



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Daño renal inducido por el estrés y el consumo elevado de sacarosa desde el destete hasta la edad adulta

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Cristhian Neftaly Sánchez Solís

Director

Dra. Leticia Nicolás Toledo

Tlaxcala, Tlax.

Febrero, 2019



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Doctorado en Ciencias Biológicas

Daño renal inducido por el estrés y el consumo elevado
de sacarosa desde el destete hasta la edad adulta

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Cristhian Neftaly Sánchez Solís

Comité tutorial

Dra. Leticia Nicolás Toledo

Dra. Estela Cuevas Romero

Dra. Margarita Cervantes Rodríguez

Dra. Dora Luz Corona Quintanilla

Dra. María de Lourdes Arteaga Castañeda

Dr. Jorge Rodríguez Antolín

Tlaxcala, Tlax.

Febrero, 2019

La presente investigación fue realizada bajo la dirección de la Dra. Leticia Nicolás Toledo 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 487305-SSCN.



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
PRESENTE**

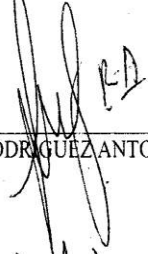
Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que **Cristhian Neftaly Sánchez Solís** realiza para la obtención del grado de **Doctora en Ciencias Biológicas**, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es **“Daño renal inducido por el estrés y consumo elevado de sacarosa desde el destete hasta la edad adulta”**.


Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.


ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., FEBRERO 15 DE 2019


DRA. ESTELA CUEVAS ROMERO


DRA. DORA LUZ CORONA QUINTANILLA


DR. JORGE RODRÍGUEZ ANTOLÍN


DRA. MARGARITA CERVANTES RODRÍGUEZ


DRA. MARÍA DE LOURDES ARZAPAGA CASTAÑEDA

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, por el amplio programa que ofrece a los aspirantes y por el apoyo del mismo para la realización del proyecto aquí presentado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (487305-SSCN) por el apoyo otorgado para la elaboración de este proyecto.

Le agradezco a mi asesora la Dra. Leticia Nicolás Toledo del laboratorio de Inmunohistoquímica del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, por brindarme la oportunidad de estudiar el posgrado en su laboratorio, por orientarme y por permitirme trabajar en un marco de confianza y libertad para la realización de este proyecto y para mi formación académica y personal.

Se contó con la tutoría de la Dra. Estela Cuevas Romero, Dra. Margarita Cervantes Rodríguez y la Dra. Ida Soto Rodríguez, a las cuales agradezco su aporte y participación activa en el desarrollo de la presente tesis.

De la misma forma, al Dr. Mauricio Díaz Muñoz y la Dra. Olivia Vázquez Martínez, del Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, Campus UNAM-Juquilla, Querétaro por su apoyo para la elaboración de este proyecto.

Agradecimientos

Agradezco a Dios y a la vida por permitirme cumplir esta meta que formaba parte de mis sueños.

Le agradezco a mi asesora la Dra. Leticia Nicolás Toledo, y al comité tutorial, la Dra. Estela Cuevas Romero, Dra. Margarita Cervantes Rodríguez y la Dra. Ida Soto Rodríguez, por instruirme, asesorarme y transmitirme sus conocimientos, que fueron vitales para la realización de este trabajo. Por otro lado, al Dr. Samuel Treviño Mora y Dr. Francisco Castelán, gracias por su acertada orientación, motivación y discusión crítica que me permitió un mejor entendimiento de mi trabajo.

A mi hijo Alex Caleb por ser mi fortaleza e inspiración para seguir adelante, por ser paciente cuando estaba ausente. A mi esposo Omar Oscar Escobar por brindarme su apoyo incondicional, paciencia y por motivarme a salir adelante durante esta nueva etapa de mi vida.

De la misma manera, agradezco a mis padres por haberme forjado a lo largo de mi vida y hacer de mí la persona que soy; muchos de mis logros se los debo a ustedes.

Finalmente, a mis amigos(as) y compañeros(as) de los diferentes laboratorios pertenecientes al Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta: Yeimy, Octavio, Yadira, Adriana, Daniela, Carolina, Denis, Yazmin, Verónica Villamar, Alexis, Yanin, María de los Ángeles y Julia de Guadalupe por todo el apoyo incondicional y paciencia en los momentos que pasamos trabajando y conviviendo juntos durante este tiempo; son recuerdos importante en mi vida.

RESUMEN

El estrés y el consumo de dietas ricas en carbohidratos y grasa en humanos se han asociado con alteraciones en la función renal durante la etapa adulta. En modelos animales, se ha demostrado que el estrés crónico y el consumo de dietas de cafetería tienen un efecto negativo sobre la morfología y función renal en edad adulta. Sin embargo, se desconoce la interacción entre el estrés crónico y el consumo de una dieta alta en sacarosa sobre la morfología y función renal en ratas jóvenes, adulto jóvenes y adulto. Además, la etapa posdestete representa un periodo crítico para la ontogenia del riñón, debido a que aún está en desarrollo. Lo que hace que sea un órgano susceptible a modificarse por el estrés y la dieta, afectado su organización histológica y función. Este estudio se realizó para evaluar el arreglo histológico del riñón y la función renal en ratas macho en edad juvenil, adulto joven y adulto, en un modelo de estrés crónico y consumo de sacarosa al 30% posterior al destete. Se utilizaron ratas machos Wistar de 21 días de edad. Las ratas se dividieron en cuatro grupos experimentales (n=8, por grupo): ratas que consumieron agua simple (C), ratas que consumieron agua simple más estrés (E), ratas que consumieron agua azucarada al 30% (A30) y ratas que consumieron agua azucarada al 30% más estrés (E+A30) durante uno, dos y tres meses de tratamiento. La manipulación del estrés fue un mes previo al sacrificio de cada grupo experimental. Se registró diariamente el peso corporal, consumo de alimento y agua. Al sacrificio se obtuvo la sangre para la medición de urea y creatinina sérica. Se extrajeron los riñones y se pesaron. El riñón derecho fijado en Bouin, deshidratado en alcoholes de forma ascendente, aclarado en xilol e incluido en Paraplast. Se realizaron cortes histológicos de 5µm, algunas laminillas fueron teñidas con Ácido Peryódico de Schiff (PAS) y en otros se realizó la inmunohistoquímica para la detección de acuaporina 2. El riñón izquierdo fue utilizado para la determinación de triglicéridos y estrés oxidativo. Los resultados fueron analizados a través de Anova de una vía Bonferroni pos hoc y Anova de dos vías Newman-Keuls pos hoc. Encontramos que las ratas estresadas correspondientes al primer mes, presentaron un área corpuscular y glomerular disminuida, aumento en el número de células mesangiales, matriz mesangial y expresión de acuaporina 2 acompañado con niveles bajos de creatinina. Mientras que, el consumo de sacarosa disminuyó la expresión de acuaporina 2 y evitó la disminución de

