

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

El estrés crónico variable afecta la concentración sérica de corticosterona y aldosterona causando mayor daño renal en ratas jóvenes que adultas

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Eliut Pérez Sánchez

Director

Dra. Leticia Nicolás Toledo

Tlaxcala, Tlax

Agosto 2023



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

El estrés crónico variable afecta la concentración sérica de corticosterona y aldosterona causando mayor daño renal en ratas jóvenes que adultas

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Eliut Pérez Sánchez

Comité Tutorial

Dra. Leticia Nicolás Toledo
Dra. Ida Soto Rodríguez
Dra. Estela Cuevas Romero
Dr. Omar Elind Arroyo Helguera

Tlaxcala, Tlax

Agosto 2023

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Bioquímica y Metabolismo en las instalaciones del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, Unidad Periférica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través del apoyo recibido de la beca CONACyT 266814 y el apoyo al proyecto de investigación (287762) de la Dra. Leticia Nicolás Toledo.



Universidad
Autónoma de
Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas
Coordinación de la División de Ciencias Biológicas
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado

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 **Eliut Pérez Sánchez** realiza para la obtención del grado de **Doctor 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 **“El estrés crónico variable afecta la concentración sérica de corticosterona y aldosterona causando mayor daño renal en ratas jóvenes que adultas”**.

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
TLAXCALA, TLAX., A 11 DE AGOSTO DEL 2023

DR. OMAR ARROYO HELGUERA

DRA. ESTELA CUEVAS ROMERO

DR. JORGE RODRÍGUEZ ANTOLÍN

DRA. SENOBIA ROSALÍA CRUZ LUMBRERAS

DRA. CRISTHIAN NEFTALY SÁNCHEZ SOLÍS



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

**COMITÉ ACADÉMICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Sirva este medio para describir el proceso de revisión de la tesis titulada “**El estrés crónico variable afecta la concentración sérica de corticosterona y aldosterona causando mayor daño renal en ratas jóvenes que adultas**” realizada por el estudiante **Eliut Pérez Sánchez** para optar por su grado de **Doctor en Ciencias Biológicas**.

El documento de la tesis de **Eliut Pérez Sánchez** fue revisado por mí como directora de tesis antes de presentarse en cada examen tutorial y, posteriormente a los exámenes tutorales, 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 agosto, el documento final de la tesis fue procesado con el programa del Turnitin marcando poco texto con similitudes (13%). Los textos detectados con similitud están marcados en palabras técnica comúnmente utilizadas, redacción de resultados y la metodología, correspondiendo a lenguaje común por lo que esta similitud no podría ser considerada como plagio.

Por lo anterior, confirmo que el estudiante **no incurrió en ninguna práctica no deseable en la escritura de la tesis.**

Sin más por el momento, reciban atentos saludos.

CORDIALMENTE

Tlaxcala, Tlax., a 19 de agosto de 2023



Dra. Leticia Nicolás Toledo
Directora de tesis

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, Unidad Periférica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Un posgrado de calidad que se encuentra comprometido con la formación de los estudiantes.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo otorgado para cursar el posgrado en ciencias biológicas.

Agradezco ampliamente a la Dra. Leticia Nicolás Toledo, investigadora del centro Tlaxcala de biología de la conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, por la dirección de este proyecto de investigación. Agradezco su orientación y confianza en las actividades que he desarrollado durante mi estancia en el posgrado.

Agradezco las observaciones y críticas constructivas que el comité tutorial realizó al proyecto de investigación y a mi formación como estudiante del doctorado en ciencias biológicas. Cada uno aporta aspectos muy valiosos para fortalecer esta investigación y mi formación.

Resumen

El estrés se ha relacionado con el desarrollo de diversas patologías como obesidad, diabetes mellitus e hipertensión. Recientemente el estrés crónico se ha relacionado con la enfermedad renal. En humanos el estrés crónico provoca una transición rápida por los estadios de la enfermedad renal hasta llegar a la falla renal. En modelos animales, el estrés crónico por restricción de movimiento en ratas jóvenes provoca reducción del peso y volumen renal, mayor relación cortico medular, menor volumen, menor cantidad de corpúsculos, daño tubular, mayor expresión de la acuaporina 2 e hiperaldosteronismo. Se desconoce si aumenta la concentración de corticosterona con un modelo de estrés crónico por restricción de movimiento. Las ratas en un tiempo de 15 a 30 días pueden adaptarse a este tipo de estrés. En las ratas adultas se ha descrito que el estrés crónico por restricción de movimiento provoca reducción en el número de corpúsculos y menor volumen glomerular. Por lo anterior, las ratas jóvenes tienen mayor cantidad de alteraciones en comparación con los adultos. Sin embargo, hay escasa información acerca de quién es el más afectado si los jóvenes o los adultos. También no sabemos cómo el estrés crónico afecta al riñón con la presencia de ambas hormonas. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo es comparar los efectos de la aldosterona y corticosterona inducidas por estrés crónico variable en la estructura y función renal de ratas macho jóvenes y adultos. Para lograr nuestro objetivo formamos un grupo de ratas jóvenes y un grupo de ratas adultas. Para las ratas jóvenes formamos tres subgrupos: ratas macho jóvenes sin estrés crónico variable durante todo el experimento (Control, n= 7-8), ratas macho jóvenes sometidas a estrés crónico variable durante las últimas 2 semanas del segundo mes (JE2, n=8), ratas macho jóvenes sometidas a estrés crónico variable durante 4 semanas del segundo mes (JE4, n=7-8). Para los adultos se formaron 3 subgrupos de ratas adultas: ratas macho adultas sin estrés crónico variable durante todo el experimento (Control, n= 7-8), ratas macho adultos sometidos a estrés crónico variable durante las últimas 2 semanas del tercer mes (AE2, n=8), ratas macho adultas sometidas a estrés crónico variable durante 4 semanas del tercer mes (AE4, n=8). El modelo de estrés crónico variable consiste en implementar un estímulo estresante cada día sin repeticiones durante una semana con diferentes horarios. Al finalizar la aplicación del estrés crónico variable se recolectó orina de 12 horas previas al sacrificio para medir creatinina y sodio urinario. Después las ratas se sometieron a anestesia y fueron decapitadas para obtener sangre del tronco separar el suero

para determinar creatinina, aldosterona y corticosterona. Se extrajo el riñón derecho para realizar la histomorfometría e identificar fibrosis e inflamación renal. El riñón izquierdo se usó para determinar la cantidad de triglicéridos y estrés oxidativo renal. Observamos en ratas jóvenes con 4 semanas de estrés crónico variable (JE4) provoca daño tubular, glomeruloesclerosis, fibrosis tubulointersticial, inflamación renal, hiperaldosteronismo y no se incrementó la concentración de corticosterona sérica. Estos hallazgos indican que son efectos tardíos del estrés crónico variable ya que no observamos cambios en ratas jóvenes con estrés crónico variable de 2 semanas (JE2). En los adultos sometidos a estrés crónico variable durante 2 semanas (AE2) observamos daño tubular, fibrosis tubulointersticial, mayor acumulación de colágeno en los glomérulos renales, mayor acumulación de triglicérido renales y estrés oxidativo. Los resultados en ratas adultas muestran efectos tempranos del estrés crónico variable ya que se observaron menos cambios en ratas adultas con estrés crónico variable de 4 semanas (AE4). En conclusión, el estrés crónico variable provoca hiperaldosteronismo, pero no incrementó la concentración de corticosterona sérica. El daño renal es más severo en ratas jóvenes que en adultas. Las ratas adultas tienen capacidad de adaptarse al estrés y recuperarse del daño que provoca el estrés crónico variable. El daño que se produce en ratas jóvenes es de forma tardía mediante la acción de la aldosterona e inflamación renal. Mientras que en los adultos el daño renal se presenta de forma temprana mediado por el estrés oxidativo. En ambos grupos, el estrés crónico variable se vuelve un factor de riesgo silente ante el desarrollo de la enfermedad renal crónica.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Estructura renal.....	1
1.2 Fisiología renal	2
1.3 Desarrollo embrionario del riñón	3
1.4 Nefrogénesis	4
1.5 Desarrollo posnatal del riñón.....	4
1.6 Enfermedad renal crónica en pediátricos y adultos	5
1.7 Estrés crónico en pediátricos y adultos.....	7
1.8 Eje hipotálamo hipófisis adrenal y función renal	9
1.9 Progresión del daño renal	9
2. ANTECEDENTES	11
1.10 Modelo de estrés crónico variable	11
1.11 Estrés crónico y daño renal en la rata macho joven y adulta.....	12
1.12 Efecto de la aldosterona y corticosterona en el daño renal.....	13
1.13 Receptores a mineralocorticoides y glucocorticoides en el riñón	14
1.14 Inflamación mediada por aldosterona y corticosterona.....	15
1.15 Fibrosis en el riñón	16
1.16 Estado oxidativo	17
1.17 Estado redox en el riñón	19
3. JUSTIFICACIÓN.....	20
4. HIPÓTESIS	21
5. OBJETIVOS.....	21
1.18 Objetivo general	21
1.19 Objetivos específicos.....	21
6. METODOLOGÍA	22
1.20 Diseño del experimento	22
1.21 Estímulo de estrés crónico variable	22
1.22 Obtención de muestras sanguíneas, orina y riñón	24
1.23 Determinación de corticosterona	25
1.24 Determinación de aldosterona	25
1.25 Determinación de creatinina y sodio	25
1.26 Análisis histológico	26
1.27 Determinación de triglicéridos en tejido renal	27
1.28 Extractos de riñón para la prueba de TBARS y actividad enzimática.....	28
1.29 Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.....	28
1.30 Actividad de catalasa.....	28
1.31 Actividad de superóxido dismutasa.....	29
1.32 Capacidad antioxidante total	29

1.33	Inmunohistoquímica	29
1.34	Wester blot.....	30
1.35	Análisis estadístico	31
7.	RESULTADOS	32
1.36	Efecto inmediato y tardío del estrés crónico variable sobre la concentración sérica de corticosterona y aldosterona en ratas jóvenes	32
1.37	Efecto inmediato y tardío del estrés crónico variable sobre parámetros de crecimiento, alimentación y peso del riñón en jóvenes	32
1.38	Efecto inmediato y tardío del estrés crónico variable sobre los parámetros de la función renal en ratas jóvenes.....	34
1.38.1	Concentración de creatinina sérica y urinaria.....	34
1.38.2	Concentración de sodio urinario.....	34
1.39	Efecto inmediato y tardío del estrés crónico variable sobre la histomorfometría renal en ratas jóvenes.....	36
1.39.1	Corpúsculos	36
1.39.2	Glomérulos	36
1.39.3	Cápsula de Bowman	36
1.39.4	Túbulo contorneado proximal.....	36
1.39.5	Fibrosis renal	36
1.40	Efecto inmediato y tardío del estrés crónico variable sobre el daño tubular en la corteza y médula renal de ratas jóvenes.....	39
1.40.1	Corteza renal de ratas jóvenes	39
1.40.2	Médula renal de ratas jóvenes.....	39
1.41	Efecto inmediato y tardío del estrés crónico variable sobre el daño corpuscular de ratas jóvenes.....	42
1.42	Efecto inmediato y tardío del estrés crónico variable sobre la concentración de triglicéridos renales y estrés oxidativo.....	44
1.42.1	Triglicéridos renales	44
1.42.2	Estrés oxidativo	44
1.43	Efecto inmediato y tardío del estrés crónico variable sobre presencia de TNF- α como indicador de inflamación en el riñón	45
1.44	Efecto inmediato y tardío del estrés crónico variable sobre parámetros de crecimiento, alimentación y peso del riñón en ratas adultas.....	47
1.45	Efecto inmediato y tardío del estrés crónico variable sobre los parámetros de la función renal en ratas adultas.....	47
1.46	Efecto inmediato y tardío del estrés crónico variable sobre la histomorfometría renal en ratas adultas.....	47
1.46.1	Corpúsculos	47

1.46.2	Glomérulos	47
1.46.3	Cápsula de Bowman	47
1.46.4	Túbulo contorneado proximal.....	49
1.46.5	Fibrosis renal	49
1.47	Efecto inmediato y tardío del estrés crónico variable sobre el daño tubular en la corteza y médula renal de ratas adultas.....	52
1.47.1	Corteza renal de adultos.....	52
1.47.2	Médula renal de adultos.....	52
1.48	Efecto inmediato y tardío del estrés crónico variable sobre el daño corpuscular de ratas adultas.....	55
1.48.1	Triglicéridos renales	57
1.48.2	Estado antioxidante y estrés oxidativo	57
1.49	Efecto inmediato y tardío del estrés crónico variable sobre presencia de TNF- α como indicador de inflamación en el riñón	58
8	DISCUSIÓN.....	59
9	CONCLUSIÓN	63
10	PERSPECTIVAS	64
11	REFERENCIAS	65
12	GLOSARIO.....	73
13	ANEXOS.....	74
	a. Anexo 1. Protocolo de tinción de tricrómica de Masson	74
	b. Anexo 2. Protocolo de tinción ácido periódico de Schiff	75
14	PUBLICACIONES	76

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Estructura renal

El riñón de la rata es un órgano de color marrón rojizo, el riñón derecho es más coronal que el riñón izquierdo. El riñón está rodeado por una cápsula fibrosa que lo mantiene en su lugar, en el centro lateral se encuentra el hilio renal por donde ingresan una arteria, una vena renal y salen los uréteres. En la estructura interna del riñón se localizan la corteza, médula y papila renal. La médula renal se divide en externa e interna. La médula renal externa se divide en una línea medular externa y en una línea medular interna (Seely y cols. 2018). La unidad anatomofuncional del riñón es la nefrona, hay aproximadamente de 30 a 35 mil nefronas en el riñón de una rata adulta. Las nefronas se clasifican, con base en su localización dentro de la corteza, en superficiales, corticales medias y yuxtamedulares. También se clasifican en nefronas con asa de Henle corta y larga. El asa de Henle corta se interna en la médula renal externa hasta la línea medular interna y posteriormente retornan con dirección a la corteza renal. El asa de Henle larga alcanza lo profundo de la médula interna y retorna a la corteza renal (Seely y cols. 2018). La nefrona está formada por un corpúsculo renal y una red tubular. La red tubular se conforma por el túbulo contorneado proximal (porción contorneada y porción recta), asa de Henle (porción descendente y ascendente) y túbulo contorneado distal. El corpúsculo renal está formado por la cápsula de Bowman que rodea al glomérulo renal (capilares glomerulares), entre la cápsula de Bowman y los capilares glomerulares se encuentra el espacio capsular. La sangre ingresa a los capilares glomerulares por la arteriola aferente y sale por la arteriola eferente. El túbulo contorneado proximal se encuentra continuo al corpúsculo renal, está formado por un epitelio cúbico simple con microvellosidades en la membrana apical. Este túbulo tiene diferentes segmentos llamadas P1, P2 y P3. La fracción P1 y P2 se encuentran en la corteza renal, mientras que la región P3 se encuentra en la línea externa de la médula renal externa (Christensen y cols. 2014). El asa de Henle contiene una parte descendente delgada (formada por epitelio plano simple) y una ascendente gruesa (epitelio cilíndrico bajo). El túbulo contorneado distal se encuentra en la corteza renal está formado por epitelio cúbico simple sin borden cepillo, esto es lo que lo diferencia del túbulo contorneado proximal. La estructura tubular de la nefrona se conecta a los túbulos colectores, conformados por células principales e intercaladas (epitelio cilíndrico simple) mediante una

estructura tubular llamada túbulo conector que es continuo al túbulo contorneado distal. Un túbulo colector drena aproximadamente a 6 nefronas, estos túbulos se dirigen a la papila renal donde convergen en los conductos papilares, aproximadamente 20 conductos papilares convergen en la papila renal y desembocan en la pelvis renal (Seely y cols. 2018).

1.2 Fisiología renal

El riñón es un órgano que tiene múltiples funciones en el organismo, una de ellas es eliminar las sustancias de desecho que se generan por el metabolismo celular. La nefrona lleva a cabo esta función mediante tres mecanismos: filtración, reabsorción y secreción tubular. La filtración renal se lleva a cabo en el corpúsculo renal, específicamente en los capilares corpusculares. Estos capilares tienen tres membranas que permiten la filtración selectiva del plasma sanguíneo y sus componentes. La primera es la membrana epitelial con poro de filtración, la segunda es la membrana basal del glomérulo y la tercera es la membrana con hendiduras de filtración entre los pedicelos de los podocitos. Para que la filtración sea efectiva, se requiere mantener una diferencia de presiones entre la luz de los capilares glomerulares de los corpúsculos y el espacio capsular (Ogobuiro y Tuma 2019). La reabsorción tubular consiste en regresar selectivamente a la circulación los compuestos filtrados en el corpúsculo. Las células tubulares se encargan de reabsorber dichos compuestos hacia el intersticio y después hacia los capilares peritubulares. La secreción se realiza en los túbulos renales con dirección contraria a la reabsorción, es decir, de los capilares peritubulares a la luz del túbulo renal, mediante mecanismos de transporte celular (Ogobuiro y Tuma 2019). Las funciones mencionadas anteriormente son controladas por factores, tanto físicos como químicos, que mantienen la homeostasis del riñón. La aldosterona controla la homeostasis del sodio, potasio y la presión arterial; mientras que, la resistencia periférica mantiene la diferencia de presión entre el corpúsculo y el espacio capsular. La angiotensina controla la velocidad de filtración en el corpúsculo renal, entre otros (Zeidel y cols. 2014).

1.3 Desarrollo embrionario del riñón

En los mamíferos, el desarrollo del riñón involucra tres estadios: pronefros, mesonefros y metanefros. Los estadios pronefros y mesonefros son transitorias del desarrollo renal, hasta su diferenciación adulta como metanefros. El riñón deriva del mesodermo intermedio, por la interacción del conducto epitelial de Wolff y el mesénquima metanéfrico. La yema ureteral invade a la mesénquima renal y comienza a ramificarse e induce la nefrogénesis. La transición de mesénquima a epitelio y la inducción de la morfogénesis forman las nefronas (Pietilä y Vainio 2014).

En la rata, el pronefros es un conjunto de conductos que aparecen en el día 11 de gestación. Los conductos se dirigen en dirección caudal y desembocan en la cloaca. Cuando los conductos caudales se desarrollan se pierden los conductos cervicales. Este arreglo aún no es funcional en animales superiores, pero es la base para formar el conducto de Wolff. Éste es la base donde se inducirá el desarrollo del mesonefros (Zweyer 2010). El mesonefros se forma en el día 12 de gestación. En esta fase, el conducto de Wolff se alarga hacia abajo para unirse con el seno urogenital. El seno urogenital se diferencia en la vejiga urinaria y un divertículo fuera del conducto de Wolff se transforma en la yema ureteral. Finalmente, el metanefros aparece cuando el mesonefros retrocede y la yema ureteral se ramifica dentro del blastema metanefrogénico (también llamado masa metanéfrica del mesodermo intermedio). Cada ramificación representa una nefrona, por lo que la yema ureteral tiene un papel importante para la morfogénesis, la formación del número total de nefronas, la formación de estructuras como los conductos colectores, pelvis renal y uréteres (Seely 2017). En resumen, se pueden distinguir tres procesos en el desarrollo del metanefros. El primero es el establecimiento del blastema metanefrogénico, el segundo es la ramificación de la yema ureteral y por último la transformación del blastema metanéfrico en células renales y diferenciación tubular (Zweyer 2010).

1.4 Nefrogénesis

Durante el desarrollo del metanefros, la formación del riñón consta de dos estructuras: el blastema metanefrogénico y la yema ureteral. La nefrogénesis se induce por el factor neurotrófico derivado de la glía, producido por la mesénquima metanéfrico. Este factor induce el crecimiento de la yema ureteral. Tras el incremento de este factor neurotrófico, se forma una capucha de células denominado blastema metanefrogénico en la punta de la yema ureteral (Seely 2017). La yema ureteral se ramifica en dirección cefálica, dentro del blastema metanefrogénico para originar los uréteres, pelvis renal, cálices y túbulos colectores. El blastema metanefrogénico forma pequeñas vesículas en forma de coma y después de S. Posteriormente, esta estructura comienza a epitelizarse y alargarse para dar lugar a la formación de los túbulos primitivos de la nefrona. En la punta de la estructura en forma de S se hace una dilatación que dará lugar a la cápsula de Bowman. Más tarde, ésta estructura será vascularizada por prolongaciones de la aorta media para formar el glomérulo. Al mismo tiempo, un grupo de células viscerales y epiteliales tienen contacto entre sí para formar la barrera de filtración, de lo que será el corpúsculo maduro. Finalmente, un grupo de células derivadas del blastema metanefrogénico quedan intactas, sin epitelización, que darán lugar a las células intersticiales y vasculares. La nefrogénesis continua y culmina hasta los día 11–15 después del nacimiento de la rata (Seely 2017).

En el blastema metanéfrico ocurre la transición de mesénquima a epitelio para la nefrogénesis temprana. La transformación a células epiteliales ocurre bajo el control de diferentes familias de genes y otras moléculas reguladoras. En estadios tempranos de la organogénesis renal, el control es generado por diferentes genes como son el WT-1, Pax-2, Wnt-4 y Bmp7. Estos son mediadores locales de señalización e interacción entre la yema ureteral y el blastema nefrogénico (Chai y cols. 2013).

1.5 Desarrollo posnatal del riñón

En los roedores, la capacidad fisiológica del riñón es inmadura cuando nacen. La médula renal es la más inmadura. En el día 2 posnatal, se observa abundante intersticio y algunos islotes de células tubulares. En el día 7 posnatal, hay mayor organización de las

células intersticiales y los túbulos tienen mayor tamaño. Para el día 28-30 posnatal, la médula alcanza su desarrollo similar al de un adulto (Seely 2017). En el día 10 posnatal, las nefronas aún son inmaduras y sigue visible la vesícula ureteral de la que derivaron. En el día 15 posnatal ya no se observa la vesícula ureteral y al destete en el día 21 posnatal, la zona cortical esta morfológicamente igual a la de un adulto. El tamaño de la corteza incrementa significativamente desde el día 30 hasta el día 70 de vida. El aumento del tamaño del riñón es temporalmente diferente para cada zona renal. La corteza y la papila adquieren la apariencia morfológica del riñón adulto antes que la médula. En consecuencia, la médula permanece con mayor grado de inmadurez entre las zonas renales, durante un período posnatal relativamente largo (El-Bestawy y cols. 2017).

1.6 Enfermedad renal crónica en pediátricos y adultos

La enfermedad renal crónica en niños de 0 a 4 años es de origen hereditario como malformaciones congénitas del riñón y tracto urinario. En niños de 5 a 14 años, las principales causas son el síndrome nefrótico, enfermedades sistémicas, malformaciones congénitas del riñón y del tracto urinario. En adolescentes de 15 a 19 años, la enfermedad renal crónica afecta principalmente al glomérulo. Las enfermedades congénitas y hereditarias son menos frecuentes (Collins y cols. 2014). Las causas de la enfermedad renal crónica en adultos son debido al padecimiento de enfermedades crónico-degenerativas. En México existe información limitada de la epidemiología de la enfermedad renal crónica en pediátricos. En 2009, reportaron un porcentaje de proteinuria de 16.1 % y hematuria de 17.5 % en una población menor de 18 años del Estado de Jalisco (Koshy y cols. 2009). En el Estado de Tlaxcala, se ha descrito una prevalencia de 4 casos por cada 100 habitantes pediátricos (Ortega-Romero y cols. 2019). Estas prevalencias son altas en comparación con prevalencia europeas de la enfermedad renal crónica donde se reportan 55 – 60 por millón de habitantes ajustado por edad (Becherucci y cols. 2016). Se ha iniciado una exploración más amplia de los factores de riesgo relacionados con el ambiente que predisponen al desarrollo de la enfermedad renal crónica en pediátricos (Becherucci y cols. 2016), debido a que en los niños que desarrollan enfermedad renal crónica terminal tienen un aumento de mortalidad entre 30 a 50 veces más alto que la media general para toda la población. Los niños con enfermedad

renal crónica tienen mayor probabilidad de progresar a la terapia de remplazo renal durante la adolescencia, porque el riesgo de progresión es de 14% en la primera década de vida. En la segunda década de vida el riesgo aumenta a 51.8%. Lo anterior muestra que la sensibilidad ante la progresión de la enfermedad renal crónica en pacientes pediátricos es mayor que en la población general (Kaspar y cols. 2016).

En adultos, la enfermedad renal crónica se considera un problema de salud pública en el mundo. Las principales causas de enfermedad renal crónica en la población adulta son diabetes mellitus tipo II e hipertensión arterial. La prevalencia global de la enfermedad renal crónica se estima en 13.4 % con variaciones en diferentes regiones del mundo (Hill y cols. 2016, Romagnani y cols. 2017). Ha sido reportado que la enfermedad renal crónica en personas de 18 a 44 años es de 6.0 %, mientras que en mayores de 65 años es de 38.1 %. También las tasas de mortalidad han incrementado principalmente en países subdesarrollados. En México, hasta el 2015, la mortalidad por enfermedad renal crónica incrementó un 108 % desde 1990. En la población adulta las tasas de mortalidad más altas se encuentran en las edades entre 45 – 75 años (Torres-Toledano y cols. 2017). En personas mayores de 45 años, el incremento en la mortalidad indica que, la enfermedad renal crónica avanza rápidamente a enfermedad renal terminal y la muerte (Benjamin y Lappin 2021). En adultos, los principales factores de riesgo que promueven la progresión de la enfermedad renal crónica son hipertensión, proteinuria y anemia. Otros factores de riesgo reportados son hiperuricemia, exposición a metales pesados, hiperlipidemias, acidosis metabólica, estrés oxidativo y desorden del metabolismo mineral, sin embargo, se requiere mayor investigación para clarificar estos factores (Staples y Wong 2010). La enfermedad renal crónica está definida por el daño renal y/o la disminución de la filtración renal persistente (Romagnani y cols. 2017). La valoración del daño renal se realiza mediante la medición de marcadores de daño renal como la albuminuria, anormalidades electrolíticas por desórdenes tubulares o anormalidades estructurales detectadas por histología o imagenología, que persistan por más de 3 meses. La proteinuria en pacientes con enfermedad renal crónica es un indicador eficiente de daño renal. Éste es un factor de riesgo para la progresión de la enfermedad renal crónica (Bakkum y cols. 2019).

