and tap water, and the experimental group fed with standard diet and 5% sucrose diluted in tap water (sugared water). At weaning, two male rats were randomly selected per litter; one of them has free access to simple water while the other has free access to the sugared water. The male rats are sacrificed at four months old and the expression of aquaporin 2 of the left kidney and is analyzed by immunohistochemistry and western blot. Opposite the group that consumed plain water during the experiment with the group that consumed sugared water during pregnancy, lactation and postnatal life, preliminary results show an overexpression of aquaporin 2 in the last group. It seems that the consumption of sugared water, even in low concentration, modifies the renal expression of aquaporin 2. This could be directly related to water transport in the renal tubules altering the function of the upper urinary tract.