los niveles de creatinina provocado por el estrés crónico. El grupo que recibió ambos estímulos mantuvo efectos similares al grupo estresado, además de presentar una disminución en el área de los túbulos proximales. Con respecto, a las ratas estresadas correspondientes al segundo mes de tratamiento, mostraron una acumulación de triglicéridos, reducción del área corpuscular y glomerular, pérdida glomerular y atrofia tubular, así como, disminución en la expresión de acuaporina 2. Por otro lado, el consumo de sacarosa disminuyó el área corpuscular y glomerular, además redujo la pérdida de glomérulos y la acumulación de triglicéridos provocado por el estrés crónico; sin embargo, aumentó los niveles de creatinina. El grupo estrés más sacarosa, presentó una disminución en el área corpuscular y glomerular y aumentó en el número de células mesangiales. Por último, las ratas estresadas correspondientes al tercer mes de tratamiento, presentaron estrés oxidativo y acumulación de triglicéridos, disminución y pérdida glomerular y degeneración tubular, aumento en el número de células mesangiales y creatinina sérica. El consumo de sacarosa mostró menor porcentaje de matriz mesangial, además, evitó la formación de estrés oxidativo, acumulación de triglicéridos y el aumento en los niveles de creatinina provocado por el estrés crónico. El grupo estrés más sacarosa, presentó efectos similares al grupo estresado. Los resultados muestran que el estrés crónico desde el periodo posnatal provoca cambios morfológicos a nivel renal alterando la función independiente de la edad. Además, el consumo de sacarosa revierte algunos efectos inducidos por el estrés crónico.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	4
1.1.	Desarrollo del riñón en mamíferos	5
1.1.1.	Organogénesis renal en roedores.....	6
2	Etiología de daño renal en humanos adultos e infantes.....	13
3	ANTECEDENTES	15
3.1	Modelos animales	15
3.1.1	Dietas ricas en carbohidratos.....	15
3.1.2	Estrés	17
3.1.3	Dietas ricas en carbohidratos y estrés.....	18
4	JUSTIFICACIÓN	20
5	HIPÓTESIS	22
6	OBJETIVOS.....	22
6.1	Objetivo general	22
6.2	Objetivos específicos	22
7	MATERIAL Y MÉTODOS	23
7.1	Manejo de los animales	23
7.2	Diseño experimental.....	23
7.3	Protocolo de la dieta	24
7.4	Obtención de kilocalorías (kcal) consumidas por el agua	24
7.5	Obtención de kilocalorías (kcal) consumidas en el alimento	24
7.6	Estrés	25
7.7	Obtención de muestras sanguíneas y riñón.....	25
7.8	Análisis histológico del riñón.....	25

7.9	Inmunohistoquímica para la detección de acuaporina 2.....	27
7.10	Cuantificación de triglicéridos en riñón	28
7.11	Determinación de estrés oxidativo	28
7.12	Determinación de urea y creatinina	29
7.13	Análisis estadístico	29
8	RESULTADOS	30
8.1	Primer mes de tratamiento.....	30
8.1.1	Parámetros de crecimiento	30
8.1.2	Peso renal	31
8.1.3	Cualidades histológicas del riñón.....	31
8.1.4	Cuantificación histológica del riñón.....	32
8.1.5	Inmunolocalización de acuaporina 2.....	35
8.1.6	Estrés oxidativo	36
8.1.7	Urea y creatinina	36
8.2	Segundo mes de tratamiento.....	37
8.2.1	Parámetros de crecimiento	37
8.2.2	Peso renal	37
8.2.3	Cualidades histológicas del riñón.....	38
8.2.4	Cuantificación histológica del riñón.....	39
8.2.5	Inmunolocalización de acuaporina 2.....	42
8.2.6	Contenido de triglicéridos en riñón	43
8.2.7	Estrés oxidativo	43
8.2.8	Urea y creatinina	43
8.3	Tercer mes de tratamiento	45
8.3.1	Parámetros de crecimiento	45

8.3.2	Peso renal	45
8.3.3	Cualidades histológicas del riñón.....	46
8.3.4	Cuantificación histológica del riñón.....	47
8.3.5	Inmunolocalización de acuaporina 2.....	50
8.3.1	Contenido de triglicéridos en riñón	51
8.3.2	Estrés oxidativo	51
8.3.3	Urea y creatinina	52
9	DISCUSIÓN.....	53
9.1	Primer mes de tratamiento.....	53
9.2	Segundo mes de tratamiento.....	55
9.3	Tercer mes de tratamiento	57
10	CONCLUSIÓN	59
11	PERSPECTIVAS	60
12	REFERENCIAS	61
13	GLOSARIO.....	73
14	ANEXOS.....	74
15	PUBLICACIONES.....	76

1 INTRODUCCIÓN

La alimentación refleja la interacción dinámica entre el estado fisiológico de un organismo y sus condiciones ambientales. Cuando los sistemas endógenos de control fallan se pueden generar trastornos metabólicos los cuales resultan de la combinación de varios factores ambientales y genéticos (Mataix 2009). En particular, el consumo elevado de carbohidratos provenientes de la dieta y la exposición a estrés crónico inducen un aumento en la cantidad de tejido adiposo y alteraciones metabólicas como diabetes tipo II, hipertensión, metabolismo anormal de lípidos y carbohidratos y enfermedad cardiovascular (De Almeida y cols. 2014; Abraham y cols. 2007).

En seres humanos, estudios epidemiológicos correlacionan la presencia de obesidad infantil, con el consumo elevado de azúcares refinados (sacarosa y fructosa) y grasas a edades tempranas que conllevan a diversas alteraciones relacionadas con la presencia de síndrome metabólico (Rojas y cols. 2008). Además, el estrés psicosocial está vinculado con el desarrollo del síndrome metabólico y obesidad en edad adulta, aumentando el riesgo a padecer estas alteraciones metabólicas a través de la activación de respuestas neuroendocrinas, como son el sistema nervioso autónomo y vías hormonales (Abraham y cols. 2007). La respuesta al estrés activa el eje hipotálamo-pituitario-adrenal y el eje simpático adrenomedular (Holmes y cols. 2010) para mantener el equilibrio dinámico y homeostasis del cuerpo, ya que es un mecanismo de defensa en situaciones de estrés agudo. Sin embargo, si el estrés persiste la carga alostérica o estrés crónico da como resultado la aparición de ansiedad o depresión (Golstein y McEwen 2005), el cual disminuye la calidad de vida.

Se ha mostrado que el estrés crónico está asociado con la sobrecarga alostérica, es decir, el cuerpo intenta encontrar estabilidad a través de cambios como la secreción de cortisol, insulina, la activación del eje hipotálamo-pituitario-adrenal, citoquinas y otros elementos pro-inflamatorios, entre otros cambios homeostáticos provocando alteraciones fisiológicas renales (Diniz y cols. 2006; Melamed y cols. 2006; Toker y cols. 2005). El estrés, la ansiedad y depresión pueden estar asociados con la aparición de enfermedades, debido a lesiones a nivel celular y tisular (Bhattacharyya y Steotoe 2007; Vaziri y Rodríguez-Iturbide 2006; Gupta y

Gupta 2004; Spieker y cols. 2002). Algunos autores, mencionan que estas condiciones pueden tener repercusiones a nivel renal, como el mantenimiento de los niveles altos de presión y la asociación con la presencia de cálculos en el sistema urinario, entre otras manifestaciones (Noris y Nissenson 2008; Brown y cols. 2012; Najem y cols. 1997).