Las causas principales de la enfermedad renal crónica son distintas para jóvenes y adultos. La presencia de factores de riesgo para desarrollar enfermedad renal crónica, pueden

estar presentes desde edades muy tempranas. Además, el estilo de vida durante la infancia y adolescencia pueden precipitar, de forma rápida, el desarrollo de la enfermedad renal. La programación temprana del desarrollo renal y de la enfermedad renal crónica están influenciados en edades tempranas del desarrollo por algunos factores maternos (consumo de alcohol, insuficiencia uteroplacentaria, hipertensión materna, exposición a glucocorticoides, uso de drogas y diabetes gestacional), fetales (alteración en el sistema renina angiotensina aldosterona, alteración de los transportadores de sodio, actividad simpática alterada, y sensibilidad a corticoides (Tain y Hsu 2017) y posnatales tempranos (Bajo peso al nacer, nacimiento pretérmino, desnutrición, obesidad infantil, diabetes mellitus tipo I, deficiencia de vitamina A) (Puddu y cols. 2009). En la adolescencia también encontramos factores de riesgo que predisponen al individuo a mayor riesgo de desarrollar enfermedad renal crónica como hipertensión, sobrepeso, obesidad, dislipidemias, dieta y actividad física (Stern-Zimmer y cols. 2021). Por otro lado, los principales factores de riesgo en la adultez son padecer obesidad, diabetes mellitus tipo II, hipertensión, ascendencia afroamericana, pertenecer a un estrato socioeconómico bajo entre otros. La exposición a estos efectos adversos aumenta el riesgo de desarrollar enfermedad renal crónica en la adultez (Correia-Costa y cols. 2019). Existe información limitada que explique si los niños tienen mayor susceptibilidad al daño renal que los adultos. A este respecto, se sabe que los pacientes pediátricos expuestos a factores adversos en etapas tempranas del desarrollo pueden tener mayor susceptibilidad de enfermedad renal, por ejemplo, el bajo peso al nacer disminuye el número de nefronas en el riñón, lo que contribuye a la hiperfiltración glomerular, proteinuria y enfermedad renal crónica (Stern-Zimmer y cols. 2021).

1.7 Estrés crónico en pediátricos y adultos

El estrés no se considera como un estado patológico, por lo tanto, no es posible contar con la epidemiología. Mantener un constante estímulo estresante puede provocar efectos deletéreos en la salud de los individuos. El estrés crónico es mantener un estímulo constante sobre el eje hipotálamo pituitaria adrenal y el eje simpático adreno-medular. Los principales factores que promueven la estimulación de estos ejes en pediátricos son primero: experiencias extremas como el abuso, negligencia y estresores más prevalentes como la

pobreza, inseguridad alimentaria, violencia interpersonal, enfermedad mental parental, racismo, discriminación, estancias inestables en casas hogar y violencia social (Condon 2018). El estrés crónico provoca patologías como los desórdenes de ansiedad, el cual afecta del 10 al 20 % de los niños y es la psicopatología infantil más prevalente. La ansiedad también está asociada con la depresión, abuso de sustancias, interfiere con la conducta social y función familiar. En adolescentes mexicanos de 12 a 17 años se estima que el 40 % de ellos padece alguna enfermedad mental. Los desórdenes de ansiedad son los más reportados (Gallegos y cols. 2012). Otro efecto estudiado desde hace muchos años es la falla para crecer en niños que se encuentran en hogares con circunstancias estresantes severas (violencia, abuso, disfuncionalidad familiar, etc.). Se observa que presentan disminución de la hormona del crecimiento e incremento del IGF-1 (factor de crecimiento parecido a la insulina de tipo I) con desarrollo de conducta de hiperfagia y polidipsia sin aumento de la talla o peso corporal. Estos datos clínicos desaparecen cuando al niño se remueve del hogar estresante, reinicia su crecimiento y desarrollo (Mousikou y cols. 2021, Skuse y cols. 1996). Por lo tanto, mantener un estado estresante en esta etapa de la vida podría considerarse como un efecto adverso en una ventana crítica del desarrollo y aumentar la susceptibilidad a padecer enfermedades crónicas y afectando procesos neurológicos, inmunológicos, metabólicos, modificando al sistema cardiovascular, respiratorio y antropometría de los pediátricos que alcanzarán la edad adulta (Condon 2018).

Los eventos estresantes crónicos en los adultos son diversos dependiendo del ambiente en donde se encuentren. Algunos de ellos son el abuso conyugal e infantil, historia de eventos traumáticos pasados, ambientes laborales estresantes y migración. El estrés en los adultos es un factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares (Satyjeet y cols. 2020), síndrome metabólico (Kuo y cols. 2019) y deterioro de salud en general (Kaestner y cols. 2009). El estrés está asociado a trastornos de depresión y ansiedad. En México, los desórdenes de ansiedad son los más prevalentes en los adultos. Después de éste, los desórdenes afectivos y de abuso de sustancias son los problemas de salud mental (Gallegos y cols. 2012). En México, los desórdenes depresivos en hombres de 15 a 49 años incrementaron la prevalencia un desde 1990 (2.65 %) hasta el 2019 (3.11 %). Para los trastornos de ansiedad en el mismo grupo se observó un incremento desde 1990 (2.59%) hasta 2019 (3.27%) (IHME 2019).

1.8 Eje hipotálamo hipófisis adrenal y función renal

El eje hipotálamo-hipófisis-adrenal es conocido como el eje del estrés. La activación desencadena una serie de cambios fisiológicos y conductuales para recuperar la homeostasis. El proceso inicia en las neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo, que sintetizan la hormona liberadora de la corticotropina (CRH) y vasopresina (AVP). Estas neuronas se proyectan hasta la eminencia media y liberan CRH y AVP al plexo portal hipofisiario. Estas hormonas llegan a los corticotropos de la pituitaria anterior. La CRH se une a receptores de tipo 1 de la hormona liberadora de la corticotropina (CRHR1), modificando la transcripción del gen de la proopiomelanocortina (POMC). La prohormona convertasa 1 escinde a POMC en beta-lipotropina y la hormona adrenocorticotropa (ACTH). La CRH promueve la liberación de ACTH. La AVP actúa sinérgicamente con CRH para estimular la liberación de ACTH, pero es insuficiente para estimular la liberación por sí misma (Gallo-Payet y cols. 2017).

En la glándula adrenal, la ACTH se une a receptores de la melanocortina 2 (MCR2), estimulando específicamente la zona fasciculada y la zona de la glomerulosa en la glándula adrenal. Ante este estímulo, se sintetiza corticosterona y aldosterona, respectivamente (Gallo-Payet y cols. 2017). La principal acción de la aldosterona en el riñón es el control en la excreción de potasio y reabsorción de sodio (Katsu y Iguchi 2016, Niebyski y cols. 2012). La aldosterona tiene como principal función mantener el balance hídrico y mineral del organismo. La corticosterona tiene efectos intra renales: el incremento del flujo sanguíneo renal y de la tasa de filtrado glomerular, y promoción de la nutriuresis, kaliuresis, excreción acida renal y alcalosis. Esta tiene efectos extra renales: incrementa la presión arterial y favorece la producción de vasopresina y adrenalina (Hunter y cols. 2014).

1.9 Progresión del daño renal

Existen diferentes causas para la enfermedad renal crónica, las más prevalentes para adultos son diabetes e hipertensión (Torres-Toledano y cols. 2017). Para los niños son las malformaciones congénitas del riñón y vías urinarias (Becherucci y cols. 2016). En un intento por recuperar la función renal, se activan mecanismos de reparación. En los túbulos del riñón

se lleva a cabo la activación celular, inflamación, síntesis de matriz extracelular y cambios metabólicos en las células (Schnaper 2017). Alteraciones en la activación celular puede provocar una reacción exagerada o paupérrima. Ante la mala adaptación, las células tubulares epiteliales provocan un panorama oxidativo, inflamatorio y fibrótico. Este efecto es progresivo, es decir, pueden alcanzar y activar a otras células epiteliales tubulares provocando la pérdida de nefronas. La pérdida de nefronas provoca la disminución de la tasa de filtrado glomerular. Las nefronas remanentes deben aumentar la carga de trabajo mediante la hiperfiltración glomerular. Éste es un mecanismo compensador que provoca daño a las membranas de filtración corpuscular y a largo plazo, provoca daño corpuscular progresivo en las nefronas remanentes. La pérdida progresiva de nefronas provoca la disminución de la tasa de filtrado glomerular (Schnaper 2014). La hemodinamia en el riñón está estrechamente relacionada con la función de filtración corpuscular. El incremento de la presión arterial tiene influencia en el incremento de la filtración del glomérulo renal causando proteinuria y la presencia de fibrosis glomerular focal y segmentaria (Chagnac y cols. 2019). La activación del sistema renina angiotensina aldosterona cumple una función reguladora de la presión arterial, principalmente, por aumento de la resistencia periférica, aumento de la reabsorción renal de sodio y un aumento del volumen circulante. La angiotensina y aldosterona promueven el inicio de la inflamación, estrés oxidativo y fibrosis renal (Yuan y cols. 2019). La proteinuria es un marcador de daño renal. De manera normal, la albúmina y otras proteínas grandes no atraviesan las membranas de filtración en el corpúsculo. La presencia de proteínas en la orina es considerado como un indicador del daño a dichas membranas (Machado y cols. 2012). La proteinuria promueve la inflamación tubular, mediante el incremento de la expresión de la proteína quimioatrayente de macrófago (MCP-1). Esta proteína es un inductor del daño tubular e inflamación intersticial (Zoja y cols. 2014). Otro hecho importante en el corpúsculo renal es la pérdida de los podocitos que resulta en glomeruloesclerosis focal y segmentaria. El daño generado a los podocitos es progresivo y puede propagarse a otros podocitos que en un inicio no fueron dañados (Nagata 2016). Los podocitos producen sustancias parecidas a la heparina que inhibe la proliferación de células mesangiales (Wang y cols. 2014).

2. ANTECEDENTES

1.10 Modelo de estrés crónico variable

El modelo de estrés crónico leve se ha usado para el estudio de la anhedonia durante la conducta depresiva en ratas. Katz y colaboradores (1981) sentaron las bases para el desarrollo de este modelo. Hoy en día, el modelo es conocido con diferentes nombres como estrés crónico variable, estrés crónico impredecible, estrés crónico leve impredecible, entre otros (Willner 2017). Consiste en someter a los animales a condiciones estresantes leves e impredecibles, para evitar que se adapten a las condiciones estresantes. Los protocolos difieren en el tipo y duración de los estímulos estresores (Frisbee y cols. 2015, Zeeni y cols. 2013). Se ha aplicado con mayor frecuencia en los estudios de la neurobiología y medicina tradicional. En general, el modelo es poco usado para comprender los efectos del estrés en tejidos periféricos (Willner 2017), pero si para evidenciar cuadros inflamatorios, cambios metabólicos e histológicos en la rata macho. La aplicación de este modelo induce marcadores inflamatorios del páncreas, hígado y sistémicos, en la rata macho de 3 meses de edad durante 20, 40 y 60 días (López-López y cols. 2016). Modifica indicadores séricos metabólicos y de conducta alimentaria en ratas de 8 a 10 semanas de edad por tres meses (Zeeni y cols. 2013) y en 5 semanas provoca inflamación colónica en ratas de 180 - 210 g (Wei y cols. 2019). Algunos de los estímulos estresantes de estos trabajos incluyen: nado forzado en agua fría con temperaturas que van desde 4°C hasta los 18 °C, nado forzado en agua caliente con temperatura de 28°C, exposición frío de 4°C y calor de 50°C, caja inclinada en 45°, restricción de alimento y agua que pueden ser desde 24h hasta 48h, derrota social, estrés ante un depredador, choques eléctricos en las patas, restricción del espacio en caja sucia y caja limpia, cama mojada, sustitución de la cama por agua, exposición a periodos cortos de luz durante el periodo oscuro, luz estroboscópica, entre otros (Zou y cols. 2019).

1.11 Estrés crónico y daño renal en la rata macho joven y adulta

Existe poca información en humanos que relacione directamente el estrés con el daño renal. El estrés se considera como un factor de riesgo para padecer otras enfermedades crónicas. El estrés crónico percibido es un predictor a largo plazo del diagnóstico de diabetes (Novak y cols. 2013) y síndrome metabólico (Garbarino y Magnavita 2015). En un estudio longitudinal en niños con síndrome nefrótico sensible a esteroides se ha mostrado que el estrés psicológico puede desencadenar proteinuria (Bakkum y cols. 2019).

Los modelos animales son importantes para estudiar los efectos del estrés crónico. En la rata, los efectos del estrés crónico por restricción de movimiento parece que están influenciado por la edad. En nuestro grupo de trabajo mostramos los efectos del estrés crónico por restricción de movimiento en ratas infantiles de 7 semanas de edad. Disminuye el peso renal, reduce el número de corpúsculos totales en el riñón, disminuye el porcentaje de corpúsculos grandes, provoca aumento de células mesangiales en glomérulos pequeño y aumenta la matriz mesangial. Aunque, no parece tener efecto en la estructura tubular. La función renal parece no afectarse ya que se reduce la concentración de creatinina sérica y aumenta la expresión de Acuaporina 2 (AQP-2), tanto en la médula como en la corteza (Sánchez-Solís y cols. 2018). Otro grupo de investigación aplicando el protocolo de restricción de movimiento durante 6 semanas en ratas infantiles de 10 semanas de edad, muestra efectos similares a nuestros hallazgos: se reduce el peso y el volumen renal, reduce la cantidad y el volumen glomerular (Marchon y cols. 2018). En las ratas adultas sometidas a estrés crónico por restricción de movimiento durante 1 mes observamos que en los corpúsculos aumenta la pérdida de glomérulos renales, se disminuye el área del glomérulo, corpúsculo renal, aumenta el porcentaje de corpúsculos que no tienen glomérulo. En cuanto a los túbulos observamos que se reduce el área del túbulo contorneado proximal, además, la estructura tubular se observa atrofiada con separación de la membrana basal, presencia de núcleos picnóticos y desaparece el epitelio tubular. También observamos que se disminuye la expresión de AQP-2 y se aumenta la concentración de aldosterona sérica (Sánchez-Solís y cols. 2020). En las ratas adultas, el estrés crónico por restricción de movimiento provoca la disminución en el número de glomérulos por riñón y volumen ocupado por los glomérulos en la corteza renal (Marchon y cols. 2018). Existe poca información acerca de cómo el estrés

provoca daño renal en edades tempranas del desarrollo y/o en la vida adulta, además no se han investigado los mecanismos por los que el estrés crónico provoca daño renal. En nuestro grupo de trabajo observamos que el estrés afecta de forma diferente a ratas infantiles y ratas jóvenes, además hemos asociado la aldosterona con el estrés y el daño al renal (Sánchez-Solís y cols. 2020). A pesar de estos cambios, no observamos modificación en la concentración de corticosterona sérica (Corona-Pérez y cols. 2017).

1.12 Efecto de la aldosterona y corticosterona en el daño renal

Algunas funciones del riñón están reguladas por hormonas, por ejemplo, la regulación de la excreción de agua y sodio. Para que el riñón cumpla con esta función requiere de la aldosterona. En modelos animales, la infusión de aldosterona en ratas machos adultas provoca proteinuria, glomeruloesclerosis, inflamación, fibrosis y daño oxidativo (Bernardi y cols. 2015, Martín-Fernández y cols. 2016). En cuanto a la estructura del riñón, la aldosterona incrementa la masa del riñón, aumenta el área tubular, área glomerular y matriz mesangial en un modelo de rata con uninefrectomía lateral (Bernardi y cols. 2015). En ratas deficientes de óxido nítrico se ha reportado la importancia de la acción de la aldosterona para inducir inflamación y fibrosis. Por otro lado, los receptores a mineralocorticoides pueden ser activados por glucocorticoides como la corticosterona. La enzima 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (11 β -HSD) evita esta activación de los receptores de mineralocorticoides por la corticosterona, por lo que la aldosterona es aún más activa (Suehiro y cols. 2015).

La acción de la aldosterona sobre el daño renal no se ha investigado ampliamente. La corticosterona tiene efectos importantes en el riñón. Su exceso en la médula renal es capaz de producir hipertensión cuando se inhibe la actividad de la enzima 11 β hidroxiesteroide deshidrogenasa 2 (11- β HSD 2) con carbexonolona (Usa y cols. 2007). El riñón expresa 11- β hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 (11- β HSD 1), siendo diferente en cada región del riñón. En la región cortical y la médula externa hay mayor expresión de la 11- β HSD 2, mientras que en la región medular externa y la interna se expresa más la 11- β HSD 1. Esto podría indicar que la médula tiene funciones que son dependientes de glucocorticoides. La cantidad de corticosterona que observamos de forma local, en la región medular no necesariamente indica un incremento de la corticosterona sérica. Por lo que, los efectos

pueden ser locales (Usa y cols. 2007). Los glucocorticoides pueden provocar daño renal de forma indirecta. La administración de glucocorticoides tiene influencia sobre el sistema cardiovascular. En la rata, la administración de corticosterona incrementa la presión arterial, posiblemente debido al incremento de la reabsorción de sodio y agua en los túbulos del riñón (Hattori y cols. 2013).

1.13 Receptores a mineralocorticoides y glucocorticoides en el riñón

La aldosterona y corticosterona ejercen su acción mediante los receptores a mineralocorticoides (MR) y glucocorticoides (GR) respectivamente. Estos receptores están formados por 3 dominios principales. El dominio N-terminal de transactivación (NTD), contiene una función con poder de activación transcripcional (AF1), que interactúa con corre reguladores y la maquinaria transcripcional basal. El dominio de unión al DNA (DBD) es la región más conservada de la familia de receptores nucleares. Contiene 2 dominios con dedos de zinc que reconocen y se unen a secuencias específicas del DNA llamadas elementos de respuesta a mineralocorticoides o glucocorticoides. El dominio de unión al ligando (LBD) es hidrofóbico para la unión a mineralocorticoides o glucocorticoides (Gómez-Sánchez y Gómez-Sánchez 2014). También contienen una región con función activadora (AF2) que interactúa con con-reguladores de manera ligando dependiente. Ambos receptores se encuentran restringidos en el citoplasma de la célula en un complejo multiproteico que incluye proteínas chaperonas (hsp90, hsp70 y p23), proteínas de la familia de las inmunofilinas (FKBP51 y FKBP52). Cuando se unen a sus ligandos se libera del complejo multiproteico y son translocados al núcleo a través de un poro nuclear donde ejercen su acción positiva y/o negativa mediante: acción directa, unión a otros factores de transcripción y de forma compuesta (Nicolaidis y cols. 2020). Los receptores pueden promover la expresión de algunos genes, pero también pueden reprimir la expresión de otros. La secuencia de los elementos de respuesta está formada por 2 partes de 6 bases cada una y separadas por tres nucleótidos intermedios. Estos tres nucleótidos son necesarios para que el receptor forme homodímeros y promueva la expresión génica. En la represión de genes, la estructura de los elementos de respuesta negativos está separada por una cantidad variable de 0 a 2

nucleótidos. Esto permite que se unan 2 receptores a glucocorticoides, pero no forman heterodímeros (Oakley y Cidlowski 2013).

La activación del MR provoca la reabsorción de sodio y excreción de potasio en los epitelios, así como inflamación, fibrosis y estrés oxidativo. El MR también puede ser activado por la corticosterona provocando los mismos efectos que la aldosterona. Existe un mecanismo para evadir a los glucocorticoides. La actividad del enzima 11 beta hidroxisteroide deshidrogenasa (11BHS2) convierte a la corticosterona en 11-deoxicorticosterona, un metabolito incapaz de activar a MR (Gómez-Sánchez y cols. 2018). La actividad 11 β -HSD2, en presencia del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), disminuye la actividad de esta enzima, por lo tanto, la corticosterona tiene acceso al receptor de mineralocorticoides (Heiniger y cols. 2001).

1.14 Inflamación mediada por aldosterona y corticosterona

La inflamación es un proceso que contribuye al daño renal. La respuesta inflamatoria ocurre cuando las vías de señalización intracelular se activan y regulan a los mediadores proinflamatorios. Las principales vías de señalización inflamatorias en los tejidos son las dependientes de factor nuclear Kappa de los linfocitos B (NF-kB), c-Jun N-termina kinasas (JNK) y mitógenos activados por proteínas kinasas (MAPK) (Chen y cols. 2017). En el riñón, la inflamación depende de las vías de las vías de señalización dependientes de NF-kB y MAPK (Siragy y Xue 2008). La aldosterona promueve la infiltración de macrófagos en el riñón (Blasi y cols. 2003). Los macrófagos infiltrados en el riñón tienen un fenotipo inflamatorio, descrito como fenotipo M1, el cual se ha asociado con la producción de interleucinas inflamatorias (Martín-Fernández y cols. 2016). En modelos con nefrectomía unilateral, la aldosterona activa las vías de señalización inflamatoria, principalmente las vías del NF-kB y MAPK (Leroy y cols. 2009). Ello favorece una mayor expresión de interleucinas proinflamatorias como la osteopontina, proteína quimio atrayente de macrófagos-1, interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) y TNF- α (Siragy y Xue 2008). En cuanto a la corticosterona, existe muy poca información de los mecanismos por los cuales genera inflamación. Pero en el corazón, esta hormona induce inflamación al activar al MR (Hattori y cols. 2013). En el riñón hay abundante expresión de MR. La eplerona disminuye la

producción de interleucinas proinflamatorias en el riñón, al bloquear los MR (Chen y cols. 2013).

1.15 Fibrosis en el riñón

Los tejidos continuamente se remodelan cambiando la síntesis de matriz extracelular que provee de una estructura física de sostén para las células. Cuando se recibe un estímulo para reparar tejido dañado, la síntesis de matriz extracelular se activa para que las células inmunes y/o epiteliales tengan un lugar de sostén. Pero cuando la reparación se completa, la síntesis de matriz extracelular se detiene. Esto significa que la síntesis de la matriz extracelular está bien controlada y se mantiene un equilibrio entre la síntesis y la degradación de la matriz extracelular. En el riñón, la pérdida de la regulación permite que se desarrolle fibrosis (Djudjaj y Boor 2019).

El principal estímulo para formar matriz extracelular es la activación de los fibroblastos, un grupo de células que sintetizan colágeno para dar lugar a la matriz extracelular. Estas células provienen de células mesenquimales residentes, células epiteliales y endoteliales derivadas de un proceso llamado transición epitelial-mesenquimal y derivadas de las células parecidas a fibroblastos en la circulación provenientes de la médula ósea (Strutz y Zeisberg 2006). La activación de los fibroblastos se lleva a cabo por el estímulo inflamatorio. En el riñón, la inflamación producida por patologías como diabetes, hipertensión arterial y enfermedades autoinmunes, aunado a la acción de hormonas como la aldosterona y angiotensina, estimulan la formación de fibrosis. La inflamación es un estímulo importante para la activación de los fibroblastos, ya que, es la señal que indica la presencia de algún daño (Meng 2019). Así diversos grupos celulares se activan para iniciar la fibrosis. En el glomérulo, el daño a los podocitos causa el desanclaje de la membrana basal glomerular, esto se considera el mayor determinante de la progresión del daño glomerular y la glomeruloesclerosis. Los podocitos dañados provocan la activación de las células mesangiales y parietales que facilitan aún más la glomeruloesclerosis (Djudjaj y Boor 2019). En la fibrosis tubulointersticial, el daño tubular es el principal estimulante del desarrollo de fibrosis. El daño tubular posteriormente puede progresar a atrofia tubular que se caracteriza por la simplificación y aplanamiento del epitelio tubular, además del engrosamiento de la membrana basal. En múltiples ocasiones el daño tubular ocurre paralelamente al desarrollo

de la fibrosis (Farris y Colvin 2012). La fibrosis intersticial se desarrolla como un efecto secundario al daño tubular, inflamación y recientemente se sugiere la participación del daño endotelial (Lipphardt y cols. 2017).