En modelos animales, el consumo de sacarosa y fructosa en diferentes porcentajes, tiempo de exposición y edad, han sido asociados con la presencia de obesidad y alteraciones metabólicas, así como afectaciones en órganos metabólicos importantes (Bleisch y cols. 1952; Kahn y Flier 2000; El Hafidi 2006; Díaz-Águila y cols. 2016). De manera particular, en el riñón se ha mostrado que el consumo de fructosa o sacarosa modifica la estructura y función renal. Por ejemplo, en ratas Sprague-Dawley adultas alimentadas con fructosa al 60%, se ha reportado un aumento en el tamaño de los riñones, además existe la presencia de esclerosis glomerular, atrofia y dilatación tubular, e infiltración de células inmune (Rahmoune y cols. 2005). Un trabajo reciente, realizado en ratas macho Sprague-Dawley, ha reportado que el consumo de agua con fructosa al 20% después del destete durante 8 semanas ocasiona un aumento de la presión arterial sistólica, hiperinsulinemia y aumento en la vasoconstricción renal (Mohammed y cols. 2010). Por otro lado, se ha mostrado que el consumo de sacarosa al 65% en ratas machos Wistar adultas, durante 12 semanas presenta aumento en la cantidad de tejido adiposo perirenal, niveles elevados de glucosa, LDL, triglicéridos y colesterol total. Así como un aumento en los niveles de urea y creatinina sérica, también se observó una disminución en los niveles de óxido nítrico los cuales están asociados con el daño renal (Amin y cols. 2011).

En el contexto de exposición a estrés, Pointer y cols. (2012) observaron en ratones mutados en la enzima óxido nítrico sintasa (eNOS) de 6 meses de edad, estresadas durante 15 días con la administración de una dieta alta en sal, provoca lesiones en el glomérulo y en los túbulos, además hay presencia de fibrosis, trombosis, esclerosis e inflamación intersticial.

1.1. Desarrollo del riñón en mamíferos

El sistema tubular del riñón está compuesto de dos poblaciones celulares distintas: las **nefronas** que forman la unidad de filtración y el **sistema de conductos colectores** derivado de la yema uretral. Las nefronas se componen de glomérulos que filtran la sangre a la cápsula de

Bowman y las estructuras tubulares que reabsorben y concentran orina. El conducto colector es un conducto epitelial de Wolff que concentra y recoge la orina y la transfiere a través de la pelvis renal hasta la vejiga.

Durante el desarrollo del riñón del mamífero se puede identificar la evolución que representan estos, en formas de vida más primitiva. Antes de que el riñón adulto (metanefro) se desarrolle, el embrión tiene dos riñones transitorios (pro-mesonefro) en una secuencia espacial y temporal (Saxén y Sariola 1994). Las dos formas tempranas son degeneradas o se convierten en parte del sistema reproductivo; mientras que el metanefro forma el órgano secretor permanente.

1.1.1. Organogénesis renal en roedores

La organogénesis renal está regulada por interacción de células y tejidos, secuenciales y reciprocas. Estas interacciones mutuas se producen entre dos tejidos progenitores: conducto epitelial de Wolff (WD) derivado de la yema uretral (UB) y el mesénquima metanéfrico (MM). Ambos tejidos son derivados del mesodermo intermedio (IM), que son una población de células localizadas entre la placa del mesodermo paraxial y lateral y se especializan durante la gastrulación (Obara-Ishihara y cols. 1999). La vasculatura renal también se origina en el mesodermo intermedio (Hyink y Abrahamson 1995). El desarrollo del riñón inicia en el epitelio de Wolff generado en la yema uretral, al final del extremo caudal. Posteriormente la yema uretral invade el mesénquima renal predeterminado y comienza a ramificarse e induce la nefrogénesis. Todo esto ocurre de manera secuencial en el blastema metanéfrico. A través de la transición de mesénquima a epitelio (MET) y los pasos simples de morfogénesis, que finalmente forma las nefronas. La migración de células endoteliales en el desarrollo del glomérulo es esencial para crear una nefrona funcional (Figura 1; Saxén y Sariola 1994).

El desarrollo del riñón primitivo inicia por la expresión de *Pax-2* y *Sim-1* en el mesodermo intermedio, que a su vez es inducida por *BMP4* esta es secretada desde el ectodermo superficial (Obara-Ishihara y cols. 1999). Estas señales llevan la formación del conducto epitelial de Wolff a partir de las células anteriores y dorsales del mesodermo intermedio. Las células epiteliales mesenquimales comienzan a formar el conducto néfrico. Al

mismo tiempo las células mesenquimales en el mesodermo intermedio ventral forman el “cordón nefrogénico” (Obara-Ishihara y cols. 1999; Torres y cols. 1995), que se extiende en paralelo con el conducto néfrico en donde se han identificado varios factores de transcripción como *Osr1*, *WT1*, *Hoxa11*, *Hoxc11*, *Hoxd11*, *Sall1*, *Six1*, y *Ella1*. A pesar de ser transitoria durante la formación del riñón en los mamíferos, el mesonefro (MN) es crucial para el desarrollo de otros órganos derivados del sistema urogenital tales como gónadas, glándula suprarrenal, y también en la hematopoyesis (Costantini y Kopan 2010).

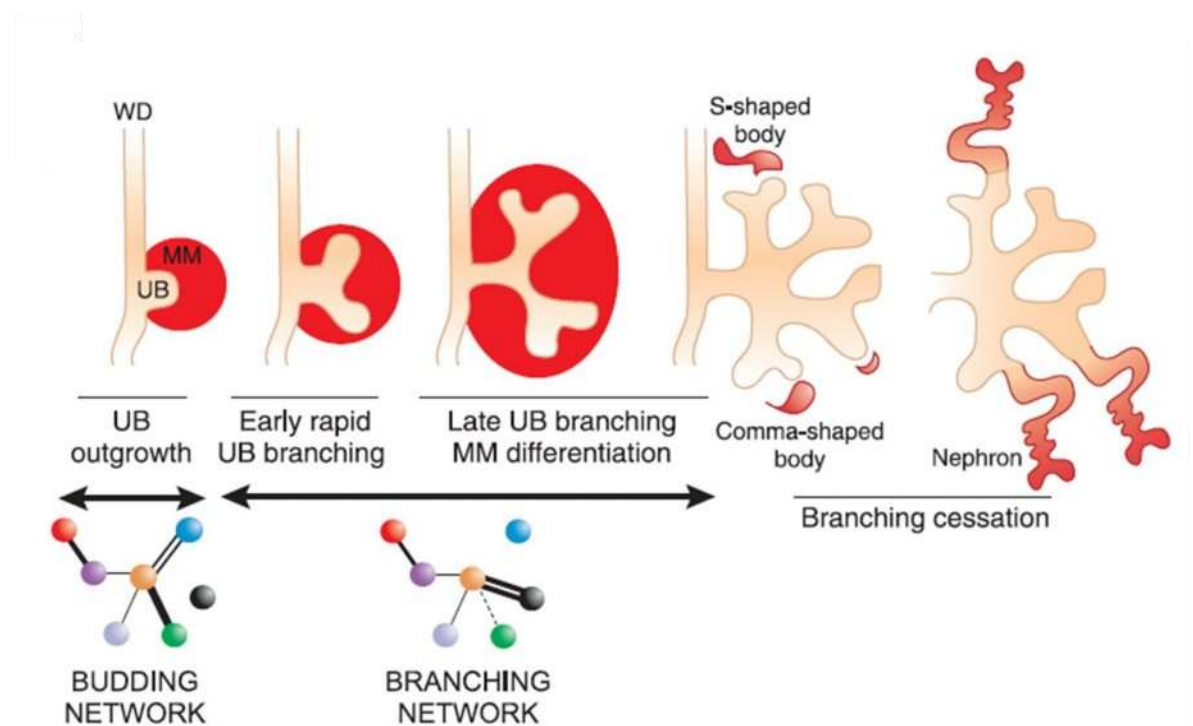


Figura 1. El riñón se origina a partir de dos componentes derivados del mesénquima: El conducto epitelial de Wolff (WD) y el mesénquima metanéfrico (MM). El primer paso para el desarrollo del riñón a partir de la yema uretral (UB) un evento inducido por señales que derivan desde el mesénquima metanéfrico (MM). Después de la formación de la yema uretral, la inducción recíproca entre la UB y MM conducen a múltiples interacciones de ramificaciones y alargamiento de la yema uretral para formar el sistema colector; mientras el mesénquima induce la condensación y la formación de tejido epitelial alrededor de las puntas ramificadas para someterse a transición de mesénquima a epitelio. Estos agregados mesenquimales a través de varias etapas, incluidos las formas coma y S, formando los túbulos metanéfricos que eventualmente maduran en la nefrona (túbulos proximales y distales, epitelio glomerular). Modificado de Nigam y Shah 2009.

El riñón de los mamíferos es separado en corteza y médula renal. La médula se compone de conductos colectores, asa de Henle e intersticio (Little y cols. 2007). La filtración tiene lugar en la corteza, mientras la concentración de orina tiene lugar en la médula (Yu y cols. 2009). En los roedores, el desarrollo de los metanefros comienza entre el día embrionario 10,5-11, cuando la yema uretral se extiende desde el conducto epitelial de Wolff hacia el mesénquima metanéfrico en respuesta a las señales inducidas mediadas por factores de crecimiento (Reidy y cols. 2009). Los reguladores de la derivación y ramificación de la yema uretral son el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), secretada por mesénquima metanéfrico, y el receptor Ret presente en las células de yema uretral. La secreción de GDNF activa al receptor Gfra1/Ret acoplada a tirosina quinasa en el conducto epitelial de Wolff. Esto inicia la cascada de señalización que regula la expresión del receptor Ret y activa la derivación de células positivas a Ret desde el conducto epitelial de Wolff hacia la señalización de GDNF (Constantini y Kopan 2010).

En los días 10-10.5, el primer cambio morfológico es visible en la yema uretral, en el desarrollo se muestra hinchado el WD a nivel del MM. Finalmente en el día 11, desde la parte caudal del conducto epitelial de Wolff hinchado, un brote emerge; crece dorsalmente en el mesénquima metanéfrico para formar la yema uretral. La yema uretral es un tubo epitelial con un lumen continuo que está rodeada por una membrana basal (Meyer y cols. 2004; Chi y cols. 2009). Eventualmente, la elongación de la yema uretral da lugar a la diferenciación en dos diferentes estructuras con diferentes patrones en la expresión génica y desarrollo. Uno es el conducto colector derivado de la punta distal de la yema uretral por ramificación. Otra es el uréter y la pelvis derivado del tronco de la yema uretral (Constantini y Kopan 2010).

La médula y el sistema de conductos colectores se desarrolla a través de la ramificación dicotómica y elongación continua (Yu y cols. 2009; Cebrián y cols. 2004). La yema uretral conforma el sistema colector intrarrenal, el cual comprende los conductos colectores, pelvis y cálices. También forma la uretra y el trígono vesical (Smeeton y cols. 2010). El patrón del riñón se debe a la ramificación de la yema uretral. El epitelio crece y es remodelado, aunque conserva una luz continua en toda su longitud (Meyer y cols. 2004; Davies y cols. 1995; Lindstrom y cols. 2015). El crecimiento de la yema uretral durante la

nefrogénesis está estrechamente relacionado con la proliferación celular. Después de que ha invadido el mesénquima metanéfrico, ocurren nueve ciclos de ramificación entre el día 11.5 y 15.5 creando cerca de 350-500 puntas (Cebrián y cols. 2004; Short y cols. 2010). La ramificación de la yema uretral sigue un patrón específico, la primera ramificación inicia una bifurcación, la cual es seguida de una trifurcación en cada uno de las dos primeras puntas (Majumdar y cols. 2003). La ramificación continúa a través de la bifurcación. Durante este proceso, cada punta se hincha para formar una ámpula rodeada, la cual es remodelada para formar dos o tres puntas que se extenderán para formar nuevas ramas. Se puede observar que la fase de ramificación es rápida, con aumento en la proliferación celular en las puntas y poco en el tronco de la yema uretral. Algunos estudios han mostrado que las células de la punta permanecen indiferenciadas, mientras que las células del tronco inician a expresar genes característicos de los conductos colectores maduros (Caruana y cols. 2006; Schmidt-Ott y cols. 2005). Finalmente, después del día 15.5 la tasa de ramificación disminuye. Sólo el tronco se extiende ampliamente, formando el conducto colector, la médula renal y la papila. La generación de nuevas nefronas en roedores continúa después del cuarto día de nacimiento, y la ramificación se detiene al mismo tiempo (Hartman y cols. 2007).

Después del brote de la yema uretral y la subsecuente invasión del mesénquima metanéfrico, la yema uretral se somete a varias generaciones de ramificación repetida, como se describió anteriormente. Este período es seguido por un período de reducción de la ramificación con el alargamiento de los conductos colectores. Señales derivadas del uréter inducen el desarrollo de las nefronas, que inicia la transición de mesénquima a epitelio (MET). Células madre/progenitoras dentro del epitelio de la yema uretral interactúa con la capa adyacente del mesénquima (Constantini y Kopan 2010) a través de señales de GDNF y FGF secretada por la capa del mesénquima (Saburi y cols. 2008). Las células inician a formar agregados pre-tubulares justo debajo de la punta de la yema uretral. El miembro de la familia Wnt 9B (*Wnt9b*) es secretado por el epitelio de la yema uretral e induce progenitores de la capa adyacente del mesénquima a diferenciarse en vesículas de epitelio renal (Carroll y cols. 2005). El epitelio renal recién formado se somete a polarización y elongación para formar cuerpos delimitados en forma de coma y S. Este último se fusiona con el epitelio de la yema

uretral para formar la nefrona (Georgas y cols. 2009). Una segmentación de podocitos glomerulares especializados, el túbulo contorneado proximal, asa de Henle y el túbulo contorneado distal forman la nefrona, se ha reportado que este proceso termina al séptimo día posnatal en la rata; sin embargo, el proceso de maduración funcional continua (Little y cols. 2007; Figura 2).