1.16 Estado oxidativo

El estrés oxidativo está determinado por el desequilibrio que hay entre radicales libres oxidantes y los antioxidantes. Los radicales libres son moléculas que en su último orbital de energía tiene un electrón desapareado, esto les confiere una gran reactividad con biomoléculas cercanas como lípidos, proteínas, ADN y carbohidratos (Sies y cols. 2017). Los antioxidantes son moléculas capaces de atenuar a los radicales libres al proporcionarles el electrón faltante. El incremento en la producción de los radicales libres y la disminución de los mecanismos antioxidantes se conoce como estrés oxidativo (Sies y cols. 2017). La fuente endógena de los radicales libres son sistemas que realizan reacciones de óxido-reducción. El sistema NADPH oxidasa de la membrana interna de la mitocondria, el sistema xantina oxidoreductasa en el citoplasma celular y membrana plasmática, el sistema del citocromo p450 oxidasa mitocondrial, las mieloperoxidasa en los lisosomas de neutrófilos y linfocitos, entre muchas otras enzimas que participan en la producción de radicales libres (Keshari y cols. 2015). Las mitocondrias, peroxisomas y retículo endoplásmico son sitios importantes de producción endógena de radicales libres. La producción de radicales libres de fuentes exógenas son radiaciones ionizantes como los rayos X, rayos gama, luz UV, otros como la exposición a ozono, químicos que producen peróxidos como los herbicidas, quinonas, químicos que son metabolizados a radicales como los alcanos polihalogenados y fenoles, químicos que liberan hierro como la ferritina (Keshari y cols. 2015). Los radicales libres y sustancias prooxidantes son muy heterogéneas y pueden ser agrupados como radicales centrados en oxígeno (anión superóxido $O_2^{\cdot-}$, hidroxilo $\cdot OH$, peróxido de hidrógeno H_2O_2 , oxígeno singulete 1O_2), radicales centrados en carbono (radicales peroxilo ROO y alcoxilo RO), radicales centrados en nitrógeno (óxido nítrico NO, peroxinitrito $ONOO^-$, dióxido de nitrógeno NO_2), radicales atómicos de cloro y bromo ($Cl\cdot$ y $Br\cdot$), entre otros, que se forman durante la actividad metabólica de las células (Sies y cols. 2017).

Los radicales libres son atenuados por un sistema de defensa antioxidante formado por antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Los antioxidantes enzimáticos incluyen a las enzimas: superóxido dismutasa, catalasa y sistema de enzimas del glutatión. Los antioxidantes no enzimáticos incluyen: vitaminas (A, C, E, K), ácido úrico, flavonoides, ácidos fenólicos, carotenos, minerales (selenio y zinc), ácido lipóico, bilirrubina, entre otros (Mehta y cols. 2015). El sistema de defensa antioxidante funciona en diferentes niveles de acción: primaria o de prevención, evita la formación y liberación de radicales libres (glutatión peroxidasa, catalasa, ferritina y carotenoides), secundaria o secuestradora de radicales libres y terciario o reparadora de daño (enzimas proteolíticas). La defensa primaria y secundaria juegan un rol muy importante para evitar el inicio y propagación de la reacción en cadena que generan los radicales libres (Aguilar y cols. 2016).

La reacción en cadena que generan los radicales libres son el mecanismo molecular para completar su último orbital de energía. Los sustratos con los que reaccionan pueden ser biomoléculas cercanas (carbohidratos, lípidos y proteínas), otros radicales libres y antioxidantes. Estas reacciones permiten que se analicen compuestos secundarios que se forman y así, de forma indirecta, medir la actividad de los radicales libres en los sistemas biológicos (Desai y cols. 2014). Una forma de medir la actividad oxidativa es a partir de la oxidación de los lípidos. Un radical libre inicia la oxidación lipídica con la extracción de un hidrógeno de la cadena hidrocarbonada. Esto genera la formación de dienos conjugados en los hidroperóxidos lipídicos y la degradación de estos últimos produce la formación de aldehídos (malondialdehído) y etanol (Repetto y cols. 2012). La producción de dienos conjugados y malondialdehído son directamente proporcionales a la oxidación lipídica (Repetto y cols. 2012). Dicha oxidación ocurre principalmente por los radicales anión superóxido e hidroxilo, por lo tanto, los antioxidantes que evitan la oxidación son la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión y vitamina C (Desai y cols. 2014).

1.17 Estado redox en el riñón

La inflamación del tejido es el paso previo para desencadenar la producción de radicales libres. En el riñón, el anión superóxido es producida abundantemente por el sistema NADPH oxidasa (NOX) de las células mesangiales, tubulares, endoteliales y macrófagos infiltrados del riñón (Miyata y cols. 2005, Yuan y cols. 2019). Los mecanismos reguladores de la defensa antioxidante están regulados por el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2). Éste es un complejo proteico trimétrico que en el núcleo se une a factores de respuesta antioxidante, en el promotor de regulación río arriba de genes citoprotectores y detoxificantes. Algunos ejemplos típicos de estos genes son superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa (Lee 2017). El Nrf2 es capaz de regular la actividad de receptor gama activado por el activador del peroxisoma (PPAR- γ). Ambos poseen actividad antiinflamatoria y antioxidante al disminuir la actividad del sistema NOX e inducir a SOD (Kim y Yang 2013, Wen y cols. 2010). En cardiomiocitos, PPAR- γ tiene acción directa en la regulación de MnSOD. En ratones knockout para PPAR- γ , la MnSOD es regulada a la baja por lo que hay mayor producción del radical anión superóxido (Polvani y cols. 2012). Al silenciar la actividad del Nrf2 disminuye la concentración basal del PPAR- γ (Lee 2017).

3. JUSTIFICACIÓN

Las principales causas de la enfermedad renal crónica en adultos son diabetes e hipertensión. En niños las enfermedades renales congénitas, como las malformaciones representan las mayores causas de la enfermedad renal. En adolescentes, las enfermedades glomerulares tienen una causa idiopática y las enfermedades congénitas son menos frecuentes. En jóvenes y adultos los eventos estresantes crónicos y los asociados a patologías como la ansiedad y depresión han incrementado en los últimos años. En nuestro grupo de trabajo hemos mostrado una asociación entre el estrés crónico y el daño renal en un modelo de rata macho joven, induciendo pérdida de glomérulos, disminución del área glomerular y área del espacio capsular (Sánchez-Solís y cols. 2020). El estrés crónico por restricción durante 6 semanas provoca más cambios en el riñón de ratas jóvenes que en las adultas (Marchon y cols. 2018). Por lo tanto, nuestro primer interés es investigar ¿Cuál de los dos grupos es más susceptible al daño renal provocado por la exposición de 2 y 4 semanas de estrés crónico variable?

Nuestro segundo interés es identificar el posible mecanismo involucrado en el daño renal causado por el estrés crónico. En nuestro grupo de trabajo sabemos que el estrés crónico provoca hiperaldosteronismo (Sánchez-Solís y cols. 2020). La administración de aldosterona provoca estrés oxidativo, inflamación y fibrosis en el riñón, pero no sabemos el rol que tiene la corticosterona en el daño renal. Por lo tanto, nos preguntamos ¿Cuál es el efecto del incremento en la concentración de aldosterona y corticosterona mediado por el estrés crónico variable sobre la histología y función renal?

4. HIPÓTESIS

Las elevadas concentraciones de corticosterona y aldosterona inducidas por el estrés crónico variable provocan mayor daño renal en ratas macho jóvenes que en adultos.

5. OBJETIVOS

1.18 Objetivo general

Comparar los efectos de la corticosterona y aldosterona inducidas por estrés crónico variable en la estructura y función renal de ratas macho jóvenes y adultos.

1.19 Objetivos específicos

En ratas macho Wistar jóvenes y adultas con estrés crónico variable:

1. Medir la concentración sérica de corticosterona y aldosterona mediante ELISA.
2. Cuantificar parámetros de la función renal: concentración de creatinina sérica, concentración de creatinina y sodio urinario mediante espectrofotometría.
3. Determinar cambios histológicos y fibrosis en el riñón mediante la tinción del ácido periódico de Schiff y tricrómica de Masson, respectivamente.
4. Determinar el contenido de triglicéridos, estado oxidativo y antioxidante en extractos de riñón mediante espectrofotometría.
5. Identificar la presencia de TNF- α como indicador de inflamación en el riñón mediante western blot e inmunohistoquímica.

6. METODOLOGÍA

1.20 Diseño del experimento

Se utilizaron 48 ratas macho de la cepa Wistar de 21 días de edad. Al día del destete se tomaron ratas macho procedentes de madres diferentes. Se mantuvieron en cajas individuales bajo condiciones controladas de bioterio con un ciclo de luz oscuridad invertido (12 horas luz/oscuridad iniciando a las 8 a.m.), temperatura de $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$, humedad relativa de $60 \pm 5\%$. Las ratas fueron distribuidas en 2 grupos: ratas macho jóvenes de 51 días de vida y ratas macho adultos con 81 días de vida.

Para las ratas macho jóvenes se formaron 3 subgrupos: ratas macho jóvenes controles sin someterse a estrés crónico variable durante todo el experimento (Control, $n=7-8$), ratas macho jóvenes que fueron sometidas a estrés crónico variable durante las últimas 2 semanas del segundo mes (JE2, $n=8$), ratas macho jóvenes que fueron sometidas a estrés crónico variable durante 4 semanas del segundo mes (JE4, $n=7-8$). Para las ratas macho adultos se formaron 3 subgrupos: ratas macho adultos controles sin someterse a estrés crónico variable durante todo el experimento (Control, $n=8$), ratas macho adultos que fueron sometidos a estrés crónico variable durante las últimas 2 semanas del tercer mes (AE2, $n=8$), ratas macho adultas que fueron sometidas a estrés crónico variable durante 4 semanas del tercer mes (AE4, $n=8$). Los animales fueron alimentados *ad libitum* con dieta Chow 5001 y acceso continuo a agua y fueron pesados diariamente, el diseño experimental se observa en la (Figura 1).

1.21 Estímulo de estrés crónico variable

El estrés crónico variable (ECV) consistió en exponer a la rata a cinco tipos diferentes de estrés, en diferentes horarios. En las ratas jóvenes del grupo JE2 los estímulos estresantes se aplicaron en las últimas 2 semanas del segundo mes (semana 3 y 4 de la **Tabla 1**). En el grupo JE4 los estímulos estresantes se aplicaron en las 4 semanas del segundo mes (semanas 1, 2, 3 y 4 de la tabla I). En las ratas adultas del grupo AE2 los estímulos estresantes se aplicaron en las últimas 2 semanas del tercer mes (semana 3 y 4 de la **Tabla 1**). En el grupo AE4 los estímulos estresantes se aplicaron en las 4 semanas del tercer mes (semanas 1, 2, 3 y 4 de la **Tabla 1**).

Los estímulos consistieron en los siguientes: reducción del espacio con caja limpia durante 5 horas (se colocan 8 ratas en una caja limpia habitualmente para 4-5 ratas, dimensiones 50 cm x 40 cm x 21 cm), nado forzado en agua caliente (28 °C) durante 10 minutos, reducción del espacio con caja sucia durante 5 horas (se colocan 8 ratas en una caja sucia usada habitualmente para 4-5 ratas, dimensiones 50 cm x 40 cm x 21 cm), nado forzado en agua fría (18 °C) durante 10 minutos y restricción durante 3 horas (tubo de 6 cm X 20 cm). Se aplicó un estímulo estresante por día de lunes a viernes sin repetir el mismo estímulo estresante el mismo día de las semanas consecutivas. El esquema completo del paradigma de inducción de estrés crónico variable previamente reportado se observa en la **Tabla 1** (Zeeni y cols. 2013).

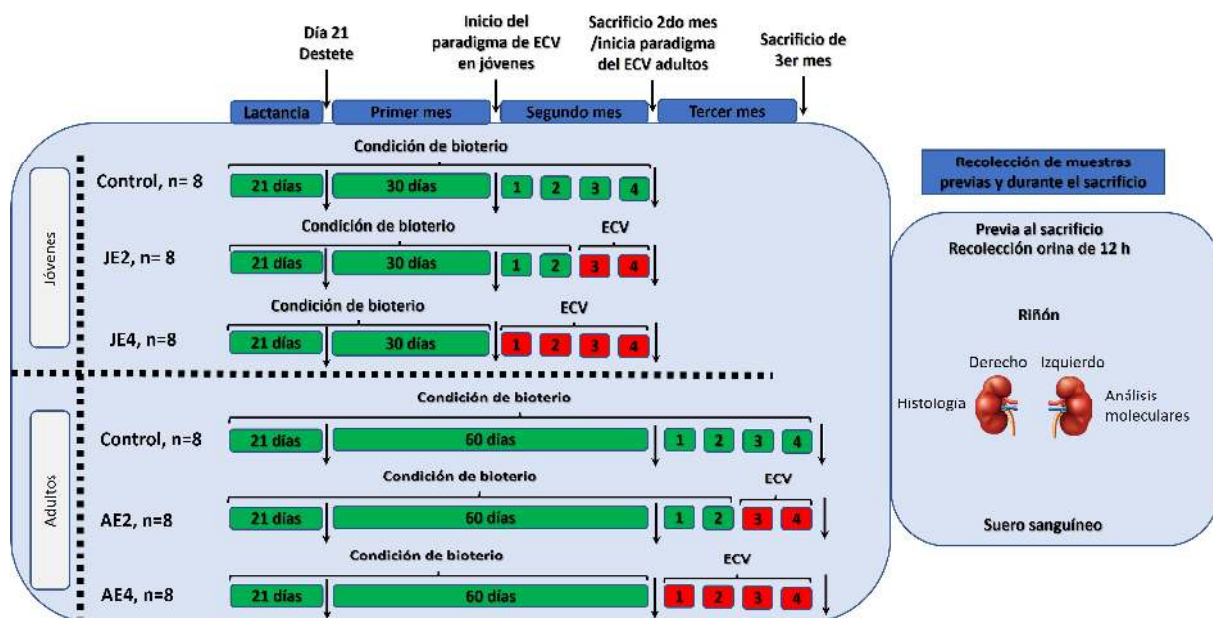


Figura 1 Diseño experimental.

Se tendrán dos grupos de ratas macho un grupo joven y otro adulto. Ratas macho jóvenes controles sin someterse a estrés crónico variable (ECV) durante 4 semanas del segundo mes (Control, n=7- 8), ratas macho jóvenes que fueron sometidas a ECV durante las últimas 2 semanas del segundo mes (JE2, n=8), ratas macho jóvenes que fueron sometidas a ECV por 4 semanas durante el segundo mes (JE4, n=8). Para las ratas macho adultos, ratas macho adultos controles sin someterse a ECV durante todo el experimento (control, n= 8), ratas macho adultos que fueron sometidos a ECV durante las últimas 2 semanas del tercer mes (AE2, n=8), ratas macho adultas que fueron sometidas a ECV por 4 semanas durante el tercer mes (AE4, n=8). Al momento del sacrificio, para los animales de cada grupo, se realizó la recolección de orina de 12 horas previas al sacrificio, posteriormente, la rata fue anestesiada y decapitada para recolectar sangre troncal, para después obtener suero sanguíneo. Finalmente, se realizó un corte en la línea media longitudinal abdominal y se extrajeron ambos riñones.

SEM	Día de tratamiento	Estresor usado	Duración	Hora de administración
sem 1	1	Reducción de espacio en caja limpia	5 h	08:00 - 13:00
	2	Restricción de movimiento	3 h	14:00 - 17:00
	3	Nado forzado frío	10 min	13:00 - 13:10
	4	Nado forzado caliente	10 min	15:00 - 15:10
	5	Reducción de espacio en caja sucia	5 h	10:00 - 15:00
	6	No estresor	~	
	7	No estresor	~	
sem 2	8	Nado forzado caliente	10 min	15:00 - 15:10
	9	Reducción de espacio en caja sucia	5 h	10:00 - 15:00
	10	Reducción de espacio en caja limpia	5 h	08:00 - 13:00
	11	Nado forzado frío	10 min	13:00 - 13:10
	12	Restricción de movimiento	3 h	14:00 - 17:00
	13	No estresor	~	
	14	No estresor	~	
sem 3	15	Reducción de espacio en caja sucia	5 h	10:00 - 15:00
	16	Nado forzado frío	10 min	13:00 - 13:10
	17	Restricción de movimiento	3 h	14:00 - 17:00
	18	Reducción de espacio en caja limpia	5 h	08:00 - 13:00
	19	Nado forzado caliente	10 min	15:00 - 15:10
	20	No estresor	~	
	21	No estresor	~	
sem 4	22	Nado forzado frío	10 min	13:00 - 13:10
	23	Nado forzado caliente	10 min	15:00 - 15:10
	24	Reducción de espacio en caja sucia	5 h	10:00 - 15:00
	25	Restricción de movimiento	3 h	14:00 - 17:00
	26	Reducción de espacio en caja limpia	5 h	08:00 - 13:00
	27	Sacrificio		

Tabla 1. Cronograma de inducción del paradigma de estrés crónico variable.

Se muestran los estímulos aplicados durante las 4 semanas, así como sus respectivos horarios.

1.22 Obtención de muestras sanguíneas, orina y riñón

Al término del periodo experimental las ratas fueron colocadas en cajas metabólicas para recolectar orina de 12 horas durante la noche previa al sacrificio. El inicio de la recolección se inició a las 9:00 pm y hasta el día siguiente a las 9:00 am para determinar la concentración de creatinina y sodio urinario, posteriormente los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (50 mg/kg) y decapitados para coleccionar sangre troncal en tubos (13 x 100mm). La sangre se dejó reposar en baño maría durante 10 minutos, posteriormente fue

centrifugada a 2500 rpm durante 10 minutos para obtener el suero sanguíneo. El suero se separó en alícuotas de 100 μ L, las cuales se conservaron en congelación a -80°C hasta determinar la concentración sérica de creatinina, corticosterona y aldosterona. Para extraer los riñones se realizó una incisión longitudinal sobre la línea media ventral desde la cavidad abdominal hasta la dorsal del pene, se extrajeron los riñones y se pesaron. El riñón izquierdo se mantuvo en refrigeración a -80°C hasta que se realizó la determinación de triglicéridos *in situ*, la actividad enzimas antioxidantes como la catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), el poder reductor férrico (FRP) y la medición de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). El riñón derecho fue fijado en Bouin y se procesó para las determinaciones histológicas.

1.23 Determinación de corticosterona

La concentración de corticosterona se midió usando el método de ELISA de acuerdo con las indicaciones del fabricante (Kit Enzyme Immunoassay, compañía Assay Desing No.900-097). Los estándares y las muestras se analizaron por duplicado en un quipo STAT FAX 303 a una longitud de onda de 405 nm.

1.24 Determinación de aldosterona

La concentración de aldosterona sérica se midió usando el kit comercial de Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA) de acuerdo con las indicaciones del fabricante (aldosterona, No. 501090: Cayman Chemical Ann Arbor, USA). Los estándares y las muestras se analizaron por duplicado en un quipo STAT FAX 303 a una longitud de onda de 405 nm.

1.25 Determinación de creatinina y sodio

La creatinina en suero y orina se midió por el método colorimétrico-Jaffe-cinético (spinreact®, ref 1001111) las muestras y estándares se analizaron por duplicado y fueron leídas en un lector de placas STAT FAX 303 a una longitud de onda de 492 nm. La medición

de sodio en orina se realizó por el método enzimático-colorimétrico de punto final con el kit “sodium assay kit” (sigma-aldrich®, ref MAK247-1KT). Las muestras y estándares se analizaron por duplicado un lector de placas STAT FAX 303 a una longitud de onda de 405 nm.

1.26 Análisis histológico

El riñón derecho se cortó por la mitad de forma longitudinal se procesó con Bouin durante 24 h. Posteriormente, el tejido se deshidrató con alcohol etílico en concentraciones ascendentes (60, 70, 80, 96 y 100%), se aclaró en xileno, se infiltró e incluyó en Paraplast Plus. Se obtuvieron cortes longitudinales de 5µm de espesor, una laminilla se tiñó con ácido periódico de Shiff (PAS, tiñe aldehídos oxidados de las membranas basales) y otra laminilla se tiñó con la tinción de tricrómica de Masson. Una tercera fue usada para realizar inmunohistoquímica de TNF- α . Las fotografías se tomaron con una cámara jenoptik ProgRes CT5 5.0 mp montada en un microscopio óptico Zeiss Imager A.1.

La laminilla con tinción PAS se usó para analizar la morfología renal. Para esto se tomaron microfotografía a 40 aumentos totales de todo el riñón para realizar una reconstrucción del tejido. Se realizó un muestreo usando líneas radiales separadas 20° una de la otra. Se generaron 18 campos sobre la reconstrucción del riñón, de estos campos se seleccionaron 4 campos de forma aleatoria por cada riñón. Se tomaron microfotografías a 400 aumentos totales de todos los corpúsculos encontrados en los campos seleccionados. Se midió el área del corpúsculo renal, área del glomérulo, área del espacio capsular de Bowman y el área de los túbulos contorneados proximales. El área del espacio capsular de Bowman se calculó usando la siguiente fórmula, espacio de Bowman's = área del corpúsculo renal – área glomerular. Los corpúsculos fueron clasificados como grandes ($\geq 5000 \mu\text{m}^2$) y pequeños ($< 5000 \mu\text{m}^2$), los glomérulos como grandes ($\geq 4000 \mu\text{m}^2$) y pequeños ($< 4000 \mu\text{m}^2$) y espacio capsular como grande ($\geq 900 \mu\text{m}^2$) y pequeño ($< 900 \mu\text{m}^2$). Las mediciones se realizaron a través del software Axio Vision 4.8. Se determinó el porcentaje de túbulos dañados, se contaron los túbulos que se encontraban alrededor de los corpúsculos renales a 400 aumentos totales. Los túbulos contados presentaban una o más de las siguientes características: arrugados, epitelio simplificado y/o membrana basal engrosada. El porcentaje total de

túbulos dañados se obtuvo con la siguiente fórmula $\% = \text{total de túbulos dañados} * 100 / \text{total de túbulos contados}$ (Lusco y cols. 2016) .

Otra laminilla fue teñida con la tinción de tricrómica de Masson (tiñe colágeno de tipo I). Se tomaron microfotografías a 40 aumentos totales para realizar la reconstrucción del riñón. Esta reconstrucción se usó para determinar el área total del riñón. Para calcular el porcentaje de área con fibrosis del riñón se tomaron microfotografías de las áreas con fibrosis (color azul) a 400 aumentos totales. Estas microfotografías fueron analizadas mediante la técnica de segmentación de color para seleccionar el color azul y determinar el porcentaje del área que representaba. Para calcular el porcentaje de área marcada se determinó con la siguiente fórmula: $\% \text{ de área marcada} = [\text{área marcada} (\mu\text{m}^2) * 100] / \text{área total del riñón} (\mu\text{m}^2)$. Sobre esta tinción realizamos el conteo de corpúsculos renales dañados usando una magnificación de 400 aumentos totales. Se contaron los corpúsculos que presentaban una o más de las siguientes características: glomerulosclerosis, obliteración del glomérulo, adhesión del glomérulo a la cápsula de Bowman, pérdida de glomérulos y difuminación del glomérulo con el tejido circundante (Han y Kim 2016). El análisis de las microfotografías se realizó con el software ImageJ 1.53.

1.27 Determinación de triglicéridos en tejido renal

El contenido de triglicéridos (TG) en riñón se determinó mediante la técnica de Folch con algunas modificaciones. Aproximadamente 50-100 mg de riñón izquierdo congelado se homogenizó en 5.4 ml de cloroformo-metanol (2:1; v/v; J. T. Baker, México). Para separar las fases orgánicas e inorgánicas se agregó 0.7% de cloruro de sodio. Las muestras se agitaron en vórtex y se centrifugaron a 1200 rpm x 4°C durante 15 minutos. La parte orgánica se extrajo y se colocó en un tubo nuevo para evaporar el solvente en baño maría a 60 °C. Los residuos se suspendieron en una solución de isopropanol (J. T. Baker, México) con un 10% de Triton X-100 (Sigma, EE. UU.). La concentración de TG se determinó mediante del kit de triglicéridos por colorimetría (spinreact®, ref 1001313, México), todas las muestras y los estándares se analizaron por duplicado y se leyeron en un fotómetro marca Fotometer 5010 a 505 nm. Los niveles de TG en riñón se reportan como mg de TG/g de peso renal.

1.28 Extractos de riñón para la prueba de TBARS y actividad enzimática

El riñón se homogenizó en 500 μL de buffer de lisis RIPA (Harbor 2023) por cada 10 mg de tejido. Posteriormente, se centrifugó el homogenado a 10000 rpm durante 2 min a 4°C para separar el sobrenadante y descartar el pellet. Posteriormente, se realizó una dilución de trabajo del extracto con una concentración de 1:100 en agua destilada. Esta es la muestra que se usa para las siguientes técnicas.

1.29 Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

El estrés oxidativo se determinó mediante la técnica de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Para esto, en un tubo se agregaron 70 μL de Tris 150 mM pH 7.5, 300 μL de ácido tiobarbitúrico al 0.4% en ácido tricloroacético y 90 μL de cada muestra. Se agitaron en vórtex y se incubaron 45 min a 100 °C. Las muestras se enfriaron en hielo durante 2 min y se agregaron 200 μL de KCl al 1.2 %, se centrifugaron a 7000 rpm durante 3 min. La curva de calibración se realizó mediante la dilución de una solución stock de MDA 30 μM como sigue 0.1, 0.3, 0.6 y 1 μM en volumen final de 300 μL . Se colocaron 180 μL del sobrenadante en una microplaca para realizar la lectura en un lector de placa BioTec modelo ELx800 a 532 nm. Los niveles de MDA se reportaron por mg de proteína y se presentan como % de MDA con relación al control que se llevó a 100%.

1.30 Actividad de catalasa

Se colocaron 5 μg de proteína de los extractos en un volumen final de 250 μL , se ajustó el volumen con agua miliQ. Posteriormente en cada tubo se agregaron 500 μL de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) al 0.1 M, 50 μL de Tris 25 Mm pH 7.5, 250 μL de una solución de H_2O_2 al 0.2 M y finalmente una solución de dicromato de potasio al 0.16 M y ácido acético glacial en una concentración de 1:3. La curva de calibración se realizó con H_2O_2 en concentraciones de 0, 10, 20, 40, 80 y 160 nM. Se incuban los tubos a 97°C, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se colocaron 200 μL en una microplaca para leer en lector de placa BioTec modelo ELx800 a 550 nm. Los niveles de actividad catalasa se reportaron

por mg de proteína y se presentan como % de actividad catalasa con relación al control que se llevó a 100%.