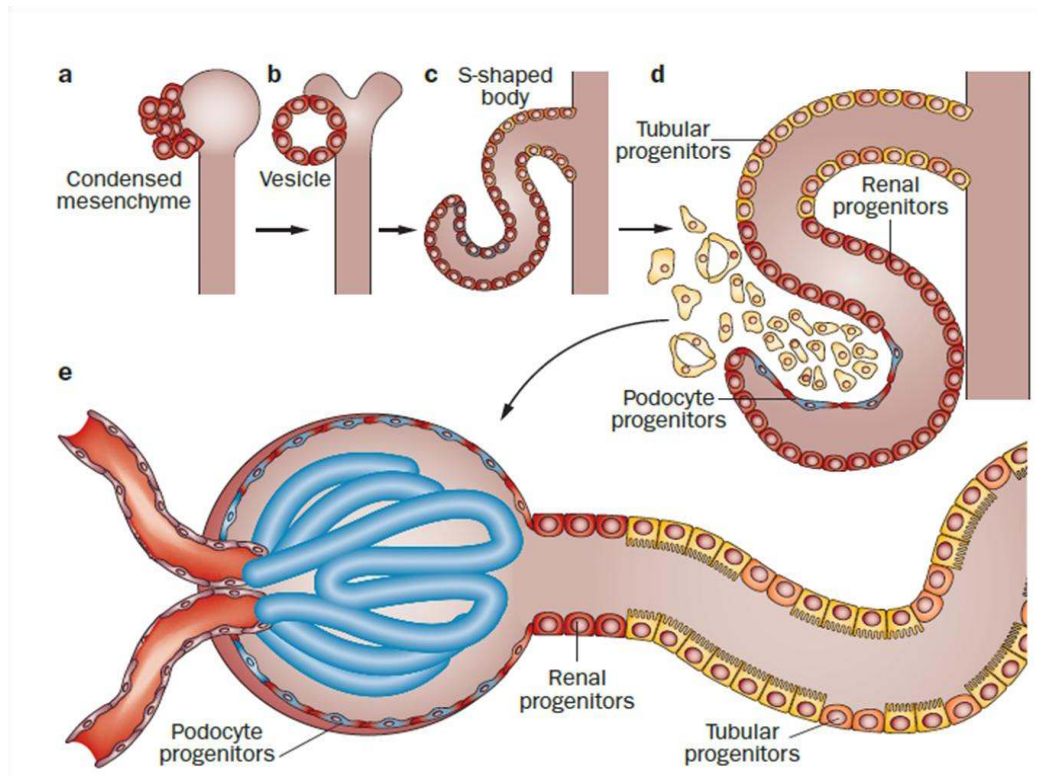


Figura 2. Las células mesenquimales cerca de la punta de la yema uretral, la ramificación se somete a transición epitelial y se diferencia a través de una serie de formas compuesta de progenitores renales. (a) Formas agregadas, (b) Formas de vesículas renales, (c) Progenitores renales también se localizan en el cuerpo en forma de S (rojo); sin embargo, los progenitores de los podocitos están ya se pueden ver (rojo + azul) así como los progenitores tubulares (naranja), (d) Nefrona madura, progenitores renales (rojo), progenitores de podocitos (rojo + azul), progenitores tubulares (naranja) se distribuyen a lo largo de la nefrona. (e) En el glomérulo, progenitores renales (rojo) se localizan en el polo urinario de la cápsula de Bowman, Progenitores de podocitos (rojo + azul, se localizan a lo largo de la cápsula de Bowman). Tomado de Romagnani y cols. 2013.

La maduración funcional posnatal se asocia con prolongación y maduración de los túbulos renales; los túbulos se caracterizan por tener una pequeña superficie para absorber, hay

pocos transportadores y éstos tienen una función inmadura debido a su inadecuado control hormonal sobre la actividad de los canales (Holtbäck y Aperia 2003). Se ha descrito que durante la infancia los riñones de los mamíferos van aumentando gradualmente el flujo sanguíneo renal y la filtración glomerular con la finalidad de mediar las fluctuaciones diarias de ingesta de líquido y sodio para mantener la homeostasis del fluido corporal (Rhodin y cols. 2009).

En general en mamíferos, los riñones son órganos grandes pares de color rojizo en forma de frijol, se localizan entre la última vertebra torácica y la tercera vértebra lumbar, posición en la cual están protegidos en parte por los pares de costillas undécimo y duodécimo. Se ha descrito que el riñón derecho está un poco más abajo que el riñón izquierdo, debido a que el hígado ocupa un espacio considerable arriba del riñón derecho. En el polo superior de cada riñón, incluida dentro de la fascia renal y de una gruesa capa protectora de tejido adiposo perirrenal, hay una glándula suprarrenal. El borde medial del riñón es cóncavo y posee una incisura vertical profunda, denominada *hilio renal*, que permite la entrada y salida de los vasos sanguíneos, nervios renales y además contiene el segmento inicial del uréter (Tortora y Reynolds 2000).

La superficie de cada riñón está cubierta por una *cápsula* de tejido conjuntivo. La cápsula posee dos capas bien definidas: una capa externa de fibroblastos y fibras colágenas y una capa interna con un componente celular de miofibroblastos. La contractilidad de los miofibroblastos ayuda a resistir las variaciones de presión y volumen que pueden acompañar las variaciones de la función renal. La cápsula se introduce a la altura del hilio para formar la cubierta de tejido conjuntivo del seno y se continúa con el conjuntivo que forma las paredes de los cálices renales y la pelvis renal (Kaissling y Le Hir 2008).

De acuerdo a la anatomía interna del riñón se distinguen dos regiones bien definidas (Kaissling y Le Hir 2008). La corteza renal es la parte externa de color pardo rojizo y la médula renal es la región interna mucho más pálida. Aunque los riñones constituyen menos del 0.5% de la masa corporal total, reciben entre 20 y 25% del flujo sanguíneo, del cual se estima que del 90 al 95% de la sangre que pasa por los riñones está en la corteza y sólo el 5 al 10% está en médula. Los riñones realizan el trabajo más importante en el sistema urinario,

puesto que las otras partes son prácticamente vías de paso y áreas de almacenamiento. Durante la producción de la orina, las nefronas y los conductos colectores realizan tres procesos básicos: filtración glomerular, secreción y reabsorción tubular. El primer paso para la producción de orina, el agua y la mayoría de los solutos del plasma pasan de la sangre, a través de los capilares glomerulares al interior de la cápsula de Bowman, la cual se vacía en el túbulo renal. Conforme el líquido filtrado avanza a lo largo del túbulo renal a través del conducto colector, las células del túbulo reabsorben la mayor parte del agua y muchos solutos útiles filtrados, y retornan a la sangre a medida que el líquido fluye por los capilares peritubulares y los vasos rectos. Conforme el líquido fluye a lo largo del túbulo colector, las células del túbulo y del conducto secretan materiales adicionales, tales como desechos, fármacos e iones en exceso en líquido. La secreción tubular retira una sustancia de la sangre; en otros casos de secreción, por ejemplo, la de hormonas, a menudo se libera una sustancia de la sangre. Los solutos en el líquido que drenan en la pelvis renal permanecen en la orina y, posteriormente, son excretados (Tortora y Reynolds 2000).

Mediante la filtración, reabsorción y secreción, las nefronas mantienen la homeostasis de la sangre (Estrada 2002; Ross y Pawlina 2007). Los riñones poseen un metabolismo muy activo utilizando como combustible la glucosa, ácidos grasos, cuerpos cetónicos y aminoácidos. El riñón lleva a cabo la reabsorción de glucosa, principalmente en el túbulo proximal y es mediado por dos proteínas de transporte: la proteína SGLT1 y la proteína SGLT2. La reabsorción de glucosa puede aumentar en presencia de elevación crónica de las concentraciones de glucosa en plasma como ocurre en las personas diabéticas, lo que incrementa la actividad del transportador renal de glucosa (Figura 3) (Rahmoune y cols. 2005).