1.31 Actividad de superóxido dismutasa

En una microplaca se agregaron 20 μ L de muestra en 80 μ L de agua destilada, luego se agregaron 8 μ L de pirogalol 2 mM, 10 μ L de bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT, 5 mg de MTT en 1 mL de PBS 1X). Se incubaron a temperatura ambiente en agitación continua cubiertas de la luz durante 5 min. Se agregaron 100 μ L de dimetilsulfóxido DMSO. La curva de calibración se realizó con diluciones de ácido úrico a partir de una solución stock de 2mM como sigue 0, 0.01, 0.03, 0.06, 0.12, 0.25 y 0.5 mM en volumen final de 1000 μ L. Se realizó la lectura en un lector de placa BioTec modelo ELx800 a 550 nm. Los niveles de actividad SOD se reportaron por mg de proteína y se presentan como % de actividad SOD con relación al control que se llevó a 100%.

1.32 Capacidad antioxidante total

El estado antioxidante total fue evaluado según el método de Bahr y Basalto 2004. Treinta y tres microlitros de suero (muestra), agua destilada (blanco) y un estándar de ácido ascórbico se agregó a 1.0 mL de una solución de FRP (25 mL de acetato de sodio a 300 mmol/L con pH de 3.6, 2.5 mL de hexacianoferrato de potasio ($K_3Fe(CN)_6$) 50 mmol/L y 2.5 mL de cloruro férrico hexahidrato ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)). Se incubaron por 3 min a 37 °C. La lectura se realizó a 593 nm en un lector de placa BioTec modelo ELx800. Los niveles de capacidad antioxidante total se reportaron por mg de proteína y se presentan como % de capacidad antioxidante total con relación al control que se llevó a 100%.

1.33 Inmunohistoquímica

Se usaron cortes de riñón de 5 μ m de espesor. Se dejaron en una solución de citrato de sodio 10 mM con pH 6 durante 3 noches a 4°C. Se incubaron en un horno de microondas por 10 min para recuperar los antígenos. Las peroxidasas fueron inhabilitadas con una solución

de peróxido de hidrogeno al 3% durante 30 min. Se realizó el bloqueo de uniones inespecíficas usando suero de cabra al 5% disuelto en una solución de fosfatos salina tritón X 100 (PBS-T) al 0.3 % durante una hora. Se realizó la incubación con el anticuerpo primario (Policlonal de conejo anti-TNF- α , 1:250 ab9739 de abcam) durante 24 h a 4°C. Se realizó el lavado del tejido y se incubaron con el anticuerpo secundario (anti-conejo de cabra, sc-2357 de santa cruz biotechnology) a temperatura ambiente por 2 h. Se realizó el lavado con PBS-T. Posteriormente se incubó con el complejo avidina-biotina durante 1 h. Después se realizó una serie de lavados con PBS. Se realizó el revelado mediante kit de sustrato de peroxidasa DAB (Vector Labs USA, No. cat. Sk-4100). Las laminillas fueron lavadas y contrateñidas con hematoxilina de Mayer's, después se deshidrataron y se montaron con resina de grado histológico. Se tomaron fotografías a 400 aumentos total usando una cámara jenoptik ProgRes CT5 5.0 mp montada en un microscopio óptico Zeiss Imager A.1.

1.34 Wester blot

Los tejidos fueron homogenizados en un buffer de lisis (0.02M tris-HCL. pH 7.4, 0.1 m NaCl, 0.1M glicina y Tritón X-100 0.1%, inhibidor de proteasas 1%, PMSF 1 mM y ditiotreititol 1 mM) y luego fueron separados por 15 % SDS-PAGE bajo condiciones reductoras. Después de la electroforesis, las muestras fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa utilizando el sistema Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad), bloqueadas con 10 % de leche desnatada en polvo in PBS/0.2% vol/vol Tween 20 por una hora, lavadas con PBS/Tween, e incubadas con anticuerpos primarios, policlonal de conejo anti-TNF- α (1:200, ab9739, Abcam). El anticuerpo fue diluido en 10 % de leche descremada PBS/Tween. Las transferencias fueron lavadas con PBS/Tween e incubados con los anticuerpos secundario-HRP apropiados. Después de 3 lavados con PBS/tween la reacción de las bandas inmunorreactivas se revelaron utilizando un kit de quimioluminiscencia y mediante la exposición de placas radiográficas a las membranas. Se cuantificó mediante densitometría con el programa Image J. Los resultados son expresados en unidades arbitrarias con la previa normalización contra las bandas teñidas con colorante de rojo de Ponceau.

1.35 Análisis estadístico

Los datos se presentan como unidades de frecuencia y de tendencia central como media \pm error estándar. Las pruebas de normalidad se realizaron mediante el estadístico de Shapiro Wilk considerando un alfa de $p < 0.05$. Los análisis mostraron una distribución normal en las variables analizadas por lo que se recurrió a aplicar estadística paramétrica. Para determinar diferencia entre 2 grupos se usó una t de student. Realizamos una ANOVA de una vía para analizar las variables del grupo de jóvenes y adultos se realizó una prueba poshoc de Tukey. Un valor de $p < 0.05$ se consideró como estadísticamente significativo.

7. RESULTADOS

1.36 Efecto inmediato y tardío del estrés crónico variable sobre la concentración sérica de corticosterona y aldosterona en ratas jóvenes

En los jóvenes la concentración sérica de aldosterona en el grupo JE4 (291.9 ± 27.17 pg/mL) fue mayor comparado con el grupo control (193.5 ± 26.71 pg/mL, $t_{(1,14)} = 2.581$, $P = 0.0218$; **Figura 2 a**). La concentración de corticosterona en el grupo JE4 (1492.0 ± 180.3 pg/mL) fue similar al grupo control (1331.0 ± 251.2 pg/mL; $t_{(1,14)} = 0.5207$, $P = 0.61$; **Figura 2 b**).

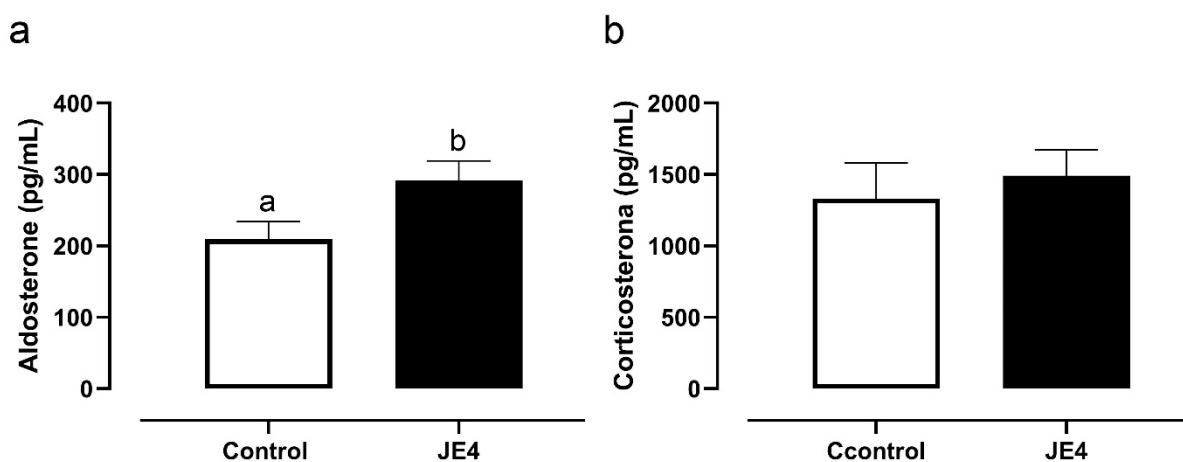


Figura 2. Efecto del estrés crónico variable sobre la concentración de aldosterona y corticosterona en ratas jóvenes.

Se muestra la concentración de aldosterona (a) y corticosterona sérica (b). Ratas jóvenes sometidas a estrés crónico variable durante 4 semanas (JE4). Se muestra la media \pm e.e. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre grupos. T de Student, $p < 0.05$ como diferencias significativas. ($n = 7-8$).

1.37 Efecto inmediato y tardío del estrés crónico variable sobre parámetros de crecimiento, alimentación y peso del riñón en jóvenes

El peso corporal de los grupos JE2 y JE4 fue menor comparado con el grupo control. La ingesta de alimento fue similar entre los grupos. La ingesta de agua fue mayor en el grupo JE4 comparado con el grupo control y el grupo JE2. El peso del riñón y el índice de adiposidad fueron similares entre grupos (**Tabla 2**).

	Control	JE2	JE4	ANOVA de una vía y valor de p
Ganancia de peso corporal (g)	105.0 ± 3.79 ^a	77.80 ± 4.14 ^b	81.49 ± 4.17 ^b	F _(2,21) =13.35, P<0.001
Ingesta de alimento (g/100 g de peso corporal/día)	8.80 ± 0.21	9.04 ± 0.08	8.51 ± 0.25	F _(2,21) =1.793, P=0.19
Ingesta de agua (mL/100 g de peso corporal/día)	16.74 ± 0.59 ^a	17.14 ± 0.58 ^a	19.5 ± 0.77 ^b	F _(2,21) =5.152, P=0.02
Peso del riñón (g/100 g de peso corporal)	0.37 ± 0.01	0.38 ± 0.01	0.34 ± 0.01	F _(2,21) =2.388, P=0.12
Índice de adiposidad (g/100 g de peso corporal)	2.41 ± 0.22	1.99 ± 0.18	1.92 ± 0.15	F _(2,21) =1.957, P=0.17

Tabla 2. Efecto del estrés crónico variable sobre la ganancia de peso corporal, ingesta de alimento, agua, peso del riñón e índice de adiposidad en ratas jóvenes.

Ratas jóvenes sometidas a estrés crónico variable durante 2 semanas (JE2), ratas jóvenes sometidos a estrés crónico variable durante 4 semanas (JE4). En la tabla se muestra la media ± e.e, el valor de p, el valor de ANOVA de una vía. Tukey's pos hoc p<0.05 como diferencias significativas. Letras diferentes representan diferencias significativas (n=7-8 / grupo).

1.38 Efecto inmediato y tardío del estrés crónico variable sobre los parámetros de la función renal en ratas jóvenes.

1.38.1 Concentración de creatinina sérica y urinaria

La concentración de creatinina sérica no se modificó en los grupos JE2 (0.76 ± 0.15 mg/dL) y JE4 (0.89 ± 0.20 mg/dL) comparados al grupo control (1.0 ± 0.11 mg/dL; ANOVA de una vía, $F_{(2, 20)} = 0.514$, $P=0.51$;

Figura 3A). La concentración de creatinina urinaria no se modificó en los grupos JE2 (109.6 ± 6.17 mg/dL) y JE4 (111.0 ± 17.96 mg/dL) comparados al grupo control (126.9 ± 14.62 mg/dL, ANOVA de una vía, $F_{(2, 20)} = 0.462$, $P=0.64$;

Figura 3B)

1.38.2 Concentración de sodio urinario

La concentración de sodio urinario fue menor en el grupo JE2 (10.7 ± 0.97 nM) y JE4 (10.86 ± 1.56 nM) comparados al grupo control (16.78 ± 1.05 nM, ANOVA de una vía $F_{(2, 20)} = 1.440$, $P=0.0039$,

Figura 3C).

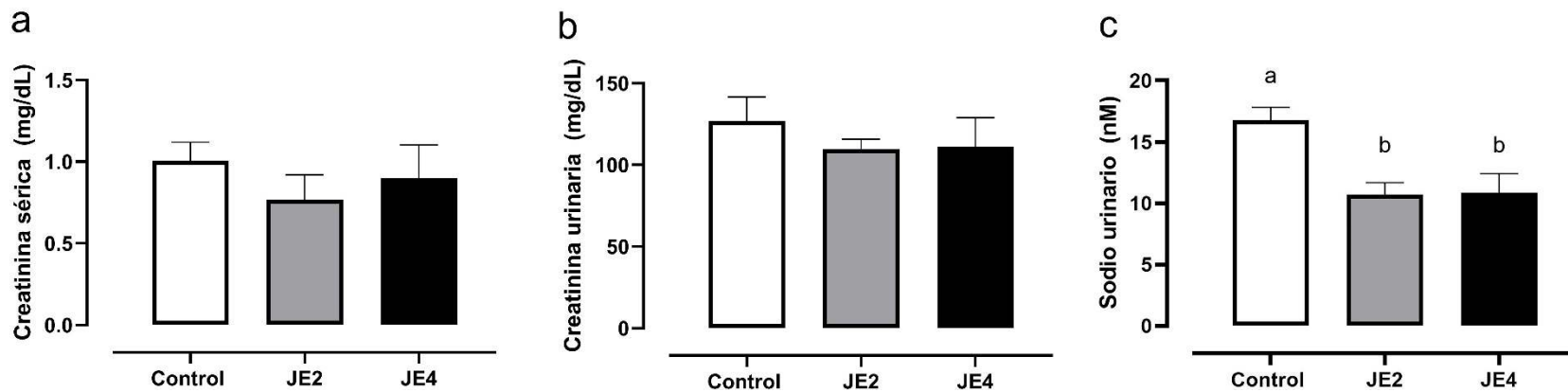


Figura 3. Efecto del estrés crónico variable sobre la función renal de ratas jóvenes.

Concentración de creatinina sérica (A), concentración de creatinina urinaria (B) y concentración de sodio urinario (C). Ratas jóvenes sometidas a estrés crónico variable durante 2 semanas (JE2), ratas jóvenes sometidas a estrés crónico variable durante 4 semanas (JE4). Se muestra la media \pm e.e. letras diferentes muestran diferencias significativas. ANOVA de una vía, Tukey's pos hoc $p < 0.05$ ($n = 7-8$).

1.39 Efecto inmediato y tardío del estrés crónico variable sobre la histomorfometría renal en ratas jóvenes.

1.39.1 Corpúsculos

El número de corpúsculos renales, el área corpuscular, el porcentaje de corpúsculos sin glomérulos, el porcentaje de corpúsculos chicos y el porcentaje de corpúsculos grandes fue similar entre grupos (**Tabla 3**).

1.39.2 Glomérulos

El área glomerular, el porcentaje de glomérulos chicos y el porcentaje de glomérulo grandes fue similares entre grupos (**Tabla 3**).

1.39.3 Cápsula de Bowman

El área capsular fue similar entre grupos. El porcentaje de espacio capsular chico fue mayor en el grupo JE4 comparado con el grupo control. El porcentaje del espacio capsular grande fue menor en el grupo JE4 comparado con el grupo control (**Tabla 3**).

1.39.4 Túbulo contorneado proximal

El área del túbulo contorneado proximal fue similar entre grupos (**Tabla 3**).

1.39.5 Fibrosis renal

En el grupo control observamos fibras de colágeno bien delimitada sin invasión del intersticio tubular (**Figura 4 a y d**). En el grupo JE2 se observaron fibras de colágeno que invaden el espacio entre los túbulos renales (**Figura 4 b y e**). En el grupo JE4 se observa una mayor cantidad de fibras de colágeno que están envolviendo e invadiendo a los túbulos renales (**Figura 4 c y f**). La evaluación del porcentaje de área con fibrosis del grupo JE2 (0.121 ± 0.03 %) fue similar al grupo control. El porcentaje de fibrosis fue mayor en el grupo JE4 (0.229 ± 0.06 %) comparado con el grupo control (0.05 ± 0.004 %; ANOVA de una vía, $F_{(2, 20)} = 4.565$, $P=0.02$);(**Figura 4 g**).

Corpúsculos	Control	JE2	JE4	ANOVA de una vía y valor de p
No. de corpúsculos	70.14 ± 5.69	61.75 ± 8.25	61.71 ± 6.33	F (2, 19) = 0.467, P=0.63
Área corpuscular (µm ²)	8010.0 ± 476.10	7614.00 ± 502.5	7276.0 ± 318.8	F (2, 19) = 0.643, P=0.54
Corpúsculos sin glomérulos (%)	11.0 ± 0.95	17.72 ± 3.16	13.78 ± 3.18	F (2, 19) = 1.593, P=0.23
Corpúsculos chicos (%)	8.76 ± 3.42	12.44 ± 4.60	11.75 ± 3.15	F (2, 19) = 0.251, P=0.78
Corpúsculos grandes (%)	91.24 ± 3.42	87.56 ± 4.60	88.25 ± 3.15	F (2, 19) = 0.251, P=0.78
Glomérulos				
Área glomerular (µm ²)	6379.0 ± 460	6077.0 ± 370.1	6075.0 ± 245.8	F (2, 19) = 0.2171, P=0.81
Glomérulos chicos (%)	13.16 ± 4.20	15.67 ± 4.34	12.13 ± 3.16	F (2, 19) = 0.2155, P=0.81
Glomérulos grandes (%)	86.84 ± 4.20	84.33 ± 4.34	87.87 ± 3.16	F (2, 19) = 0.2155, P=0.81
Cápsula de Bowman				
Área del espacio capsular (µm ²)	1631.0 ± 111.1	1537.0 ± 176.9	1201.0 ± 190.6	F (2, 19) = 1.808, P=0.19
Espacio capsular chico (%)	10.79 ± 2.91 ^a	22.67 ± 7.09 ^{ab}	39.69 ± 10.78 ^b	F (2, 19) = 3.485, P=0.05
Espacio capsular grande (%)	89.20 ± 2.90 ^a	77.34 ± 7.09 ^{ab}	60.29 ± 10.78 ^b	F (2, 19) = 3.490, P=0.05
Túbulo contorneado proximal				
Área (µm ²)	1314.0 ± 54.48	1606.0 ± 363.5	1139.0 ± 89.58	F (2, 19) = 1.015, P=0.38

Tabla 3. Efecto del estrés crónico variable sobre la histomorfometría renal de ratas jóvenes.

Ratas jóvenes sometidas a estrés crónico variable durante 2 semanas (JE2), ratas jóvenes sometidas a estrés crónico variable durante 4 semanas (JE4). En la tabla se muestra la media ± e.e, el valor de p, el valor de ANOVA de una vía. Tukey's pos hoc p<0.05 como diferencias significativas. Letras diferentes representan diferencias significativas (n=7-8 / grupo).

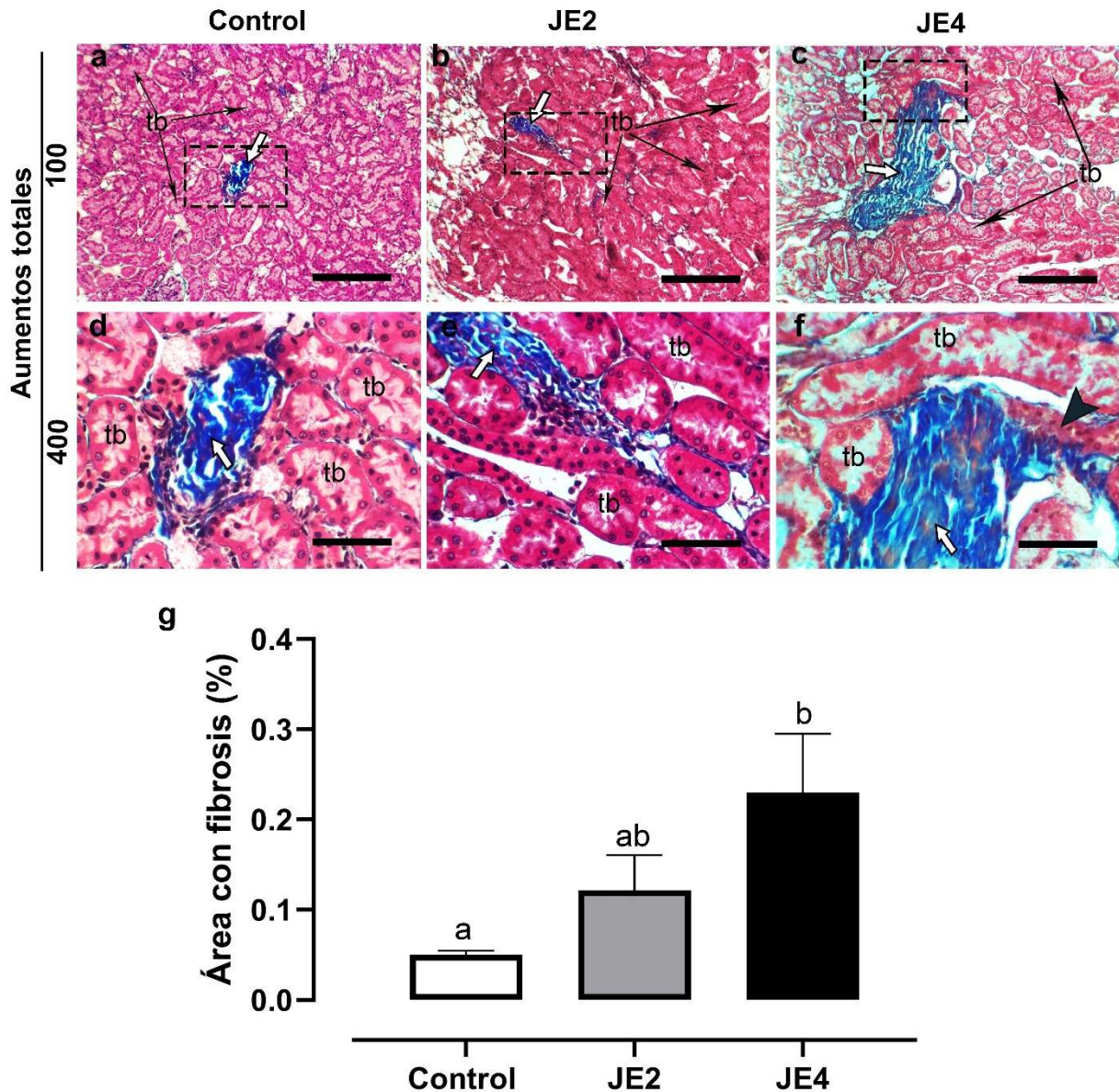


Figura 4. Efecto del estrés crónico variable sobre la fibrosis renal en ratas jóvenes.

Se muestran imágenes representativas de ratas control (a y d), ratas jóvenes sometidas a estrés crónico variable durante 2 semanas (JE2; b y e) y ratas jóvenes sometidas a estrés crónico variable durante 4 semanas (JE4, c y f). en las fotografías las flechas blancas señalan las regiones con fibrosis tubulointersticial, los recuadros negros de línea punteada señalan el lugar magnificado de la siguiente fotografía, la cabeza de flecha negra señala túbulo rodeado por fibras de colágeno, túbulo (tb) y corpúsculo (cp). Las barras negras representan 200 y 50 micrómetros en las fotos de 100 y 400 aumentos totales, respectivamente. En la gráfica (g) Se muestra la media \pm e.e. letras diferentes muestran diferencias significativas. ANOVA de una vía, Tukey's pos hoc $p < 0.05$ (n=7-8).

1.40 Efecto inmediato y tardío del estrés crónico variable sobre el daño tubular en la corteza y médula renal de ratas jóvenes.

1.40.1 Corteza renal de ratas jóvenes

Los túbulos del grupo control se observaron sin alteraciones en las membranas basales, el epitelio tubular se observó conservado y bien organizado, el borden cepillo se observó adherido y distribuido en la luz del túbulo renal (**Figura 5 a - b**). Los túbulos del grupo JE2 se observaron sin alteraciones en las membranas basales, el epitelio tubular está conservado y bien organizado, el borden cepillo se observó adherido y distribuido en la luz del túbulo renal (**Figura 5 c - d**). En el grupo JE4, se observaron túbulos atrofiados, reducción del epitelio tubular y engrosamiento de la membrana basal (**Figura 5 e - f**). El porcentaje de túbulos dañados fue mayor en el grupo JE4 (51.71 ± 7.37 %) comparado con el grupo JE2 (24.05 ± 2.80 %) y el grupo control (24.81 ± 3.22 %; ANOVA de una vía, $F_{(2,18)}=10.27$, $P=0.001$; **Figura 5 g**).

1.40.2 Médula renal de ratas jóvenes

En la médula renal del grupo control se observó un adecuado arreglo histológico con buena organización de los haces vasculares, la membrana basal de epitelio plano simple de los haces vasculares se observó bien definidas y sin alteraciones, la porción ascendente gruesa del asa de Henle se observó en la periferia de los haces vasculares con un epitelio bien conformado y sin alteraciones (**Figura 6 a-c**). En la médula renal del grupo JE2 se observó dispersión de algunos haces vasculares, la membrana basal del epitelio plano simple de los haces vasculares se observó con engrosamiento. Algunos túbulos de la porción ascendente gruesa del asa de Henle se observaron atrofiado, sin embargo, la mayoría se encontró con un epitelio bien conformado y sin alteraciones (**Figura 6 d-f**). En la médula renal del grupo JE4 se observó desorganización de los haces vasculares, la membrana basal de epitelio plano simple de los haces vasculares se observó con daño y con rupturas, la porción ascendente gruesa del asa de Henle se observó entre los haces vasculares, túbulos con epitelio desorganizado, membranas basales engrosadas, irregulares e infiltración de células inmunes a los sitios dañados (**Figura 6 g-i**).

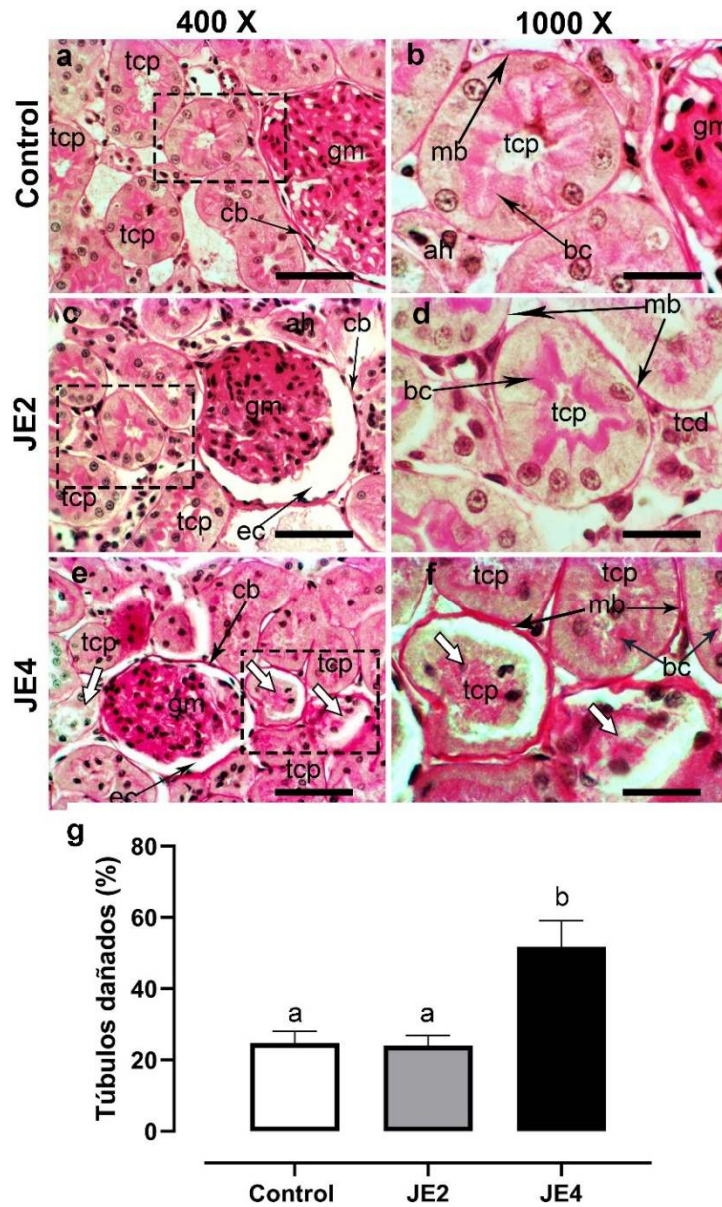


Figura 5. Efecto del estrés crónico variable sobre daño tubular de la corteza renal.

Corteza renal del grupo control (a-b), corteza renal del grupo de jóvenes sometidos a estrés crónico variable de 2 semanas (JE2, c-d) y corteza renal del grupo de jóvenes sometidos a estrés crónico variable de 4 semanas (JE4, e-f). Túbulos contorneado proximal (tcp), glomérulos (gm), espacio capsular (ec), cápsula de Bowman (cb), membrana basal del epitelio tubular (mb), bordes cepillo (bc). Las flechas blancas señalan túbulos de la corteza renal con daño. Los recuadros negros de línea pintada señalan el lugar magnificado de la siguiente fotografía. Las barras negras representan 50 y 25 micrómetros en las fotos de 400 y 1000 aumentos, respectivamente. En la gráfica (g) se observa el porcentaje de túbulos dañados, se muestra la media \pm e.e. letras diferentes muestran diferencias significativas. ANOVA de una vía, Tukey's pos hoc $p < 0.05$ (n=7-8).

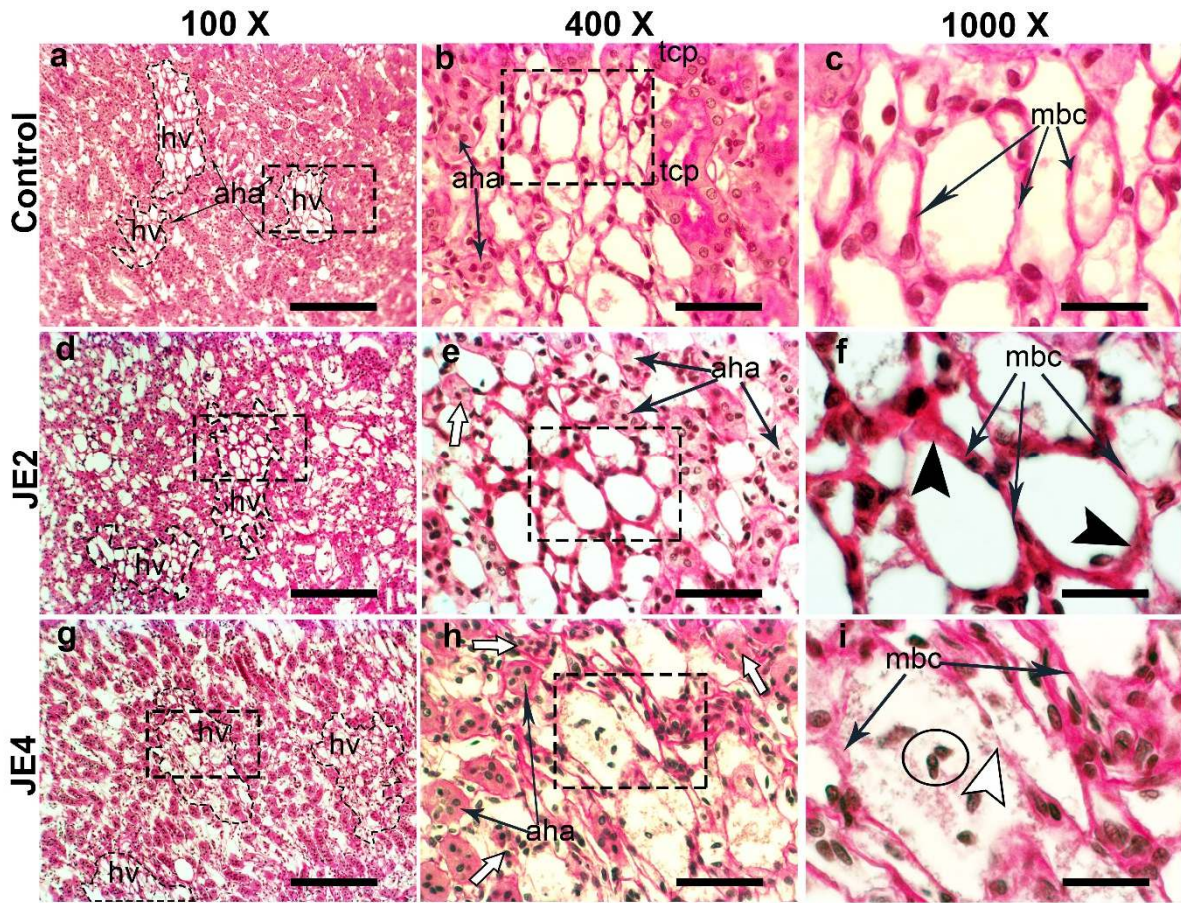


Figura 6. Efecto del estrés crónico variable sobre la histología de los haces vasculares y túbulos en la médula renal de ratas jóvenes.

Médula renal del grupo control (a-c), médula renal del grupo de jóvenes sometidos a estrés crónico variable de 2 semanas (JE2, d-f) y médula renal del grupo de jóvenes sometidos a estrés crónico variable de 4 semanas (JE4, g-i). Las líneas punteada de color negro delimitan los haces vasculares (hv), los recuadros punteados de color negro muestran el lugar de aumento de los haces vasculares, las flechas de color blanco señalan asas de Henle atrofiadas, las puntas de flecha negra señalan membrana basal engrosada y la punta de flecha blanca señala el lugar donde se rompió la membrana basal, el círculo negro muestra la infiltración de células inmunes. Porción ascendente gruesa del asa de Henle (aha), membrana basal del epitelio plano simple de los haces vasculares (mbc). Las barras negras representan 200, 50 y 25 micrómetros en las fotos de 100, 400 y 1000 aumentos, respectivamente.

1.41 Efecto inmediato y tardío del estrés crónico variable sobre el daño corpuscular de ratas jóvenes.

Cualitativamente observamos en el grupo control corpúsculos sin acumulación de colágeno, cápsula de Bowman bien definida, glomérulos sin adherencias ni obliteraciones. (**Figura 7 a-c**). En los corpúsculos del grupo JE2 observamos corpúsculos sin acumulación de colágeno, cápsula de Bowman bien definida, glomérulos sin adherencias ni obliteraciones (**Figura 7 d – f**). En los corpúsculos del grupo E4 se observaron corpúsculo con mayor acumulación de colágeno principalmente en los glomérulos. Los glomérulos se observaron con regiones de fibrosis, obliteración del penacho glomerular y pérdida de la cápsula de Bowman. Esta descripción coincidió con glomerulosclerosis focal y segmentaria (**Figura 7 g - i**). El porcentaje de corpúsculos con daño fue menor en el grupo JE2 ($8.64 \pm 1.95 \%$), comparado con el grupo control. En el grupo JE4 ($49.54 \pm 0.97\%$) el porcentaje de corpúsculos con daño fue mayor comparado con el grupo JE2 y con el grupo control ($28.69 \pm 2.97 \%$, ANOVA de una vía, $F_{(2,18)}=92.09$, $P<0.001$; **Figura 7 j**).

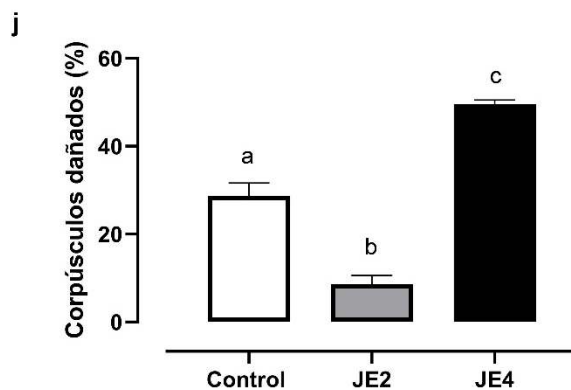
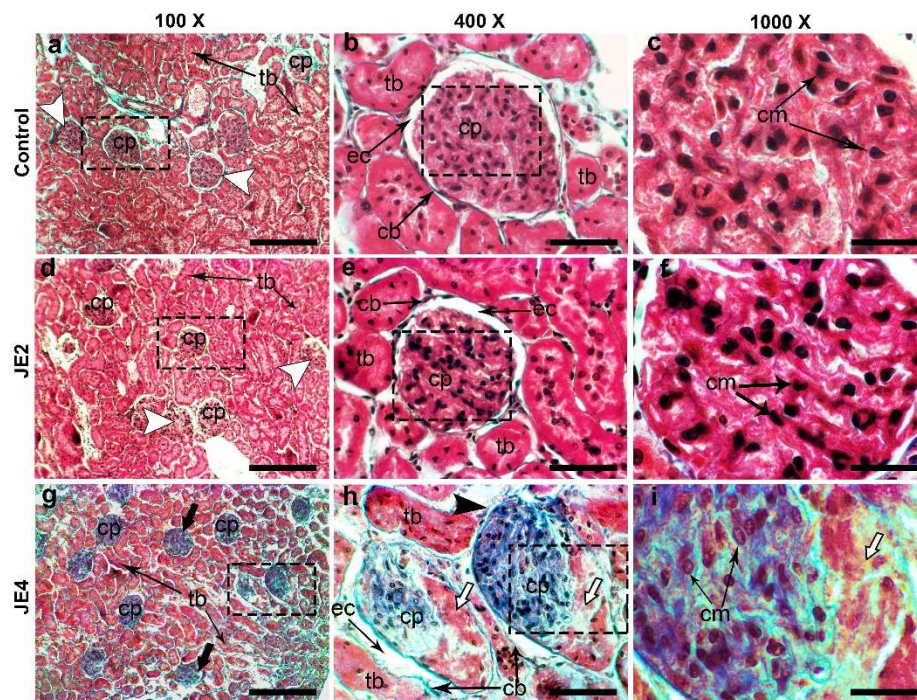


Figura 7. Efecto del estrés crónico variable sobre el daño corpuscular de ratas jóvenes.

Se muestran corpúsculos del grupo control (a-c), corpúsculos del grupo de ratas jóvenes sometidas a estrés crónico variable durante 2 semanas (JE2; d-f) y corpúsculos del grupo de ratas jóvenes sometidas a estrés crónico variable de 4 semanas (JE4, g-i). Los recuadros punteados de color negro muestran el lugar de aumento de los corpúsculos renales. Las puntas de flecha blanca señalan corpúsculos renales normales, las flechas negras señalan corpúsculos renales con acumulación excesiva de colágeno, las flechas blancas señalan las regiones obliteradas de los corpúsculos renales, la punta de flecha negra señala la alteración de la membrana basal de la cápsula de Bowman, túbulos renales (tb), corpúsculos renales (cp), cápsula de Bowman (cb), espacio capsular (ec), células mesangiales (cm). Las barras negras representan 200, 50 y 25 micrómetros en las fotos de 100, 400 y 1000 aumentos, respectivamente. En la gráfica (j) se observa el porcentaje de túbulos dañados, Se muestra la media \pm e.e. letras diferentes muestran diferencias significativas. ANOVA de una vía, Tukey's pos hoc $p < 0.05$ (n=7-8).

1.42 Efecto inmediato y tardío del estrés crónico variable sobre la concentración de triglicéridos renales y estrés oxidativo.

1.42.1 Triglicéridos renales

La concentración de triglicéridos renales no se modificó en los grupos JE2 (9.75 ± 1.91 mg/g de riñón) y JE4 (11.68 ± 4.48 mg/g de riñón) comparado al grupo control (6.07 ± 3.27 mg/g de riñón; ANOVA de una vía $F_{(2,21)}=0.7054$, $P=0.51$; **Figura 8**)

1.42.2 Estrés oxidativo

En los jóvenes la capacidad antioxidante del riñón evaluada por la actividad CAT y actividad de SOD fue similar entre los grupos (**Tabla 4**). La capacidad reductora férrica (FRP) fue menor en el grupo JE2 comparado con el grupo control y JE4 (**Tabla 4**). El porcentaje de TBARS fue similar entre grupos (**Tabla 4**).

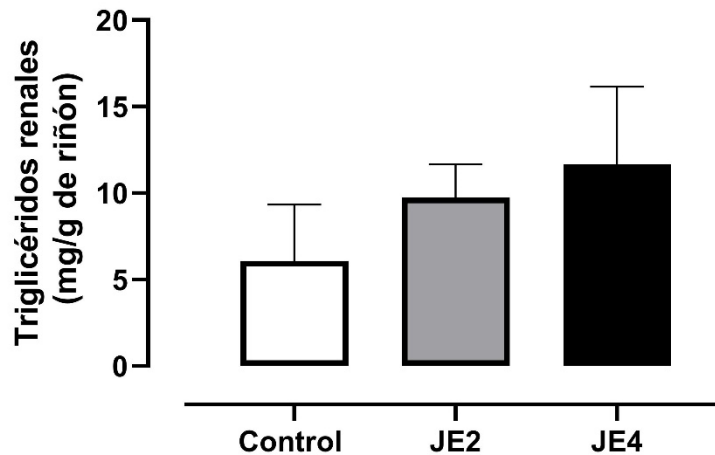


Figura 8. Efecto del estrés crónico variable sobre la concentración de triglicéridos renales.

Ratas jóvenes sometidas a estrés crónico variable durante 2 semanas (JE2) y Ratas jóvenes sometidas a estrés crónico variable durante 4 semanas (JE4). Se muestra la media \pm e.e. ANOVA de una vía, Tukey's pos hoc $p < 0.05$ como diferencias significativas. (n=7-8).

	Control	JE2	JE4	ANOVA y valor de p
Actividad de CAT (%)	100 ± 1.95	108.8 ± 4.97	101.4 ± 2.27	F _(2,20) =1.965, p=0.17
Actividad de SOD (%)	100 ± 30.88	76.18 ± 7.81	89.39 ± 22.78	F _(2,20) =0.289, p=0.75
FRAP (%)	100 ± 4.68 ^a	31.66 ± 3.85 ^b	104.2 ± 2.56 ^a	F _(2,20) =110.8, p<0.001
TBARS (%)	100 ± 2.06	115.7 ± 10.51	89.24 ± 12.99	F _(2,21) =1.873, p=0.18

Tabla 4. Efecto del estrés crónico variable sobre el estrés oxidativo.

Ratas jóvenes sometidas a estrés crónico variable durante 2 semanas (JE2), ratas jóvenes sometidos a estrés crónico variable durante 4 semanas (JE4). En la tabla se muestra la media ± e.e, el valor de p, el valor de ANOVA de una vía. Tukey's pos hoc p<0.05 como diferencias significativas. Letras diferentes representan diferencias significativas (n=7-8 / grupo).

1.43 Efecto inmediato y tardío del estrés crónico variable sobre presencia de TNF- α como indicador de inflamación en el riñón

En los jóvenes del grupo control se observó nulo marcaje tubular. En los corpúsculos renales se observó inmunoreactividad a TNF- α en células del glomérulo (**figura 9 a - c**). En el grupo JE2 se observó nulo marcaje tubular. En los corpúsculos renales se observó inmunoreactividad contra el TNF- α en células del glomérulo (**figura 9 d - f**). En el grupo JE4 se observó inmunoreactividad a TNF- α en el epitelio tubular, en regiones dañadas de los glomérulos y en las células glomerulares (**figura 9 g- i**).

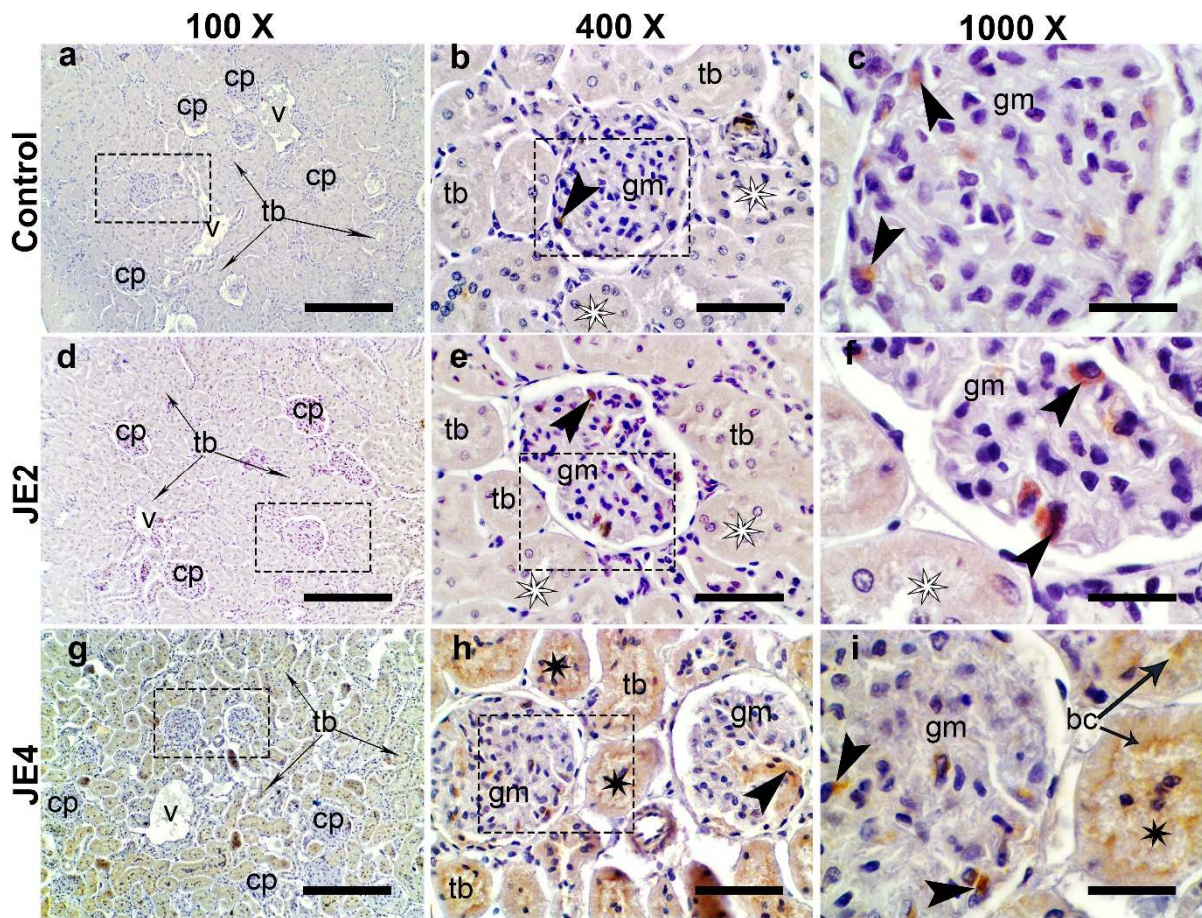


figura 9. Efecto del estrés crónico variable sobre la inflamación en ratas jóvenes.

Se observa la expresión de TNF- α del grupo control (a- c), grupo jóvenes sometidos a estrés crónico variable durante 2 semanas (JE2, d-f) y grupo jóvenes sometido a estrés crónico variable durante 4 semanas (JE4, g-i). Los recuadros punteados de color negro muestran el lugar de aumento de la fotografía siguiente. La cabeza de flecha de color negro señala células con inmunoreactividad al TNF- α en el corpúsculo. Los asteriscos de color blanco señalan los túbulos sin inmunoreactividad al TNF- α , los asteriscos de color negro señalan a túbulos con inmunoreactividad al TNF- α . Túbulos (tb), corpúsculos (cp), glomérulo (gm), bordes cepillo (bc), vasos sanguíneos (v). Las barras negras representan 200, 50 y 25 micrómetros en las fotos de 100, 400 y 1000 aumentos, respectivamente.

1.44 Efecto inmediato y tardío del estrés crónico variable sobre parámetros de crecimiento, alimentación y peso del riñón en ratas adultas.

El peso corporal del grupo AE4 fue menor comparado con el grupo control y el grupo AE2 (**Tabla 5**). La ingesta de alimento fue mayor en el grupo AE2 comparado con el grupo control y el grupo AE4 (**Tabla 5**). La ingesta de agua fue mayor en el grupo AE2 comparado con el grupo control y el grupo AE4. El peso del riñón y el índice de adiposidad fueron similares entre grupos (**Tabla 5**).

1.45 Efecto inmediato y tardío del estrés crónico variable sobre los parámetros de la función renal en ratas adultas.

La concentración de creatinina sérica no se modificó en los grupos AE2 (1.87 ± 0.25 mg/dL) y AE4 (1.56 ± 0.33 mg/dL) comparados con el grupo control (1.66 ± 0.31 mg/dL; ANOVA de una vía, $F_{(2, 21)} = 0.282$, $P=0.76$ **Figura 10 a**). La concentración de creatinina urinaria no se modificó en los grupos AE2 (144.2 ± 16.08 mg/dL) y AE4 (103.3 ± 11.15 mg/dL) comparado al grupo control (105.8 ± 14.68 mg/dL, ANOVA de una vía, $F_{(2, 21)} = 2.627$, $P=0.10$, **Figura 10 b**).

1.46 Efecto inmediato y tardío del estrés crónico variable sobre la histomorfometría renal en ratas adultas.

1.46.1 Corpúsculos

El número de corpúsculos renales en el grupo AE4 fue menor que el grupo AE2. El área corpuscular, el porcentaje de corpúsculos sin glomérulos, el porcentaje de corpúsculos chicos y grandes fue similar entre grupos (**Tabla 6**).

1.46.2 Glomérulos

El área glomerular, el porcentaje de glomérulos chicos y el porcentaje de glomérulo grandes fue similares entre grupos (**Tabla 6**).

1.46.3 Cápsula de Bowman

El área del espacio capsular fue mayor en el grupo AE4 comparado con el grupo control. El porcentaje de espacio capsular chico fue menor en el grupo AE4 comparado con el grupo control. El porcentaje del espacio capsular grande fue similar entre grupos (**Tabla 6**).

	Control	AE2	AE4	ANOVA de una vía y valor de p
Ganancia de peso corporal (g)	46.58 ± 4.39 ^a	56.44 ± 5.23 ^a	27.33 ± 4.36 ^c	F _(2,21) = 10.03, P < 0.001
Ingesta de alimento (g/100 g de peso corporal/día)	7.05 ± 0.16 ^a	9.29 ± 0.99 ^b	6.71 ± 0.09 ^a	F _(2,21) = 5.741, P < 0.01
Ingesta de agua (mL/100 g de peso corporal/día)	11.88 ± 0.39 ^a	15.3 ± 0.51 ^b	11.51 ± 0.45 ^a	F _(2,21) = 20.71, P < 0.001
Peso del riñón (g/100 g de peso corporal)	0.34 ± 0.006	0.33 ± 0.009	0.34 ± 0.006	F _(2,21) = 1.029, P = 0.37
Índice de adiposidad (g/100 g de peso corporal)	2.65 ± 0.30	2.57 ± 0.27	2.32 ± 0.19	F _(2,21) = 0.437, P = 0.65

Tabla 5. Efecto del estrés crónico variable sobre la ganancia de peso corporal, ingesta de alimento, agua, peso del riñón e índice de adiposidad en ratas adultas.

Ratas adultas sometidas a estrés crónico variable durante 2 semanas (AE2), ratas adultas sometidos a estrés crónico variable durante 4 semanas (AE4). En la tabla se muestra la media ± e.e, el valor de p, el valor de ANOVA de una vía. Tukey's pos hoc p < 0.05 como diferencias significativas. Letras diferentes representan diferencias significativas (n=7-8 / grupo).