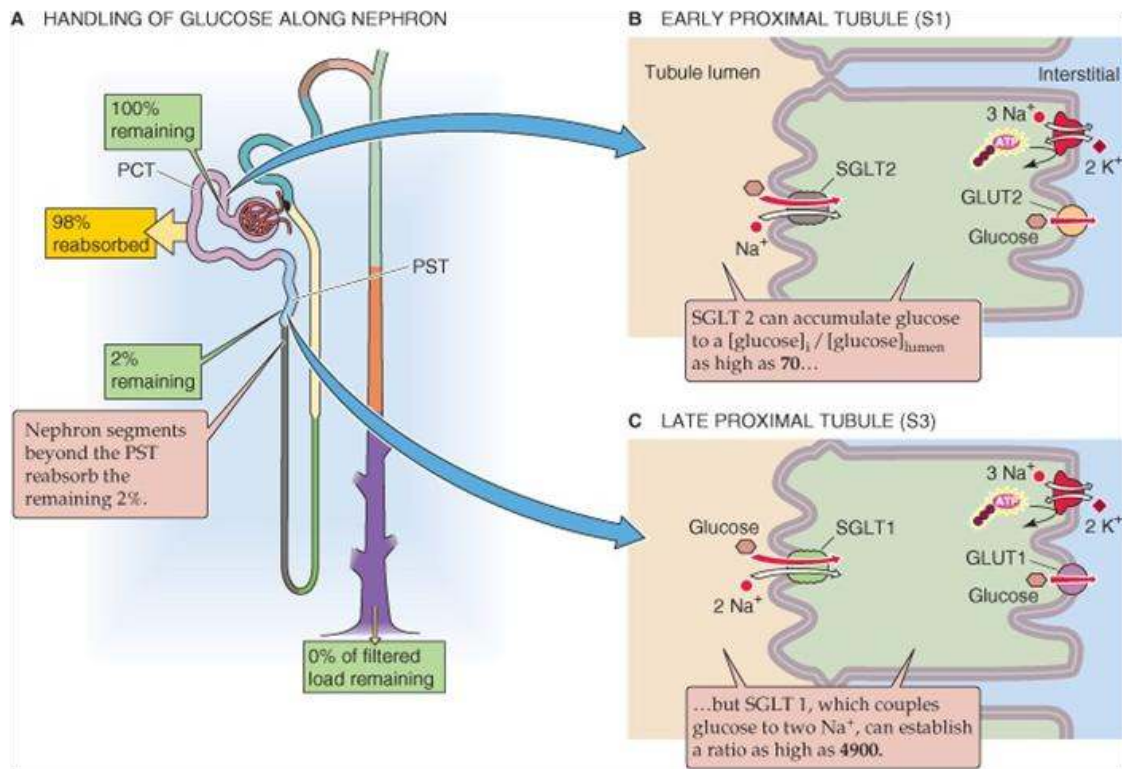


Figura 3. Mecanismo de reabsorción de la glucosa en el túbulo proximal (Tomado de Boron y Boulpaep 2009).

2 Etiología de daño renal en humanos adultos e infantiles

El daño renal es una enfermedad irreversible de ambos riñones en la que el organismo pierde la capacidad de filtrar las sustancias tóxicas de la sangre (Méndez-Durán y cols. 2010). Actualmente la enfermedad renal se ha convertido en un problema de salud pública en muchos países, la causa varía de acuerdo a factores genéticos y ambientales.

En personas adultas se ha asociado a factores ambientales como son: la ingesta elevada de dietas altas en azúcar, sal, grasa y la reducción de actividad física que favorecen la acumulación de grasa visceral, hipertensión y la aparición de alteraciones metabólicas (Odermatt 2011; De Almeida y cols. 2014). Recientemente, se ha reportado que la obesidad visceral comprime los riñones lo que aumenta la reabsorción de sodio en los túbulos y vasodilatación renal e incremento en la filtración glomerular. La activación de estos mecanismos de compensación conduce a un aumento de la tensión de la pared glomerular e hipertrofia glomerular, estos cambios pueden provocar lesiones renales, glomeruloesclerosis y pérdida de nefronas (Hall y cols. 2014). En este mismo contexto, se ha descrito que este

aumento de tejido adiposo activa citoquinas pro-inflamatorias que son producidas por el parénquima renal en respuesta a la hiperglucemia, así como péptidos vasoactivos (angiotensina II y endotelina), los cuales provocan el aumento del TNF- α y estrés oxidativo, causando apoptosis en el podocito, aumento en la síntesis de matriz extracelular y proliferación de células mesangiales (Felizardo y cols. 2014).

Con respecto a la diabetes, se ha observado que la hiperglucemia daña los vasos sanguíneos en el riñón y estimula la liberación de citoquinas inflamatorias y producción de estrés oxidativo en el retículo endoplásmico, aunado a ello, la presencia de resistencia a la insulina afecta la hemodinámica renal a través de la activación del sistema nervioso simpático (a través de la retención de sodio, disminución de la actividad de Na⁺ y K⁺-ATPasa), aumentando la filtración glomerular y provocando hipertrofia glomerular, disfunción endotelial, aumento en la presión capilar glomerular y proliferación de células mesangiales, esclerosis y fibrosis intersticial (Liao y cols. 2012; Chen y cols. 2013; Choi y cols. 2014; García-García y cols. 2014).

La hipertensión se ha observado que aumenta la actividad del Sistema Nervioso Simpático y la activación del Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (RAAS), el cual se relaciona con el incremento de la actividad de angiotensinogeno, renina, aldosterona y la enzima de conversión de angiotensina. El aumento de la angiotensina II mediada por la vasoconstricción estimula la reabsorción de sodio a través del aumento de aldosterona, provocando un incremento en la resistencia periférica y volumen sanguíneo, estos factores deterioran la presión renal causando hipertensión glomerular e hiperfiltración glomerular, inflamación, daño endotelial y estrés oxidativo (Williams y cols. 2014; Lobato y cols. 2012; Hadtstein y Schaefer 2008; Wühl y Schaefer 2008). En este mismo contexto, se ha encontrado que la expresión de NF- κ B, el aumento de angiotensina II y estrés oxidativo causan hipernatremia a través de una sobrecarga aguda de sodio, disminuyendo la expresión de acuaporina 2 (AQP-2) en los túbulos colectores, estas proteínas son importantes debido a que regulan la reabsorción de agua y la concentración urinaria (Della Penna y cols. 2014; Aoki y cols. 2012).

El estrés crónico también está vinculado con el desarrollo del síndrome metabólico y obesidad, aumentando el riesgo a padecer estas alteraciones metabólicas a través de la activación de respuestas neuroendocrinas, como son el sistema nervioso autónomo y vías hormonales (Abraham y cols. 2007), alterando la función renal (Ducher y cols. 2002).

A diferencia de los adultos, en niños y adolescentes el daño renal se ha asociado a otros factores genéticos y ambientales. Las más comunes incluye: aplasia/hipoplasia/displasia, síndrome nefrótico, glomerulonefritis aguda, uropatía obstructiva, enfermedad poliquística del riñón, nefropatía por reflujo, tumor de Wilm, infecciones del tracto urinario ocasionado en su mayoría por *E.Coli*. etc.; otros problemas que pueden afectar el funcionamiento de los riñones son la presencia de hipertensión primaria (Warady y Chadha 2007; Yadav y cols. 2016).

3 ANTECEDENTES

Estudios epidemiológicos en humanos y en modelos animales indican que el desarrollo del riñón prenatal y posnatal es susceptible a modificarse por distintos factores como es la exposición excesiva a glucocorticoides, insuficiencia de vitamina A, malnutrición calórica y alteraciones en el sistema intrarenal renina-angiotensina. Cuando el número de nefronas se ve comprometido se producen cambios funcionales inapropiados que pueden conducir eventualmente al desarrollo de hipertensión o daño renal (Ingelfinger y Woods 2002; Moritz y cols. 2003).

3.1 Modelos animales

3.1.1 Dietas ricas en carbohidratos

Dietas ricas en carbohidratos al destete se han relacionado con la prevalencia de trastornos metabólicos. Varios estudios en ratas macho Wistar han reportado que el consumo de agua azucarada al 30% después del destete durante 18-21 semanas ocasiona aumento de tejido adiposo visceral, hipertensión, intolerancia a la glucosa, dislipidemias (Alexander y cols. 2004; Pérez-Torres y cols. 2009) y aumento en los niveles de insulina (El Hafidi y cols. 2006).