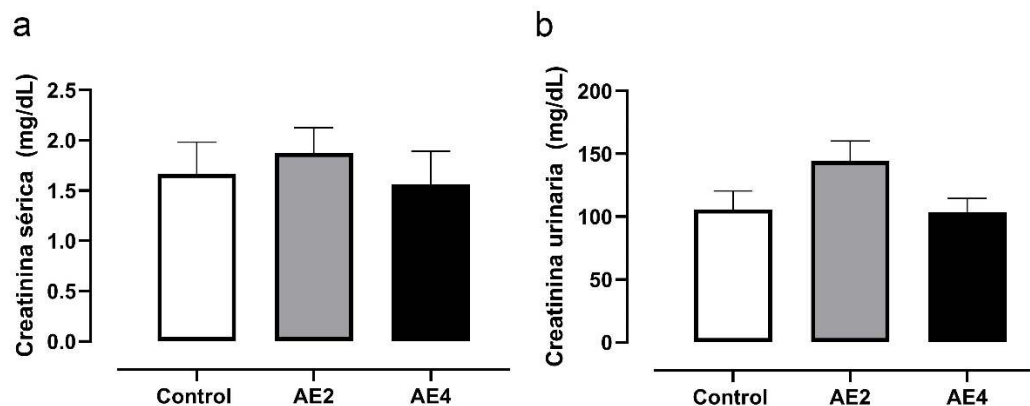


Figura 10. Efecto del estrés crónico variable sobre la función renal de ratas adultas.

Concentración de creatinina sérica (a) y concentración de creatinina urinaria (b). Ratas adultas sometidas a estrés crónico variable durante 2 semanas (AE2), ratas adultas sometidas a estrés crónico variable durante 4 semanas (AE4). Se muestra la media ± e.e. ANOVA de una vía, Tukey's pos hoc p < 0.05 como diferencias significativas. (n=7-8).

1.46.4 Túbulo contorneado proximal

El área del túbulo contorneado proximal en los grupos AE2 y AE4 fueron similares al grupo control (**Tabla 6**).

1.46.5 Fibrosis renal

En el grupo control se observaron menor cantidad de fibras de colágeno, bien delimitadas sin invasión al intersticio tubular (**Figura 11 a y d**). en el grupo AE2 se observaron mayor cantidad de fibras de colágeno que invaden el espacio intersticial entre los túbulos renales y se aprecia una mayor acumulación de fibras de colágeno en sitios de daño tubular que remplazaron a estructuras tubulares (**Figura 11 d y e**). En el grupo AE4 se observaron fibras de colágeno entre el intersticio de túbulos sin daño (**Figura 11 c y f**). En los adultos el porcentaje de área con fibrosis fue mayor en el grupo AE2 (0.072 ± 0.016 %) comparado con el grupo AE4 (0.031 ± 0.009 %) y el grupo control (0.007 ± 0.003 %; ANOVA de una vía $F_{(2, 18)} = 9.115$, $P=0.002$; **Figura 11 g**).

Corpúsculos	Control	AE2	AE4	ANOVA de una vía y valor de p
No. de corpúsculos	71.38 ± 9.22 ^a	100.10 ± 6.21 ^{ab}	52.63 ± 10.48 ^{ac}	F (2, 21) =7.364, P=0.004
Área corpuscular (µm ²)	6716.0 ± 260.7	9182.0 ± 1905.0	7278.0 ± 258.90	F (2, 21) =1.332, P=0.29
Corpúsculos sin glomérulos (%)	32.63 ± 8.26	36.4 ± 3.48	26.04 ± 6.40	F (2, 21) =0.686, P=0.51
Corpúsculos chicos (%)	20.91 ± 4.57	20.98 ± 2.89	13.54 ± 3.72	F (2, 21) =1.271, P=0.30
Corpúsculos grandes (%)	79.48 ± 15.03	79.03 ± 4.45	86.46 ± 16.93	F (2, 21) =1.135, P=0.87
Glomérulos				
Área glomerular (µm ²)	5707.0 ± 196.5	6631.0 ± 325.0	5633.0 ± 375.9	F (2, 21) =3.244, P=0.06
Glomérulos chicos (%)	15.31 ± 4.46	11.42 ± 3.86	18.75 ± 5.94	F (2, 21) =0.648, P=0.53
Glomérulos grandes (%)	84.78 ± 14.92	88.58 ± 4.70	81.25 ± 16.33	F (2, 21) =0.078, P=0.92
Cápsula de Bowman				
Área del espacio capsular (µm ²)	1271.0 ± 130.7 ^a	1610.0 ± 95.69 ^{ab}	1733.0 ± 141.4 ^b	F (2, 21) =3.706, P=0.04
Espacio capsular chico (%)	40.11 ± 8.51 ^a	27.1 ± 3.41 ^{ab}	16.57 ± 6.07 ^b	F (2, 21) =3.442, P=0.05
Espacio capsular grande (%)	59.89 ± 9.34	72.90 ± 6.52	83.43 ± 17.97	F (2, 21) =0.921, P=0.41
Túbulo contorneado proximal				
Área (µm ²)	1284.0 ± 40.97	1391.0 ± 52.28	1390.0 ± 78.66	F (2, 21) =1.060, P=0.36

Tabla 6. Efecto del estrés crónico variable sobre la histomorfometría renal de ratas adultas.

Ratas adultas sometidas a estrés crónico variable durante 2 semanas (AE2), ratas adultas sometidos a estrés crónico variable durante 4 semanas (AE4). En la tabla se muestra la media ± e.e, el valor de p, el valor de ANOVA de una vía. Tukey's pos hoc p<0.05. Letras diferentes representan diferencias significativas (n=7-8 / grupo).

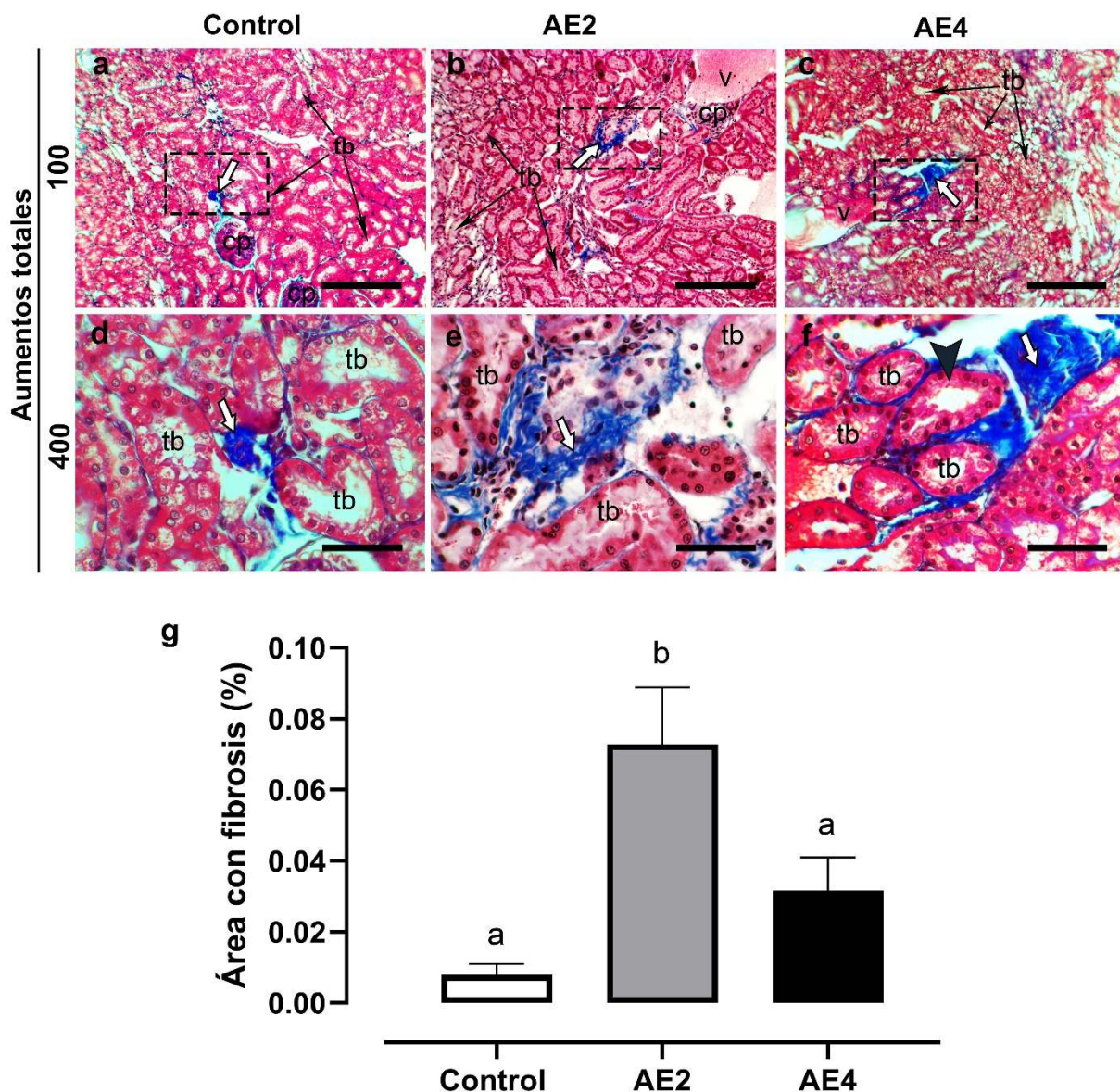


Figura 11. Efecto del estrés crónico variable sobre la fibrosis renal en ratas macho adultos.

Se muestran imágenes representativas del grupo control (a y d), ratas adultas sometidas a estrés crónico variable durante 2 semanas (AE2, b y e) y ratas adultas sometidas a estrés crónico variable durante 4 semanas (AE4, c y f). Las flechas blancas señalan las regiones con fibrosis tubulointersticial, los recuadros negros de línea pintada señalan el lugar magnificado de la siguiente fotografía, la cabeza de flecha negra señala túbulos rodeados por fibras de colágeno, túbulos (tb), corpúsculos(cp) y vasos sanguíneos. Las barras negras representan 200 y 50 micrómetros en las fotos de 100 y 400 aumentos totales, respectivamente. En la gráfica (g) Se muestra la media \pm e.e. letras diferentes muestran diferencias significativas. ANOVA de una vía, Tukey's pos hoc $p < 0.05$ (n=7-8).

1.47 Efecto inmediato y tardío del estrés crónico variable sobre el daño tubular en la corteza y médula renal de ratas adultas

1.47.1 Corteza renal de adultos

Los túbulos del grupo control se observan sin alteraciones en las membranas basales, el epitelio tubular está conservado y bien organizado, el borden cepillo se observa adherido y distribuido en la luz del túbulo renal (**Figura 12 a -b**). En el grupo AE2 se observa túbulos atrofiados, epitelio tubular separado de la membrana basal, túbulos apoptóticos y núcleo picnóticos (**Figura 12 c-d**). En el grupo AE4 se observan túbulos sin alteraciones en las membranas basales, el epitelio tubular está conservado y bien organizado, el borden cepillo se observa adherido y distribuido en la luz del túbulo renal (**Figura 12 e-f**). El porcentaje de túbulos dañados en el grupo AE2 (9.62 ± 1.21 %) fue mayor que en el grupo control (4.54 ± 1.09 %) y el grupo AE4 (6.64 ± 0.96 %, ANOVA de una vía $F_{(2,18)}=5.439$, $P= 0.01$; **Figura 12 g**).

1.47.2 Médula renal de adultos

En la médula renal del grupo control (**Figura 13 a-c**), E2 (**Figura 13 d-f**) y E4 (**Figura 13 g-i**) se observó un adecuado arreglo histológico con buena organización de los haces vasculares, la membrana basal de epitelio plano simple de los haces vasculares se observó bien definidas y sin alteraciones, la porción ascendente gruesa del asa de Henle se observó en la periferia de los haces vasculares con un epitelio bien conformado y sin alteraciones.

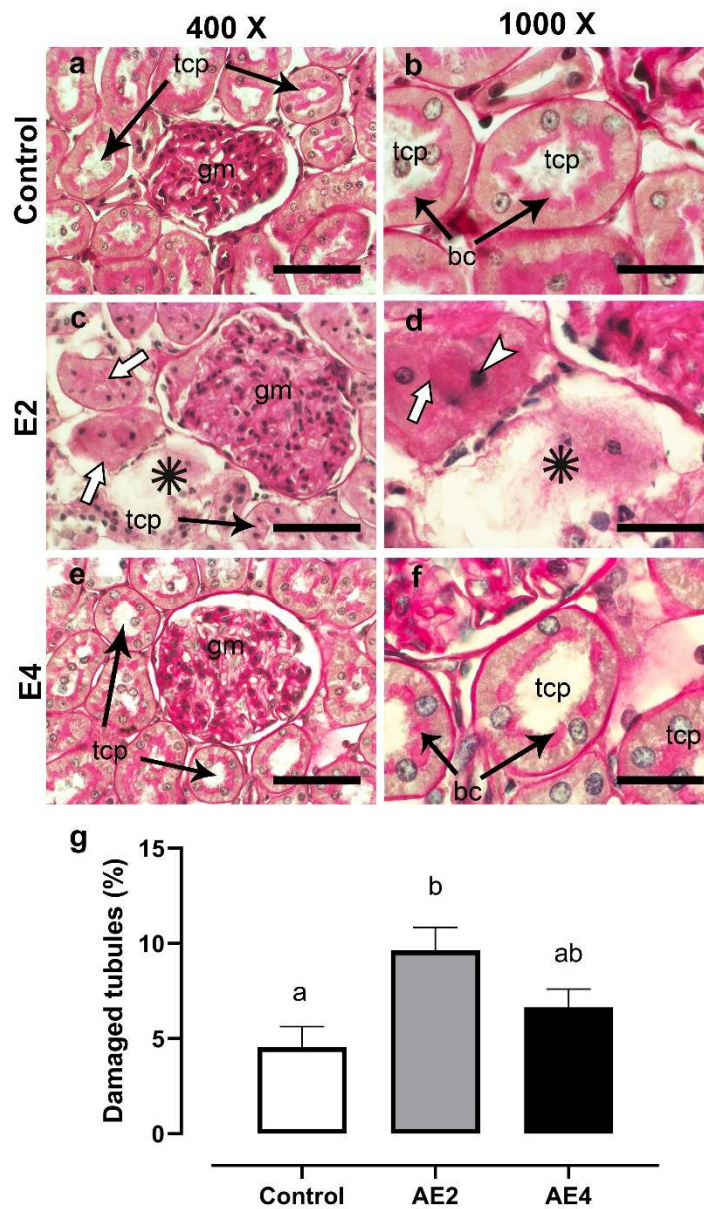


Figura 12. Efecto del estrés crónico variable sobre la histología de la corteza renal de ratas adultas. Corteza renal del grupo control (a-b), ratas adultas sometidos a estrés crónico variable durante 2 semanas (AE2, c-d) y ratas adultas sometidos a estrés crónico variable durante 4 semanas (AE4, imágenes e-f). Túbulos contorneado proximal (tcp), glomérulos (gm), borden cepillo (bc), Las blancas señalan túbulos de la corteza renal con daño. La cabeza de flecha blanca señala núcleos picnóticos y el asterisco de color negro señala un túbulo apoptótico. Los recuadros negros de línea pinteada señalan el lugar magnificado de la siguiente fotografía. Las barras negras representan 200, 50 y 25 micrómetros en las fotos de 100, 400 y 1000 aumentos, respectivamente. En la gráfica (g) Se muestra la media \pm e.e. letras diferentes muestran diferencias significativas. ANOVA de una vía, Tukey's pos hoc $p < 0.05$ (n=7-8).

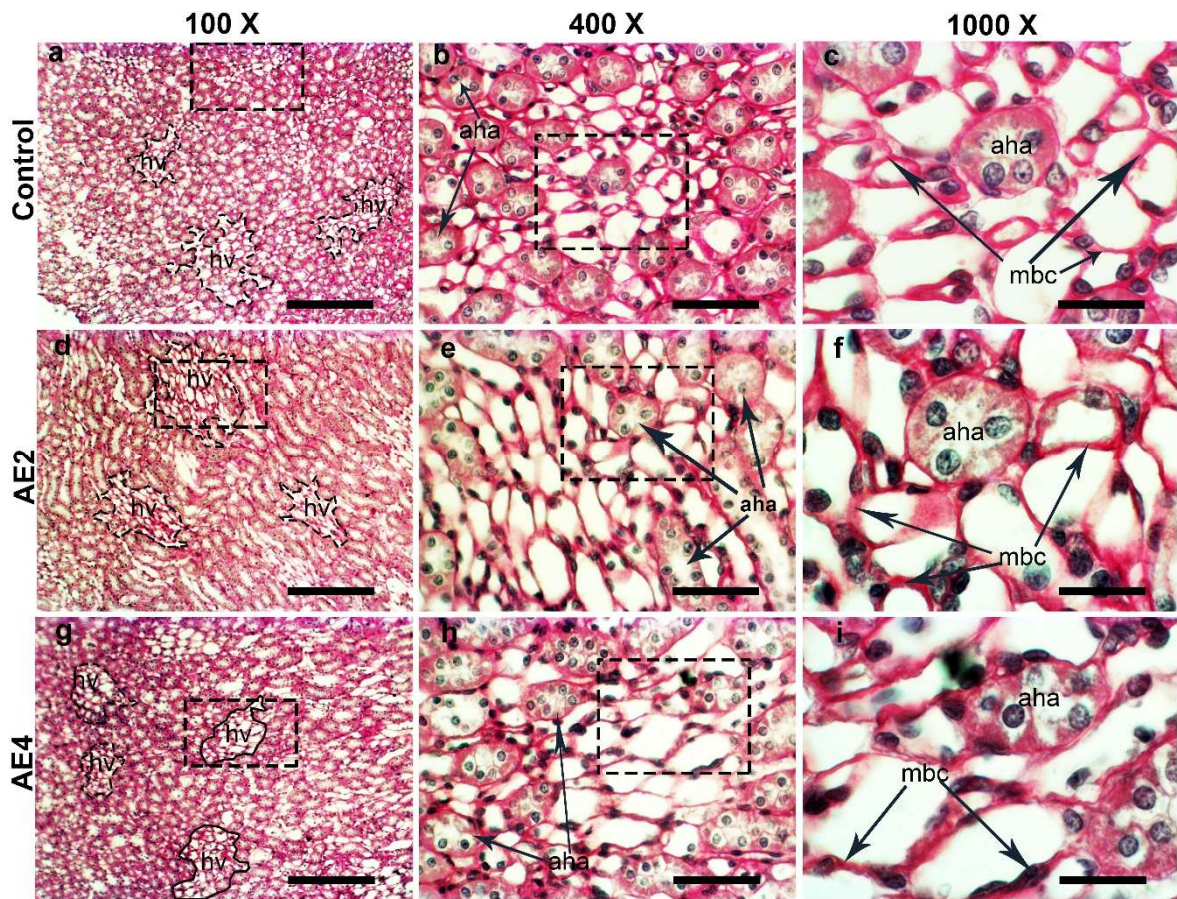


Figura 13. Efecto del estrés crónico variable sobre la histología de los haces vasculares en la médula renal de ratas adultas.

Se muestran imágenes representativas de la médula renal del grupo control (a-c), ratas adultas sometidas a estrés crónico variable durante 2 semanas (AE2, d-f) y ratas adultas sometidas a estrés crónico variable durante 4 semanas (AE4, imágenes g-i). Las líneas punteada de color negro delimitan los haces vasculares (hv), los recuadros punteados de color negro muestran el lugar de aumento de los haces vasculares. Porción ascendente gruesa del asa de Henle (aha), membrana basal del epitelio plano simple de los haces vasculares (mbc). Las barras negras representan 200, 50 y 25 micrómetros en las fotos de 100, 400 y 1000 aumentos, respectivamente.

1.48 Efecto inmediato y tardío del estrés crónico variable sobre el daño corpuscular de ratas adultas.

En el grupo control observamos corpúsculos sin acumulación de colágeno, cápsula de Bowman bien definida, glomérulos completos sin adherencias ni obliteraciones. (**Figura 14 a-c**). En los corpúsculos del grupo AE2 observamos acumulación excesiva de colágeno, sin embargo, el glomérulo no presentó obliteraciones. La membrana basal de la cápsula de Bowman se observó normal con ligero aumento del colágeno (**Figura 14 d-f**). En los corpúsculos del grupo AE4 observamos acumulación excesiva de colágeno, sin embargo, el glomérulo no presentó obliteraciones. La membrana basal de la cápsula de Bowman se observó normal con ligero aumento del colágeno (**Figura 14 g-i**). En los adultos el porcentaje de corpúsculos con daño fue similar entre en el grupo AE2 (37.39 ± 3.30 %) y AE4 (42.23 ± 4.14 %) comparados con el grupo control (39.69 ± 3.15 %, ANOVA de una vía, $F_{(2,20)}=0.4693$, $p=0.63$; **Figura 14 j**).

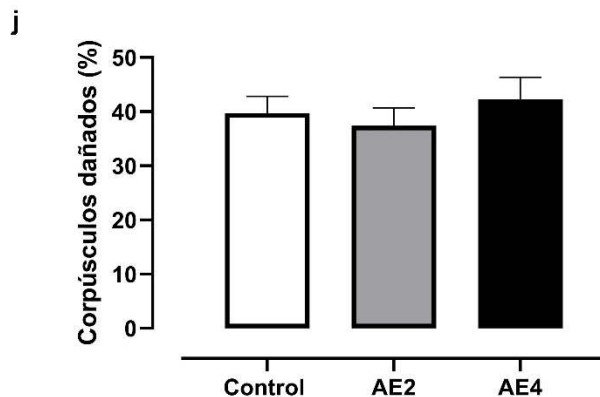
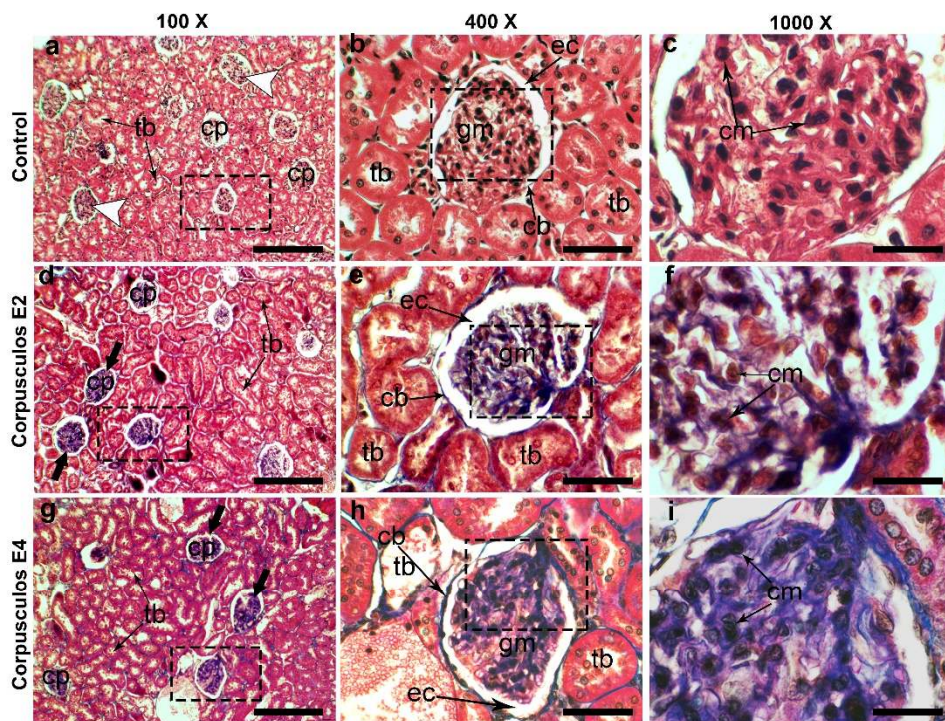


Figura 14. Efecto del estrés crónico variable sobre el corpúsculo renal de ratas adultas.

Se muestran corpúsculos del grupo control (a-c), corpúsculos del grupo de ratas adultas sometidas a estrés crónico variable durante 2 semanas (AE2; d-f) y corpúsculos del grupo de ratas adultas sometidas a estrés crónico variable de 4 semanas (AE4, g-i). Los recuadros punteados de color negro muestran el lugar de aumento de los corpúsculos renales. Las puntas de flecha blancas señalan corpúsculos renales normales, las flechas negras señalan corpúsculos renales con acumulación excesiva de colágeno. Túbulos renales (tb), corpúsculos renales (cp), cápsula de Bowman (cb), espacio capsular (ec), células mesangiales (cm). Las barras negras representan 200, 50 y 25 micrómetros en las fotos de 100, 400 y 1000 aumentos, respectivamente. En la gráfica (j) se observa el porcentaje de túbulos dañados, se muestra la media \pm e.e. ANOVA de una vía, Tukey's pos hoc $p < 0.05$ como diferencias significativas ($n=7-8$).

1.48.1 Triglicéridos renales

En los adultos la concentración de triglicéridos renales aumentó en el grupo AE2 (20.62 ± 3.12 mg/g de riñón) comparado con el control (4.05 ± 0.54 mg/g de riñón) y AE4 (4.71 ± 0.67 mg/g de riñón; ANOVA de una vía; $F_{(12,21)}=25.06$, $P<0.001$; **Figura 15**).

1.48.2 Estado antioxidante y estrés oxidativo

En los adultos, la capacidad antioxidante del riñón evaluada por la actividad CAT y actividad de SOD es similar entre los grupos (**Tabla 7**). En los adultos, la capacidad reductora férrica (FRP) disminuye en el grupo AE2 comparado con el grupo control y AE4 (**Tabla 7**). El porcentaje de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) fue mayor en el grupo AE2 comparado con el grupo control (**Tabla 7**). El porcentaje de TBARS del grupo AE4 fue similar al grupo control (**Tabla 7**).

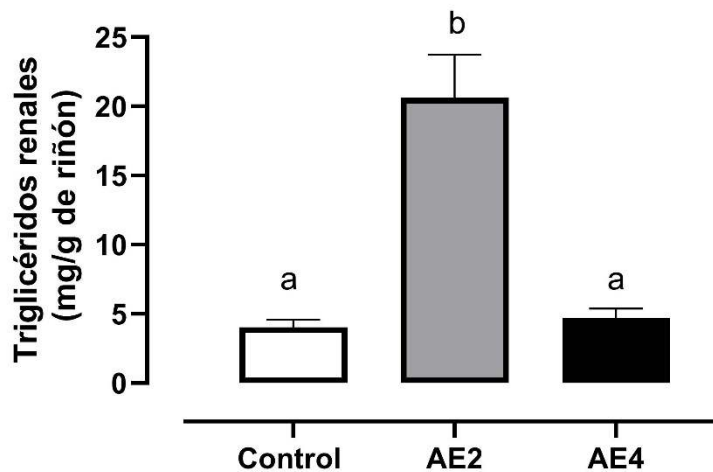


Figura 15. Efecto del estrés crónico variable sobre la concentración de triglicéridos renales en adultos.

Ratas adultas sometidas a estrés crónico variable durante 2 semanas (AE2) y ratas adultas sometidas a estrés crónico variable durante 4 semanas (AE4). Se muestra la media \pm e.e. letras diferentes muestran diferencias significativas. ANOVA de una vía, Tukey's pos hoc $p<0.05$ como diferencias significativas. (n=7-8).

	Control	AE2	AE4	ANOVA y valor de p
Actividad de CAT (%)	100 ± 5.54	109.8 ± 3.77	99 ± 6.17	F _(2,21) =1.280, p=0.30
Actividad de SOD (%)	100 ± 7.22	79.02 ± 2.16	87.32 ± 7.36	F _(2,21) =0.315, p=0.73
FRAP (%)	100 ± 6.79 ^a	37.79 ± 2.86 ^b	108.6 ± 6.46 ^a	F _(2,21) =46.61, p<0.001
TBARS (%)	100 ± 3.98 ^a	114.3 ± 3.34 ^b	102.0 ± 2.89 ^{ab}	F _(2,18) =5.056, p=0.02

Tabla 7. Efecto del estrés crónico variable sobre el estrés oxidativo de ratas adultas.

Ratas adultas sometidas a estrés crónico variable durante 2 semanas (AE2), ratas adultas sometidos a estrés crónico variable durante 4 semanas (AE4). En la tabla Se muestra la media ± e.e. letras diferentes muestran diferencias significativas. ANOVA de una vía, Tukey's pos hoc p<0.05 (n=7-8).

1.49 Efecto inmediato y tardío del estrés crónico variable sobre presencia de TNF- α como indicador de inflamación en el riñón

La expresión del TNF- α fue similar en los grupos AE2 (0.19 ± 0.06 unidades arbitrarias) y AE4 (0.19 ± 0.05 unidades arbitrarias) comparados con el grupo control (0.18 ± 0.03 unidades arbitrarias, ANOVA de una vía, F_(2,15)=0.020, P= 0.9801; Figura 16 a y b).

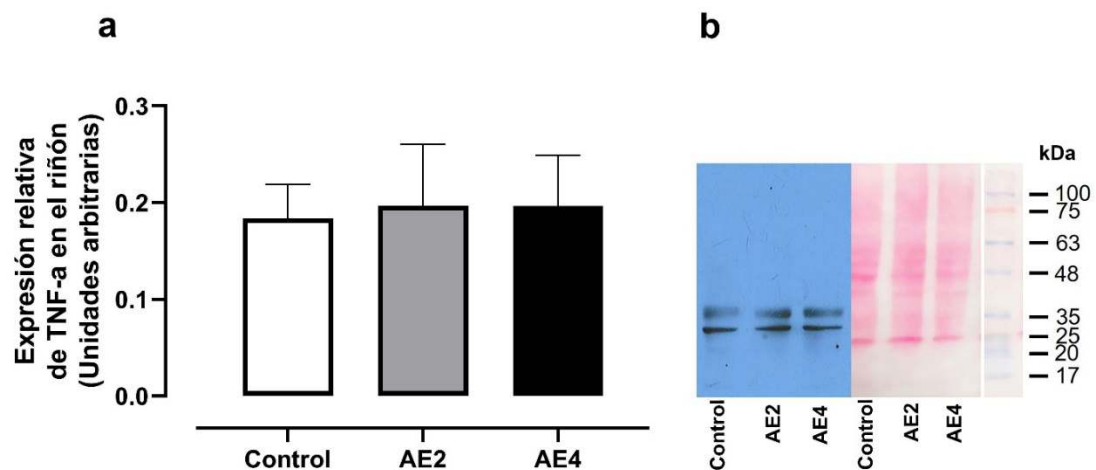


Figura 16. Efecto del estrés crónico variable sobre la inflamación en adultos.

Ratas adultas sometidas a estrés crónico variable durante 2 semanas (AE2), ratas adultas sometidos a estrés crónico variable durante 4 semanas (AE4). En la gráfica (a) se muestra la media ± e.e de la expresión relativa de TNF- α . En la tabla se muestra la media ± e.e, el valor de p, el valor de ANOVA de una vía. Tukey's pos hoc p<0.05 como diferencias significativas. Letras diferentes representan diferencias significativas (n=7-8 / grupo). En la figura (b) se muestran las bandas sobre la placa, rojo de Ponceau y el marcador de peso molecular

8 DISCUSIÓN

En las ratas jóvenes el estrés crónico variable (ECV) en 4 semanas indujo menor ganancia de peso corporal, aumento de la ingesta de agua, disminución en la excreción de sodio urinario, fibrosis tubulointersticial, daño tubular, daño corpuscular e inflamación. En las ratas adultas el estrés crónico variable indujo en 2 semanas menor ganancia de peso corporal, mayor fibrosis tubulointersticial, mayor daño tubular, acumulación de triglicéridos renales y estrés oxidativo. Por esto observamos que los efectos del estrés crónico variable en los jóvenes ocurren de forma tardía (grupo JE4), mientras que en los adultos los efectos son de forma temprana (grupo AE2). El ECV provocó, en jóvenes y en adultos, menor ganancia de peso corporal. Nuestros resultados son congruentes con otros trabajos que muestran una disminución en la ganancia de peso corporal, sin modificar la ingesta de alimento, (López-López y cols. 2018, Sequeira-Cordero y cols. 2019). Lo anterior es debido a que el ECV incrementa el gasto en energético y al no aumentar la ingesta de alimento se reduce la ganancia de peso corporal (Casanova y cols. 2019, Razzoli y Bartolomucci 2016). El aumento de la concentración sérica de aldosterona provoca inflamación en tejido adiposo (Kraus y cols. 2005) y en consecuencia se produce resistencia a la insulina en tejido adiposo. Esto promueve la lipólisis del tejido adiposo y menor ganancia de peso corporal (Al-Mansoori y cols. 2022). Observamos que las ratas jóvenes estresadas durante 4 semanas incrementan la ingesta de agua. La aldosterona provoca mayor recaptura de sodio en los túbulos colectores (Katsu y Iguchi 2016), lo que provoca menor excreción de sodio urinario. Al incrementar la recaptura de sodio provoca incremento de la osmolaridad plasmática que finalmente termina por estimular el centro de la sed en el hipotálamo mediante la inducción de la vasopresina (Armanini y cols. 2018).

En ratas jóvenes el estrés crónico variable provoca incremento en la concentración de aldosterona, pero no de corticosterona. En trabajos realizados con estrés crónico por restricción se ha probado que un estímulo estresante crónico es capaz de incrementar la concentración sérica de aldosterona (Sánchez-Solís y cols. 2020). Este efecto se debe a que la hormona adrenocorticotropa (ACTH) es un estimulante de la secreción de aldosterona ante el estrés físico o psicológico (Markou y cols. 2015). No observamos incremento en la concentración de corticosterona ante el estímulo de estrés crónico variable debido a que el protocolo que usamos es una modificación del protocolo usado por Zeeni y cols. 2013. Se ha probado que el protocolo

de estrés crónico variable es capaz de incrementar la concentración de corticosterona sérica (López-López y cols. 2018, López-López y cols. 2016). Sin embargo, los protocolos implementados que alcanzan este objetivo usan estímulos estresantes como shocks eléctricos en la patas de las ratas, exposición continua al luz blanca, deprivación de alimento y agua inmovilización y/o atrofia de extremidades, entre otros (Willner 2017). En nuestro protocolo seleccionamos, en la medida de lo posible, estímulos que mantengan activo al eje hipotálamo pituitaria adrenal (HPA), tratando de evitar aquellos estímulos estresantes que produzcan efectos directos sobre la inflamación, modificación del metabolismo y del balance hidroelectrolítico. Esto para evitar confusiones entre los efectos renales de la aldosterona y/o corticosterona con los estímulos estresantes aplicados en el protocolo. Por lo anterior creemos que los estímulos que hemos usado en este estudio no son tan severos como para mantener la concentración de corticosterona sérica alta en las ratas jóvenes. Esta premisa está basada en que una administración baja y constante de ACTH estimula la producción de aldosterona en la glándula adrenal pero no de corticosterona (Markou y cols. 2015). Es importante mencionar que por problemas técnicos no pudimos realizar la medición de aldosterona en los otros grupos. Sin embargo, observamos que la ingesta de agua incrementó en el grupo de los adultos con estrés crónico variable durante 2 semanas. Por lo que pensamos que la aldosterona podría estar incrementada como en los jóvenes.

El daño renal en los jóvenes se evidencia por la fibrosis tubulointersticial, el daño tubular, el glomeruloesclerosis e inflamación. Estos cambios patológicos que encontramos en este trabajo pensamos que se encuentra orquestados por la aldosterona ya que la administración de aldosterona es capaz de inducir inflamación (Martín-Fernández y cols. 2016), fibrosis tubulointersticial, glomeruloesclerosis y daño tubular mediante la activación del factor nuclear kappa de los linfocitos B (NF- κ B), este factor constituye la vía canónica de la inflamación celular y por lo tanto la expresión del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Fukuda y cols. 2011). La aldosterona es capaz de provocar daño en los podocitos mediante la inducción de daño mitocondrial y la activación del inflammasoma NLRP3 (Jiang y cols. 2021). El daño a los podocitos más que las anomalías mesangiales, es la que estimula el desarrollo de la esclerosis glomerular (Kretzler y cols. 1994). Estos efectos patológicos que produce la aldosterona están mediados por la activación de los receptores a mineralocorticoides, ya que, la inhibición de la

actividad de los receptores con espironolactona o eplerona inhibe el efecto patológico de la aldosterona (Fukuda y cols. 2011).

En los adultos observamos acumulación de triglicéridos, estrés oxidativo, daño tubular y fibrosis tubulointersticial. Estos efectos se encuentran relacionados entre sí. La acumulación de lípidos en el riñón es un factor que promueve el estrés oxidativo y la fibrosis renal. Las principales vías desreguladas en el daño renal son el metabolismo y la inflamación (Kang y cols. 2015). La acumulación de lípidos en células como podocitos y células tubuloepiteliales es común en el daño renal. Esta acumulación se debe a la disminución en la oxidación de lípidos en la mitocondria y consecuentemente este exceso provoca mayor expresión del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) (Yuan y cols. 2022), por lo que una mayor expresión de este promueve el desarrollo de la fibrosis renal (Zhang y cols. 2020). La acumulación de lípidos provoca mayor riesgo de oxidación debido a que hay mayor biodisponibilidad. La presencia de lípidos oxidados provoca la depleción de antioxidantes no enzimáticos en pacientes con enfermedad renal crónica (Hossain y cols. 2021). Lo anterior debido a que los antioxidantes no enzimáticos como la vitamina C, el tocoferol, minerales como el zinc y magnesio mantienen viable el sistema antioxidante enzimático (Shalini-Kapoor y Sivakumar-Joghi 2015). Esto es congruente con nuestros resultados debido a que no observamos depleción de las defensas enzimáticas antioxidantes. Significa que el sistema antioxidante no enzimático se ha depletado para mantener viable la defensa antioxidante enzimática.

En los jóvenes observamos un efecto tardío del daño renal quizás porque la maduración del riñón termina hasta los 70 días posnatales (El-Bestawy y cols. 2017). Hasta ahora no existen trabajos que comparen el daño renal entre jóvenes y adultos. Pero durante el periodo de desarrollo renal en los jóvenes, la remodelación tisular está activa de forma fisiológica y por lo tanto los mecanismos reguladores y reparadores podrían estar más activos que en los adultos esto puede provocar el retardo de la aparición del daño renal. En un trabajo realizado con un protocolo de estrés crónico por restricción de movimiento se sabe que el daño renal no es reversible al quitar el estímulo estresante y hay mayor efecto de daño renal en jóvenes que en adultos. En hallazgo de este trabajo observamos que los jóvenes presentan glomerulosclerosis focal y segmentaria, mientras que en los adultos tienen menor cantidad de glomérulos y los cambios patológicos en los jóvenes son de forma tardía mientras que en los adultos es de forma

temprana y la mayoría de las alteraciones patológicas se relacionan con la acumulación de triglicéridos renales y estrés oxidativo más que con la inflamación como en el caso de los jóvenes. Hasta ahora no se han investigado los efectos de la inflamación en el riñón dependiendo de la edad. Pero si sabemos que un estímulo de hiperoxia induce la infiltración de macrófagos en ratas infantas de un mes de edad y no afecta a ratas adultas de 5 meses de edad, pero si a ratas más viejas de 11 meses de edad (Sutherland y cols. 2016) esto sugiere que los individuos se vuelven más susceptibles a los procesos inflamatorios en edades muy tempranas o muy tardías de la vida. Todos los cambios patológicos anteriores ocurren sin cambios en la concentración de creatinina. La creatinina es indicador endógeno de la función renal que es ampliamente usado por su relación costo beneficio. La creatinina es un metabolito que puede ser excretado en el ultrafiltrado glomerular o por secreción tubular. Se puede excretar más creatinina mediante los túbulos renales, principalmente dañados, ocultando la deficiencia de la tasa de filtrado glomerular (Delanaye y cols. 2020). Por otro lado, también las nefronas sin daño pueden compensar la deficiencia de las nefronas dañadas y mantener una buena filtración renal. por último, también es importante señalar que los problemas de azotemia son visibles hasta que la tasa de filtrado glomerular se encuentra moderadamente disminuida, en el caso de los humanos debe ser menor de $60 \text{ mL/min/1.73m}^2$ (Glynn y Lightstone 2001). En experimentos posteriores se deberán tomar en cuenta otros indicadores de funcionalidad como la depuración de inulina, calcular la tasa de filtrado glomerular y realizar la medición de otros compuestos nitrogenados que en conjunto expresarán de forma integral la funcionalidad renal.

9 CONCLUSIÓN

El estrés crónico variable provoca hiperaldosteronismo, pero no incrementó la concentración de corticosterona sérica. El daño renal es más severo en ratas jóvenes que en adultas. Las ratas adultas tienen capacidad de adaptarse al estrés y recuperarse del daño que provoca el estrés crónico variable. El daño que se produce en ratas jóvenes es de forma tardía mediante la acción de la aldosterona e inflamación renal. Mientras que en los adultos el daño renal se presenta de forma temprana, mediado por el estrés oxidativo. En ambos grupos el estrés crónico variable se vuelve un factor de riesgo silente ante el desarrollo de la enfermedad renal crónica.

10 PERSPECTIVAS

1. El estrés crónico provoca hiperaldosteronismo que coexiste con el daño renal. Es importante investigar sobre este modelo, si al bloquear los receptores a mineralocorticoides para dilucidar la vía de señalización que usa la aldosterona en la inducción del daño renal.
2. En este trabajo investigamos el efecto del estrés crónico variable en jóvenes, sin embargo, en los individuos coexisten otros factores de riesgo importantes para el desarrollo de la enfermedad renal. Por esto es importante conocer si el estrés crónico, en coexistencia con otros factores de riesgo durante la juventud, aumentan el daño o la velocidad de aparición de este en la adultez.
3. El resultado de este trabajo, al igual que otros anteriores, señalan que el estrés crónico es capaz de provocar daño renal, es importante investigar a cerca de terapias que puedan usarse como prevención del daño renal en etapas tempranas que prevengan la inflamación y fibrosis renal.

11 REFERENCIAS

- Aguilar T, Navarro B, y Mendoza Perez JA. 2016. Endogenous antioxidants: A review of their role in oxidative stress. En: endogenous antioxidants: A review of their role in oxidative stress, a master regulator of oxidative stress - The transcription factor Nrf2.
- Al-Mansoori L, Al-Jaber H, Prince MS, y Elrayess MA. 2022. Role of inflammatory cytokines, growth factors and adipokines in adipogenesis and insulin resistance. *Inflammation*, 45(1): 31-44.
- Armanini D, Bordin L, Dona G, Andrisani A, Ambrosini G, y Sabbadin C. 2018. Relationship between water and salt intake, osmolality, vasopressin, and aldosterone in the regulation of blood pressure. *J Clin Hypertens (Greenwich)*, 20(10): 1455-1457.
- Bakkum L, Willemsen AM, Zoetebier L, y Bouts AH. 2019. A longitudinal study on the effects of psychological stress on proteinuria in childhood steroid-sensitive nephrotic syndrome. *J Psychosom Res*, 121: 8-13.
- Becherucci F, Roperto RM, Materassi M, y Romagnani P. 2016. Chronic kidney disease in children. *Clin Kidney J*, 9(4): 583-591.
- Benjamin O, y Lappin SL. 2021. End-stage renal disease. En: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.
- Bernardi S, Toffoli B, Zennaro C, Bossi F, Losurdo P, Michelli A, Carretta R, Mulatero P, Fallo F, Veglio F, y Fabris B. 2015. Aldosterone effects on glomerular structure and function. *J Renin Angiotensin Aldosterone Sys*, 16(4): 730-738.
- Blasi ER, Rocha R, Rudolph AE, Blomme EAG, Polly ML, y McMahan EG. 2003. Aldosterone/salt induces renal inflammation and fibrosis in hypertensive rats. *Kidney Int*, 63(5): 1791-1800.
- Casanova N, Beaulieu K, Finlayson G, y Hopkins M. 2019. Metabolic adaptations during negative energy balance and their potential impact on appetite and food intake. *Proc Nutr Soc*, 78.
- Chagnac A, Zingerman B, Rozen-Zvi B, y Herman-Edelstein M. 2019. Consequences of glomerular hyperfiltration: The role of physical forces in the pathogenesis of chronic kidney disease in diabetes and obesity. *Nephron*, 143(1): 38-42.
- Chai O-H, Song C-H, Park S-K, Kim W, y Cho E-S. 2013. Molecular regulation of kidney development. *Anat Cell Biol*, 46(1): 19-31.
- Chen H, Sun F, Zhong X, Shao Y, Yoshimura A, y Liu Y. 2013. Eplerenone-mediated aldosterone blockade prevents renal fibrosis by reducing renal inflammation, interstitial cell proliferation and oxidative stress. *Kidney Blood Press Res*, 37(6): 557-566.
- Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, Li Y, Wang X, y Zhao L. 2017. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, 9(6): 7204-7218.
- Christensen EI, Grann B, Kristoffersen IB, Skriver E, Thomsen JS, y Andreassen A. 2014. Three-dimensional reconstruction of the rat nephron. *Am J Physiol*, 306(6): F664-671.

- Collins AJ, Foley RN, Chavers B, Gilbertson D, Herzog C, Ishani A, Johansen K, Kasiske BL, Kutner N, Liu J, St. Peter W, Guo H, Hu Y, Kats A, Li S, Maloney J, Roberts T, Skeans M, Snyder J, y Agodoa L. 2014. 2013 usrds annual data report: atlas of chronic kidney disease and end-stage renal disease in the United States. *Am J Kidney Dis*, 63: e1-e478.
- Condon EM. 2018. Chronic stress in children and adolescents: a review of biomarkers for use in pediatric research. *Biol Res Nurs*, 20(5): 473-496.
- Corona-Pérez A, Díaz-Muñoz M, Cuevas-Romero E, Luna-Moreno D, Valente-Godínez H, Vázquez-Martínez O, Martínez-Gómez M, Rodríguez-Antolín J, y Nicolás-Toledo L. 2017. Interactive effects of chronic stress and a high-sucrose diet on nonalcoholic fatty liver in young adult male rats. *Stress*, 20(6): 608-617.
- Correia-Costa L, Azevedo A, y Caldas Afonso A. 2019. Childhood obesity and impact on the kidney. *Nephron*, 143(1): 8-11.
- Delanaye P, White CA, Ebert N, y Rule AD. 2020. Chapter 4 - Assessing kidney function. En: *Chronic Renal Disease (Second Edition)*. Kimmel, PL y ME Rosenberg (Eds.), (pp. 37-54): Academic Press.
- Desai SN, Farris FF, y Ray SD. 2014. Lipid peroxidation. En: *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*. Wexler, P (Ed.), (pp. 89-93). Oxford: Academic Press.
- Djudjaj S, y Boor P. 2019. Cellular and molecular mechanisms of kidney fibrosis. *Mol Aspects Med*, 65: 16-36.
- El-Bestawy EM, Hegab AS, Abdel Hamid RA, y Sewelam AS. 2017. Postnatal developmental changes of the kidneys of the albino rat. *Egypt. J. Histol*, 69(6): 2711-2721.
- Farris AB, y Colvin RB. 2012. Renal interstitial fibrosis: mechanisms and evaluation. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 21(3): 289-300.
- Frisbee JC, Brooks SD, Stanley SC, y d'Audiffret AC. 2015. An unpredictable chronic mild stress protocol for instigating depressive symptoms, behavioral changes and negative health outcomes in rodents. *J Vis Exp*(106): 53109.
- Fukuda S, Horimai C, Harada K, Wakamatsu T, Fukasawa H, Muto S, Itai A, y Hayashi M. 2011. Aldosterone-induced kidney injury is mediated by NFκB activation. *Clin Exp Nephrol*, 15(1): 41-49.
- Gallegos J, Langley A, y Villegas D. 2012. Anxiety, depression, and coping skills among mexican school children: a comparison of students with and without learning disabilities. *Learn Disabil Q*, 35(1): 1-35.
- Gallo-Payet N, Martinez A, y Lacroix A. 2017. Editorial: acth action in the adrenal cortex: from molecular biology to pathophysiology. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 8: 101.
- Garbarino S, y Magnavita N. 2015. Work stress and metabolic syndrome in police officers. a prospective study. *PloS one*, 10(12): e0144318.
- Glynn PA, y Lightstone L. 2001. Acute renal failure. *Clinical medicine (London, England)*, 1(4): 266-273.

- Gómez-Sánchez CE, Gómez-Sánchez EP, y Mihailidou AS. 2018. Chapter 28 - aldosterone/mineralocorticoid receptors and their renal effects: molecular biology and gene regulation. En: Textbook of Nephro-Endocrinology (Second Edition). Singh, AK y GH Williams (Eds.), (pp. 493-515): Academic Press.
- Gómez-Sánchez E, y Gómez-Sánchez CE. 2014. The multifaceted mineralocorticoid receptor. *Compr Physiol*, 4(3): 965-994.
- Han M-H, y Kim Y-J. 2016. Practical application of columbia classification for focal segmental glomerulosclerosis. *Biomed Res In*, 2016: 9375753.
- Harbor L. 2023. RIPA lysis buffer. *J Cold Spring Harbor Protocols*, 2017(12): pdb.rec101428.
- Hattori T, Murase T, Iwase E, Takahashi K, Ohtake M, Tsuboi K, Ohtake M, Miyachi M, Murohara T, y Nagata K. 2013. Glucocorticoid-induced hypertension and cardiac injury: effects of mineralocorticoid and glucocorticoid receptor antagonism. *Nagoya J Med Sci*, 75(1-2): 81-92.
- Heiniger CD, Rochat MK, Frey FJ, y Frey BM. 2001. TNF- α enhances intracellular glucocorticoid availability. *FEBS Lett*, 507(3): 351-356.
- Hill NR, Fatoba ST, Oke JL, Hirst JA, O'Callaghan CA, Lasserson DS, y Hobbs FD. 2016. Global prevalence of chronic kidney disease - a systematic review and meta-analysis chapter 28 - *PloS one*, 11(7): e0158765.
- Hossain MS, Amin MN, Das A, Khan AKMJH, Sohel M, Ahmed J, Islam MM, Hossain MS, Rahman MM, Nesa ML, y Islam MS. 2021. Increased lipid peroxidation, depleted non-enzymatic antioxidant, and variability in trace elements concentration in serum are correlated with Bangladeshi end-stage renal disease population. *Health Sci*, 4(3): e348.
- Hunter RW, Ivy JR, y Bailey MA. 2014. Glucocorticoids and renal Na⁺ transport: implications for hypertension and salt sensitivity. *J Physiol*, 592(8): 1731-1744.
- IHME. (2019). Institute for health Metrics and evaluation Retrieved from <https://vizhub.healthdata.org/gbd-compare/>
- Jiang M, Zhao M, Bai M, Lei J, Yuan Y, Huang S, Zhang Y, Ding G, Jia Z, y Zhang A. 2021. SIRT1 alleviates aldosterone-induced podocyte injury by suppressing mitochondrial dysfunction and nlrp3 inflammasome activation. *Kidney Dis (Basel)*, 7(4): 293-305.
- Kaestner R, Pearson JA, Keene D, y Geronimus AT. 2009. Stress, allostatic load and health of mexican immigrants. *Soc Sci Q*, 90(5): 1089-1111.
- Kang HM, Ahn SH, Choi P, Ko YA, Han SH, Chinga F, Park AS, Tao J, Sharma K, Pullman J, Bottinger EP, Goldberg IJ, y Susztak K. 2015. Defective fatty acid oxidation in renal tubular epithelial cells has a key role in kidney fibrosis development. *Nature medicine*, 21(1): 37-46.
- Kaspar CDW, Bholah R, y Bunchman TE. 2016. A review of pediatric chronic kidney disease. *Blood Purif*, 41(1-3): 211-217.