El desarrollo posnatal temprano de los órganos, es un periodo crítico ya que pueden presentar cambios estructurales y funcionales cuando está expuesto a ciertos cambios ambientales como son los nutritivos y el estrés crónico, y estos pueden tener consecuencias durante el transcurso de la vida (Abraham y cols. 2007; Lucas 1998). Con respecto al riñón, Amin y cols. en el 2011, mostraron un aumento en la cantidad de tejido adiposo mesentérico, perirenal y epididimal, niveles elevados de LDL, triglicéridos y colesterol total en ratas macho Wistar adultas que consumieron sacarosa al 65% durante 12 semanas. Además, encontraron un aumento en los niveles de estrés oxidativo y disminución en los niveles de óxido nítrico a nivel sanguíneo y renal, sugiriendo que esto lleva a disfunción renal, caracterizado por los niveles elevados de creatinina y nitrógeno ureico. En este mismo contexto, Coelho y cols. en el 2010, reportaron que el consumo de sacarosa al 20% durante 30 días en ratas macho Wistar adultas presentaron niveles elevados de insulina, leptina y triglicéridos. A nivel renal, aunque no hubo cambios en la expresión del gen de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) 1 y 2 así como de angiotensinógeno, aumento la actividad de la angiotensina II y ECA, por lo que estas alteraciones en el sistema renina-angiotensina en el riñón provocaron un aumento en la presión arterial.

Otros estudios en donde utilizaron ratas adultas Sprague Dawley con un consumo de agua con sacarosa al 20% y dieta alta en grasa durante 16 semanas, mostraron un aumento en la presión arterial, grasa visceral, en los niveles de colesterol, triglicéridos, insulina, excreción de albumina y sodio. A nivel histológico se observó la presencia de lesiones leves en el glomérulo sin encontrar modificaciones en los túbulos-intersticiales, lo que indica la etapa temprana de lesiones renales. Por otro lado, se reportó una disminución en la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular renal (VEGF), el cual es un factor importante para el mantenimiento de la estructura y función renal (Kong y cols. 2011). En este mismo modelo, observaron que aumenta la inmunoexpresión de malondialdehído a nivel glomerular, pero, disminuye la actividad de súper óxido dismutasa a nivel renal. También se aumenta la inmunoexpresión de 3-nitrotirosina en los glomérulos y en los túbulos proximales y distales, provocando lesiones renales debido al aumento de estrés oxidativo y nitrativo (Kong y cols. 2012).

Por otro lado, a ratas adultas espontáneamente hipertensas, a las cuales se les indujo diabetes a través de la administración de estreptozotocina, se les proporcionó una dieta alta en sacarosa (20%) durante 8 semanas. Los animales presentaron hiperglucemia, resistencia a la insulina, aumento en los niveles de triglicéridos y colesterol, hipertensión, aumento en la excreción de albumina urinaria. A nivel histológico se encontró hipertrofia renal e hipertrofia glomerular acompañada de un aumento en la expansión en la matriz mesangial y aumento en la expresión de la proteína ILK (Integrin-linked kinase) provocando lesiones y disminución en el número de podocitos los cuales contribuyen a la progresión de daño renal (Dai y cols. 2012). Kubota y cols. en 2013, trabajaron con ratas Goto-Kakizaki de 7 semanas de edad, a las cuales se le administró una dieta alta en sacarosa durante 10 semanas, observaron que estas ratas desarrollan hipertensión, aumenta la excreción de albumina debido a una inadecuada filtración glomerular, además de que hay un aumento en el peso de los riñones asociado a hipertrofia glomerular y aumento del grosor de las membranas glomerulares.

En otros modelos de animales, se ha visto que el consumo de dietas hipercalóricas, también provoca cambios en la función y morfología renal, como es el trabajo de Liu y cols. en el 2007, en donde utilizan cerdos de 3 meses de edad y les proporcionan una dieta alta en sacarosa, grasa y colesterol durante 5 meses, estos presentan un aumento en el peso corporal y en las concentraciones de glucosa, insulina, colesterol y triglicéridos, sin verse afectado los niveles de creatinina y nitrógeno ureico a nivel plasmático, también aumento la excreción urinaria de glucosa, creatinina y albumina, afectándose la histología renal (hay presencia de hipertrofia glomerular, glomeruloesclerosis y aumento de la matriz mesangial).

3.1.2 Estrés

El estrés se caracteriza por un aumento de la actividad en todos los tejidos, estos cambios tienen como patrón central la hiperfunción de la glándula adrenal debido a que aumenta la liberación de glucocorticoides. Se ha demostrado que la exposición temprana a glucocorticoides puede acelerar o retrasar la maduración funcional de los órganos dependiendo el tiempo de exposición y la cantidad (Hook y cols. 1975; Meyer 1985). Aunado a ello, existe poca información sobre los efectos de los diferentes tipos de estrés crónico sobre

los cambios fisiológicos y estructurales que están involucrados en la patogénesis de la enfermedad renal.

La exposición a estrés por restricción de movimiento durante 5 semanas en ratas macho de 4 semanas de edad, incrementan el tamaño de la glándula adrenal, disminuye el peso del riñón, así como, el número de glomérulos, sin encontrar cambios en las concentraciones de creatinina (Benchimol y cols. en el 2011). Lo que sugieren que la exposición temprana a glucocorticoides tiene un efecto negativo sobre la proliferación celular, predisponiendo a los individuos a enfermedades renales e hipertensión en edades posteriores. Por otro lado, la exposición a estrés (periodo de exposición a correr hasta alcanzar agotamiento) en ratones mutados del gen eNOS de 6 meses de edad, durante 15 días y la administración de una dieta alta en sal induce lesiones en el glomérulo (presencia de fibrosis, trombosis y esclerosis) y en los túbulos, así como la presencia de inflamación intersticial, sugiriendo que el daño renal aumenta tras la disminución de óxido nítrico disponible e hipertensión (Pointer y cols. 2012). Por otro lado, en ratas macho Wistar adultas a las cuales se les dió el estímulo de estrés por restricción durante 13 días, y además se les proporcionó solución salina, muestran una reducción en su ingesta de agua y, por ende, en su volumen urinario, así como la excreción de sodio y potasio, sugiriendo que esto podría ser una respuesta homeostática compensatoria al estrés provocando un respuesta anti-natriurética y aumentando la retención sodio (Bensi y cols. 1997).

3.1.3 Dietas ricas en carbohidratos y estrés

En nuestro laboratorio hemos trabajado de manera sistemática los efectos de estrés por restricción de movimiento y el consumo de sacarosa al 30% durante un mes sobre la glándula adrenal e hígado en ratas machos Wistar destetados. Lo que se ha encontrado es que el grupo estresado presenta niveles elevados de corticosterona y atrofia en la glándula adrenal, aumentando el número y tamaño de células en las zonas fascicular y glomerular, disminuyendo la proliferación celular en la zona glomerular y el tamaño de sinusoides en la zona reticular y médula de la glándula adrenal (Díaz-Águila y cols. 2018). Al mismo tiempo, el estrés crónico aumenta la actividad de la enzima 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1

hepática, provocando acumulación de triglicéridos hepáticos y estrés oxidativo, mientras que en las ratas estresadas que consumen sacarosa se revierte los efectos inducidos por el estrés (Corona-Pérez y cols. 2015). En el caso del tejido renal no ha sido reportado.