- Katsu Y, y Iguchi T. 2016. Subchapter 95E - Aldosterone. En: Handbook of Hormones. Takei, Y, H Ando y K Tsutsui (Eds.), (pp. 535-e595E-532). San Diego: Academic Press.
- Keshari A, Verma AK, Kumar T, y Srivastava R. 2015. Oxidative stress: A review. The IJST, 3: 155-162.
- Kim T, y Yang Q. 2013. Peroxisome-proliferator-activated receptors regulate redox signaling in the cardiovascular system. World J Cardiol, 5(6): 164-174.
- Koshy SM, Garcia-Garcia G, Pamplona JS, Renoirte-Lopez K, Perez-Cortes G, Gutierrez ML, Hemmelgarn B, Lloyd A, y Tonelli M. 2009. Screening for kidney disease in children on World Kidney Day in Jalisco, Mexico. *Pediatr Nephrol*, 24(6): 1219-1225.
- Kraus D, Jäger J, Meier B, Fasshauer M, y Klein J. 2005. Aldosterone inhibits uncoupling protein-1, induces insulin resistance, and stimulates proinflammatory adipokines in adipocytes. *Horm Metab Res*, 37(07): 455-459.
- Kretzler M, Koeppen-Hagemann I, y Kriz W. 1994. Podocyte damage is a critical step in the development of glomerulosclerosis in the uninephrectomised-desoxycorticosterone hypertensive rat. *Virchows Archiv*, 425(2): 181-193.
- Kuo W-c, Bratzke LC, Oakley LD, Kuo F, Wang H, y Brown RL. 2019. The association between psychological stress and metabolic syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Obes Rev*, 20(11): 1651-1664.
- Lee C. 2017. Collaborative power of nrf2 and pparγ activators against metabolic and drug-induced oxidative injury. *Oxid Med Cell Longev*, 2017: 1378175-1378175.
- Leroy V, De Seigneux S, Agassiz V, Hasler U, Rafestin-Oblin M-E, Vinciguerra M, Martin P-Y, y Féraille E. 2009. Aldosterone activates NF-kappaB in the collecting duct. *J Am Soc Nephrol*, 20(1): 131-144.
- Lipphardt M, Song JW, Matsumoto K, Dadafarin S, Dihazi H, Müller G, y Goligorsky MS. 2017. The third path of tubulointerstitial fibrosis: aberrant endothelial secretome. *Kidney Int*, 92(3): 558-568.
- López-López AL, Escobar Villanueva MC, Brianza Padilla M, Bonilla Jaime H, y Alarcón Aguilar FJ. 2018. Chronic unpredictable mild stress progressively disturbs glucose metabolism and appetite hormones in rats. *Acta Endocrinol (Buchar)*, 14(1): 16-23.
- López-López AL, Jaime HB, Escobar Villanueva MDC, Padilla MB, Palacios GV, y Aguilar FJA. 2016. Chronic unpredictable mild stress generates oxidative stress and systemic inflammation in rats. *Physiol Behav*, 161: 15-23.
- Lusco MA, Fogo AB, Najafian B, y Alpers CE. 2016. in *AJKD/atlas of renal pathology: Tubular atrophy*. *Am J Kidney Dis*, 67(6): e33-e34.
- Machado JR, Rocha LP, Neves PDMdM, Cobô EdC, Silva MV, Castellano LR, Corrêa RRM, y Reis MA. 2012. An overview of molecular mechanism of nephrotic syndrome. *Int J Nephrol*, 2012: 937623-937623.

- Marchon RG, Ribeiro CT, Costa WS, Sampaio FJB, Pereira-Sampaio MA, y de Souza DB. 2018. Immediate and late effects of stress on kidneys of prepubertal and adult rats. *Kidney Blood Press Res*, 43(6): 1919-1926.
- Markou A, Sertedaki A, Kaltsas G, Androulakis, II, Marakaki C, Pappa T, Gouli A, Papanastasiou L, Fountoulakis S, Zacharoulis A, Karavidas A, Ragkou D, Charmandari E, Chrousos GP, y Piaditis GP. 2015. Stress-induced aldosterone hyper-secretion in a substantial subset of patients with essential hypertension. *J Clin Endocrinol Metab*, 100(8): 2857-2864.
- Martín-Fernández B, Rubio-Navarro A, Cortegano I, Ballesteros S, Alia M, Cannata-Ortiz P, Olivares-Alvaro E, Egido J, de Andres B, Gaspar ML, de Las Heras N, Lahera V, y Moreno JA. 2016. Aldosterone induces renal fibrosis and inflammatory m1-macrophage subtype via mineralocorticoid receptor in rats. *PloS one*, 11(1): e0145946.
- Mehta S, Joghi S, y Gowder T. 2015. Members of antioxidant machinery and their functions. En: *Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress*. Sivakumar, J (Ed.). Saudi Arabia: Qassim University.
- Meng XM. 2019. Inflammatory mediators and renal fibrosis. *Adv Exp Med Biol*, 1165: 381-406.
- Miyata K, Rahman M, Shokoji T, Nagai Y, Zhang GX, Sun GP, Kimura S, Yukimura T, Kiyomoto H, Kohno M, Abe Y, y Nishiyama A. 2005. Aldosterone stimulates reactive oxygen species production through activation of NADPH oxidase in rat mesangial cells. *J Am Soc Nephrol*, 16(10): 2906-2912.
- Mousikou M, Kyriakou A, y Skordis N. 2021. Stress and growth in children and adolescents. *Horm Res Paediatr*.
- Nagata M. 2016. Podocyte injury and its consequences. *Kidney Int*, 89(6): 1221-1230.
- Nicolaidis N, Chrousos GP, y Kino T. 2020. Glucocorticoid receptor. En: *Endotext* [Internet]. Feingold, K, B Anawalt y M Blackman (Eds.). South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.
- Niebylski A, Boccolini A, Bensi N, Binotti S, Hansen C, Yaciuk R, y Gauna H. 2012. Neuroendocrine changes and natriuresis in response to social stress in rats. *Stress Health*, 28(3): 179-185.
- Novak M, Björck L, Giang KW, Heden-Ståhl C, Wilhelmsen L, y Rosengren A. 2013. Perceived stress and incidence of type 2 diabetes: a 35-year follow-up study of middle-aged Swedish men. *Diabet Med*, 30(1): e8-16.
- Oakley RH, y Cidlowski JA. 2013. The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 132(5): 1033-1044.
- Ogobuiro I, y Tuma F. 2019. Physiology, renal. En: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.

- Ortega-Romero M, Mendez-Hernandez P, Cruz-Angulo MDC, Hernandez-Sanchez AM, Alvarez-Elias AC, Munoz-Arizpe R, Sales-Heredia F, Aguilar-Madrid G, Juarez-Perez CA, Soto V, Valades T, Olvera-Rivas N, Obrador-Vera GT, Barbier OC, y Medeiros M. 2019. Chronic kidney disease in children aged 6-15 years and associated risk factors in apizaco, tlaxcala, mexico, a pilot study. *Nephron*: 1-10.
- Pietilä I, y Vainio SJ. 2014. Kidney development: An overview. *Nephron Exp Nephrol*, 126(2): 40-44.
- Polvani S, Tarocchi M, y Galli A. 2012. PPAR γ and oxidative stress: Con(β) catenating NRF2 and FOXO. *PPAR Res*, 2012: 641087-641087.
- Puddu M, Fanos V, Podda F, y Zaffanello MJAJON. 2009. The kidney from prenatal to adult life: perinatal programming and reduction of number of nephrons during development. *Am J Nephrol*, 30: 162 - 170.
- Razzoli M, y Bartolomucci A. 2016. The dichotomous effect of chronic stress on obesity. *Trends Endocrinol Metab*, 27(7): 504-515.
- Repetto M, Semprine J, y Boveris A. 2012. Lipid peroxidation: chemical mechanism, biological implications and analytical determination. En: *Lipid Peroxidation*. Catala, A (Ed.), (Vol. 1). Argentina: Universidad Nacional de La Plata.
- Romagnani P, Remuzzi G, Glasscock R, Levin A, Jager KJ, Tonelli M, Massy Z, Wanner C, y Anders H-J. 2017. Chronic kidney disease. *Nat Rev Dis Primers*, 3(1): 17088.
- Sánchez-Solís C, Cuevas-Romero E, Munoz A, Cervantes-Rodríguez M, Rodríguez-Antolín J, y Nicolás-Toledo L. 2018. Morphometric changes and AQP2 expression in kidneys of young male rats exposed to chronic stress and a high-sucrose diet. *Biomed Pharmacother*, 105: 1098-1105.
- Sánchez-Solís CN, Cuevas Romero E, Soto-Rodríguez I, de Lourdes Arteaga-Castañeda M, De León-Ramírez YM, Rodríguez-Antolín J, y Nicolás-Toledo L. 2020. High-sucrose diet potentiates hyperaldosteronism and renal injury induced by stress in young adult rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 47(12): 1985-1994.
- Satyjeet F, Naz S, Kumar V, Aung NH, Bansari K, Irfan S, y Rizwan A. 2020. Psychological stress as a risk factor for cardiovascular disease: a case-control study. *Cureus*, 12(10): e10757-e10757.
- Schnaper HW. 2014. Remnant nephron physiology and the progression of chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol*, 29(2): 193-202.
- Schnaper HW. 2017. The tubulointerstitial pathophysiology of progressive kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis*, 24(2): 107-116.
- Seely JC. 2017. A brief review of kidney development, maturation, developmental abnormalities, and drug toxicity: juvenile animal relevancy. *J Toxicol Pathol*, 30(2): 125-133.
- Seely JC, Hard GC, y Blankenship B. 2018. Chapter 11 - Kidney. En: *Boorman's Pathology of the Rat (Second Edition)*. Suttie, AW (Ed.), (pp. 125-166). Boston: Academic Press.

- Sequeira-Cordero A, Salas-Bastos A, Fornaguera J, y Brenes JC. 2019. Behavioural characterisation of chronic unpredictable stress based on ethologically relevant paradigms in rats. *Sci Rep*, 9(1): 17403.
- Shalini-Kapoor M, y Sivakumar-Joghi T. 2015. Members of antioxidant machinery and their functions. En: *Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress*. Sivakumar Joghi Thatha, G (Ed.), (pp. Ch. 4). Rijeka: IntechOpen.
- Sies H, Berndt C, y Jones DP. 2017. Oxidative stress. *Annu. Rev. Biochem*, 86(1): 715-748.
- Siragy HM, y Xue C. 2008. Local renal aldosterone production induces inflammation and matrix formation in kidneys of diabetic rats. *Exp Physiol*, 93(7): 817-824.
- Skuse D, Albanese A, Stanhope R, Gilmour J, y Voss L. 1996. A new stress-related syndrome of growth failure and hyperphagia in children, associated with reversibility of growth-hormone insufficiency. *Lancet (London, England)*, 348(9024): 353-358.
- Staples A, y Wong C. 2010. Risk factors for progression of chronic kidney disease. *Curr Opin Pediatr*, 22(2): 161-169.
- Stern-Zimmer M, Calderon-Margalit R, Skorecki K, y Vivante A. 2021. Childhood risk factors for adulthood chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol*, 36(6): 1387-1396.
- Strutz F, y Zeisberg M. 2006. Renal fibroblasts and myofibroblasts in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, 17(11): 2992-2998.
- Suehiro T, Tsuruya K, Ikeda H, Toyonaga J, Yamada S, Noguchi H, Tokumoto M, y Kitazono T. 2015. Systemic aldosterone, but not angiotensin ii, plays a pivotal role in the pathogenesis of renal injury in chronic nitric oxide-deficient male rats. *Endocrinology*, 156(7): 2657-2666.
- Sutherland MR, Béland C, Lukaszewski MA, Cloutier A, Bertagnolli M, y Nuyt AM. 2016. Age- and sex-related changes in rat renal function and pathology following neonatal hyperoxia exposure. *Physiol Rep*, 4(15).
- Tain YL, y Hsu CN. 2017. Developmental origins of chronic kidney disease: should we focus on early life? *Int J Mol Sci*, 18(2).
- Torres-Toledano M, Granados-Garcia V, y Lopez-Ocana LR. 2017. Global burden of disease of chronic kidney disease in Mexico. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 55(Suppl 2): S118-123.
- Usa K, Singh RJ, Netzel BC, Liu Y, Raff H, y Liang M. 2007. Renal interstitial corticosterone and 11-dehydrocorticosterone in conscious rats. *Am J Physiol*, 293(1): F186-F192.
- Wang A, Ren J, Wang CP, y Hascall VC. 2014. Heparin prevents intracellular hyaluronan synthesis and autophagy responses in hyperglycemic dividing mesangial cells and activates synthesis of an extensive extracellular monocyte-adhesive hyaluronan matrix after completing cell division. *J Biol Chem*, 289(13): 9418-9429.

- Wei L, Li Y, Tang W, Sun Q, Chen L, Wang X, Liu Q, Yu S, Yu S, Liu C, y Ma X. 2019. Chronic unpredictable mild stress in rats induces colonic inflammation. *Front Physiol*, 10: 1228.
- Wen X, Li Y, y Liu Y. 2010. Opposite action of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in regulating renal inflammation: functional switch by its ligand. *J Biol Chem*, 285(39): 29981-29988.
- Willner P. 2017. The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. *Neurobiol Stress*, 6: 78-93.
- Yuan Q, Tang B, y Zhang C. 2022. Signaling pathways of chronic kidney diseases, implications for therapeutics. *Signal Transduct Target Ther*, 7(1): 182.
- Yuan X, Wang X, Li Y, Li X, Zhang S, y Hao L. 2019. Aldosterone promotes renal interstitial fibrosis via the AIF1/AKT/mTOR signaling pathway. *Mol Med Rep*, 20(5): 4033-4044.
- Zeeni N, Daher C, Fromentin G, Tome D, Darcel N, y Chaumontet C. 2013. A cafeteria diet modifies the response to chronic variable stress in rats. *Stress*, 16(2): 211-219.
- Zeidel ML, Hoenig MP, y Palevsky PM. 2014. A new CJASN series: Renal physiology for the clinician. *Clin J Am Soc Nephrol*, 9(7): 1271.
- Zhang Y, Dai Y, Raman A, Daniel E, Metcalf J, Reif G, Pierucci-Alves F, y Wallace DP. 2020. Overexpression of TGF- β 1 induces renal fibrosis and accelerates the decline in kidney function in polycystic kidney disease. *American journal of physiology. Renal physiology*, 319(6): F1135-f1148.
- Zoja C, Abbate M, y Remuzzi G. 2014. Progression of renal injury toward interstitial inflammation and glomerular sclerosis is dependent on abnormal protein filtration. *Nephrol Dial Transplant*, 30(5): 706-712.
- Zou P, Wang X, Yang W, Liu C, Chen Q, Yang H, Zhou N, Zeng Y, Chen H, Zhang G, Liu J, Cao J, Ao L, y Sun L. 2019. Mechanisms of stress-induced spermatogenesis impairment in male rats following unpredictable chronic mild stress (uCMS). *Int J Mol Sci*, 20(18): 4470.
- Zweyer M. 2010. Embryology of the kidney. En: Quiaia E. (eds) radiological imaging of the kidney. (Medical Radiology ed.). Berlin, Heidelberg: Springer.

12 GLOSARIO

1. **Agonista:** Medicamento o sustancia que se une a un receptor en el interior o la superficie de una célula y produce la misma acción que la sustancia que normalmente se une con el receptor.
2. **Antagonista:** sustancia, natural o sintética, que se une a los receptores del organismo en cuestión, bloqueándolos contra la acción de los agonistas y no produce ningún efecto sobre el cuerpo
3. **Enzima:** Moléculas orgánicas que actúan como catalizadores de reacciones
4. **Fibrosis:** Desarrollo en exceso de tejido conectivo fibroso en un órgano o tejido como consecuencia de un proceso reparativo o reactivo.
5. **Glomeruloesclerosis:** Enfermedad por la que se desarrolla tejido cicatricial en los glomérulos.
6. **Hormona:** Sustancia química secretada por una célula especializada a la sangre, cuyo fin es señalar a otras células para que realicen funciones específicas.
7. **Glucocorticoides:** son hormonas derivadas del colesterol secretadas por la zona fasciculada de la glándula adrenal.
8. **Mineralocorticoides:** son hormonas derivadas del colesterol secretadas por la zona glomerulosa de la glándula adrenal.
9. **Interleucinas:** Aquellas que regulan las respuestas inmunitarias.
10. **Receptor:** Aquellas proteínas que permiten la interacción de determinadas sustancias con los mecanismos del metabolismo celular.
11. **Solución de Bouin:** Fijador compuesto utilizado en histología compuesta por ácido pícrico, formaldehído y ácido acético.
12. **Uní-nefrectomía:** Procedimiento quirúrgico que se realiza para extirpar todo el riñón o parte de este.

13 ANEXOS

a. Anexo 1. Protocolo de tinción de tricrómica de Masson

Después de obtener los cortes se dejan secar durante 24 horas y se realiza la tinción tricrómica de Masson con la finalidad de identificar la presencia de fibrosis renal.

Procedimiento

Etapa	Reactivo	Tiempo
Desparafinar	Xileno	2x5 min
	Xileno:Etanol	5min
	Etanol 100%	2x5 min
	Etanol 96%	3min
	Etanol 80%	3min
	Etanol 60%	3min
	Agua destilada	3min
Mordiente	Mordente de Bouin	12 horas
	Agua corriente	40s
	Hematoxilina de Weigert	20min
	Agua corriente	40s
	Agua destilada	40s
Azuleamiento	Amoniaco 1%	4 min
	Agua corriente	40 s
	Biebrich Scarlet-Fuchina acida	10 min
	Agua corriente	40s
Contraste	Ac. Fosfomolibdico	4 min
	Azul de anilina	5 min
	Ac. Acético glacial 1%	3 min
	Agua corriente	40 s
Deshidratación	Etanol 80%	40 s
	Etanol 96%	40 s
	Etanol 100%	40 s
	Etanol: Xilol	40 s
	Xileno	40 s
Montaje	Entellan	

b. Anexo 2. Protocolo de tinción ácido periódico de Schiff

Después de obtener los cortes se dejan secar durante 24 horas y se realiza la tinción PAS con la finalidad de teñir la membrana basal de las estructuras y realizar la medición de la histomorfometría e identificar daño tubular.

Etapas	Reactivo	Tiempo
Desparafinar	Xileno	2x5 minutos
	Xileno: Etanol	5 minutos
	Etanol 100%	2x5 minutos
	Etanol 96%	3 minutos
	Etanol 80%	3 minutos
	Etanol 60%	3 minutos
	Agua destilada	3 minutos
Mordiente	Ácido periódico	5 minutos
	Agua destilada	40 segundos
	Agua tibia	5 minutos
	Hematoxilina de Harris	10 minutos
	Agua corriente	5 minutos
Deshidratación	Agua destilada	40 segundos
	Etanol 96%	40 segundos
	Etanol 100%	40 segundos
	Etanol: Xilol	40 segundos
	Xileno	40 segundos
Montaje	Entellan	

14 PUBLICACIONES



El hiperaldosteronismo inducido por estrés crónico variable provoca fibrosis renal y disminuye la excreción urinaria de sodio en la rata macho joven

Pérez Sánchez Eliut¹ y Nicolás Toledo Leticia¹

¹Doctorado en Ciencias Biológicas, Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala. Laboratorio de inmunquímica.

INTRODUCCIÓN

Independientemente de la causa del daño renal, la función renal puede recuperarse activando procesos de reparación. En los túbulos del riñón se lleva a cabo la activación celular, inflamación, síntesis de matriz extracelular y cambios metabólicos en las células. Pero, la desregulación de estos procesos, principalmente la activación celular, puede provocar una reacción exagerada. Ante la mala adaptación, las células tubulares epiteliales provocan un panorama oxidativo, inflamatorio y fibrótico. La activación del sistema renina angiotensina aldosterona cumple una función reguladora de la presión arterial, principalmente, por aumento de la resistencia periférica, aumento de la reabsorción renal de sodio y el consecuente incremento del volumen circulante. Pero también, se le ha relacionado con efectos adverso sobre el riñón, la aldosterona induce el inicio de la inflamación, estrés oxidativo y fibrosis renal.

OBJETIVOS

Evaluar los efectos de la aldosterona inducida por estrés crónico variable sobre la estructura y función renal en ratas jóvenes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se formaron 2 grupos de ratas macho jóvenes: control (JC, n=8) y expuestos a estrés crónico variable por 4 semanas (JE4, n=8). Al finalizar el experimento, los animales son anestesiados y sacrificados por decapitación para coleccionar suero para determinar la concentración de aldosterona y creatinina. También se colecciona orina para evaluar la excreción de sodio y con el riñón derecho determinamos fibrosis.

RESULTADOS

En el grupo JE4 aumenta la aldosterona (JE4 437.75±40.76 pg/mL y JC 193.5±26.71 pg/mL), se induce fibrosis peritubular (JE4 0.1737±0.03 % y JC 0.05±0.01 %) y disminuye la excreción urinaria de sodio (JE4 10.86±1.56 nM y JC 16.78±1.05 nM). Sin diferencias en la concentración de creatinina sérica.

CONCLUSIÓN

El estrés es asociado a situaciones tanto patológicas como no patológicas. Mantener condiciones estresantes de forma crónica puede inducir hiperaldosteronismo y contribuir al desarrollo de la enfermedad renal crónica induciendo fibrosis y la retención de sodio en jóvenes sin obesidad ni síndrome metabólico.

o42

El estrés crónico variable promueve hiperaldosteronismo e induce daño renal en la rata macho joven

Pérez-Sánchez Eliut¹ (estudiante de posgrado), Arroyo-Helguera Omar Elind², Soto-Rodríguez Ida³, Rodríguez-Antolín Jorge⁴, Cuevas-Romero Estela⁴, Nicolás-Toledo Leticia⁴

1 Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala. 2 Instituto de Salud Pública, Universidad Veracruzana. 3 Facultad de Bioanálisis, Universidad Veracruzana. 4 Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Recientemente demostramos que el estrés crónico por restricción de movimiento provoca afección renal con aumento de la concentración sérica de aldosterona, pero no de corticosterona, posiblemente por una adaptación al estrés. El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de la corticosterona y aldosterona sobre el daño renal en ratas macho jóvenes mediante un modelo de estrés crónico variable. Se utilizaron ratas machos Wistar de 51 días que formaron 2 grupos: grupo control (C, n=8); grupo estrés crónico variable (ECV; n=8) sometido a 5 diferentes estímulos estresantes/semana durante 4 semanas. Al final del experimento se midieron aldosterona, corticosterona y creatinina sérica. En orina de 12 horas se midió creatinina y sodio urinario. En el riñón derecho se evaluó fibrosis, histomorfometría de túbulo y glomérulos y TNF- α . En el riñón izquierdo se determinó actividad antioxidante y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). En el grupo ECV incrementó la concentración de aldosterona, pero no de corticosterona. También disminuyó la excreción de sodio urinario, pero no modificó la concentración de creatinina sérica y urinaria. En la histología observamos que el ECV provoca inflamación, glomeruloesclerosis focal y segmentaria, fibrosis tubulointersticial y daño tubular sin modificar el estado oxidante. Podemos concluir que el estrés crónico variable induce hiperaldosteronismo que podría contribuir al desarrollo de otras patologías renales, como una disfunción renal crónica irreversible en ratas jóvenes adultas.

Financiamiento: CONACyT a PSE (266814).



Original article

Dietary intervention in adult rats exposed to a high-sugar diet early in life permanently impairs sperm quality

Yeimy Mar De León-Ramírez^{a, b}, Eliut Pérez Sánchez^b, Adriana Corona Pérez^c,
Cristhian Neftaly Sánchez-Solís^c, Jorge Rodríguez-Antolín^d, Leticia Nicolás-Toledo^d  

Show more 

+ Add to Mendeley  Share  Cite

<https://doi.org/10.1016/j.ando.2023.06.002> [↗](#)

[Get rights and content](#) [↗](#)

Abstract

Childhood obesity predicts the presence of adult obesity. Obesity is associated with poor sperm quality. We hypothesized that exposure to a high-sugar diet (HSD) in early life would cause permanent histomorphology damage to the testes, resulting in reduced sperm quality in adult life. Wistar rats (aged 21 days) were divided into four groups ($n=6$). In the first experiment, the rats received tap water (control) and a 30% sucrose diet for two months (S30). In the second experiment, the control and 30% sucrose diets were fed for two months, followed by replacement with tap water for two months (IS30). Eating and drinking were monitored. Animals were then euthanized, visceral and gonadal fat tissue and testes were collected, and epididymal spermatozoa were excised. Testicular samples were used for morphological description by H&E staining and for quantifying triacylglycerol content, caspase activity, and oxidative stress. Serum testosterone