Se ha descrito que el desarrollo posnatal temprano de los órganos, es un periodo crítico, debido a que los órganos no son totalmente maduros y pueden presentar cambios estructurales y funcionales cuando están expuestos a ciertos cambios como son los nutritivos y el estrés crónico, y que estos pueden tener consecuencias durante el transcurso de la vida (Abraham y cols. 2007; Lucas 1998).

4 JUSTIFICACIÓN

Estudios epidemiológicos correlacionan la presencia de obesidad infantil con el consumo elevado de azúcares refinados (sacarosa y fructosa) y grasas a edades tempranas. Conforme transcurre el tiempo, estos excesos llevan a la aparición de diversas alteraciones metabólicas, que tienen repercusiones a nivel renal (Odermatt 2011; Rojas y cols. 2008; Kurella y cols. 2005; Chen y cols. 2004). Estas alteraciones se ven influenciadas por factores como la cantidad de nutrientes en la dieta, la duración de la exposición a la dieta, el estilo de vida (actividad física) y la exposición a factores estresantes (Abraham y cols. 2007).

Recientemente se ha visto que hay factores comunes que contribuyen al desarrollo de hígado graso no alcohólico y afectaciones a nivel renal, como son: la presencia de resistencia a la insulina, estrés oxidativo, activación del sistema renina-angiotensina y la secreción inadecuada de citoquinas inflamatorias (Yasui y cols. 2011). Además, estudios en ratas han mostrado que el consumo elevado de carbohidratos (Corona-Pérez y cols. 2015; Roncal-Jiménez y cols. 2011; Kaung 1994) y grasas (Flynn y cols. 2013) y la exposición a estrés crónico (Bruder-Nascimento y cols. 2015; Corona-Pérez y cols. 2015; Benchimol y cols. 2011) son susceptibles a modificar la estructura y función de los órganos durante periodos posnatales. Y, en la rata, la etapa posdestete representa un periodo crítico en la ontogenia del riñón porque aún está en desarrollo. Lo que hace que sea un órgano susceptible a modificarse por la dieta y estrés, afectando su organización histológica y función (Moritz y cols. 2003; Holtbäck y Aperia 2003; Ingelfinger y Woods 2002).

Cabe resaltar, que existen pocos estudios que evalúan el riñón después de una ingesta elevada de carbohidratos (Kong y cols. 2012, 2011; Amin y cols. 2011; Coelho y cols. 2010) y estrés crónico (Bruder-Nascimento y cols. 2013) asociado con la aparición de síndrome metabólico durante la edad adulta. Sin embargo, aún no se han realizado trabajos en donde se evalúen los cambios histológicos y funcionales del riñón durante este periodo crítico del desarrollo caracterizado por el cambio de alimentación de una dieta alta en grasa proveniente de la leche materna a una dieta alta en carbohidratos y la exposición a estrés crónico posterior al destete durante la edad juvenil, adulto joven y adulto, ya que como se ha venido

mencionando, este es un órgano indispensable para mantener en homeostasis el cuerpo, a través de la excreción de desechos metabólicos y la producción de hormonas.

5 HIPÓTESIS

El estrés crónico y el consumo de sacarosa inducen alteraciones histológicas en el riñón y cambios en la función renal de ratas macho en edad juvenil, adulto joven y adulto

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Analizar el arreglo histológico del riñón y la función renal en ratas macho en edad juvenil, adulto joven y adulto expuestas a estrés crónico y a una dieta alta en sacarosa

6.2 Objetivos específicos

- Evaluar los cambios histológicos del riñón
- Evaluar la expresión de acuaporina 2 en el túbulo colector del riñón
- Determinar el estrés oxidativo en riñón
- Medir parámetros serológicos de la función renal: urea y creatinina

7 MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Manejo de los animales

Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar de 21 días de edad. Al día del destete se tomaron las ratas machos procedentes de madres diferentes. Las ratas se colocaron aleatoriamente en jaulas independientes, mantenidas en condiciones de bioterio, con un fotoperíodo de 12/12 h, con ciclo luz-oscuridad invertido y temperatura de 20 ± 2 °C. Las ratas se dividieron en cuatro grupos experimentales (n=8, por grupo): ratas que consumieron agua simple (C), ratas que consumieron agua simple más estrés (E), ratas que consumieron agua azucarada al 30% (A30) y ratas que consumieron agua azucarada al 30% más estrés (E+A30) durante uno, dos y tres meses de tratamiento. La manipulación del estrés fue un mes previo al sacrificio. Ver diseño experimental (figura 4).

7.2 Diseño experimental

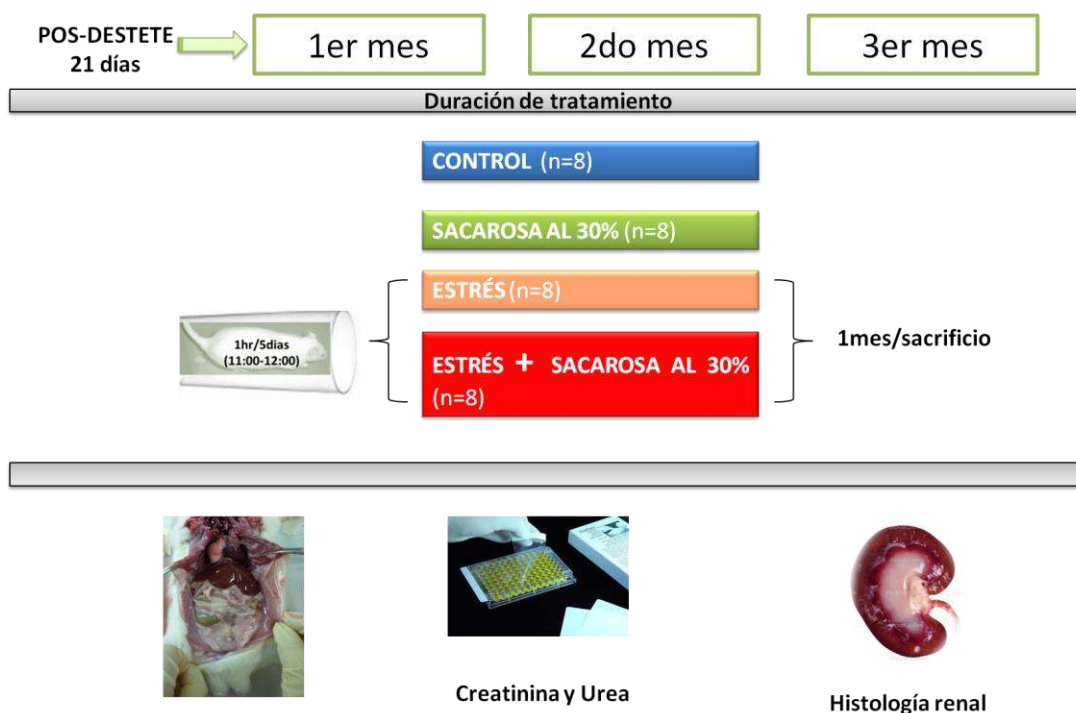


Figura 4. Diseño experimental. Grupo control (C n=8), grupo con estrés (E n=8), grupo con sacarosa al 30% (A30 n=8), grupo con sacarosa al 30% más estrés (E+A30 n=8).

7.3 Protocolo de la dieta

Todas las ratas fueron alimentadas con dieta normal Chow 5001 de Purina (tabla 1). Los grupos experimentales recibieron 30% de sacarosa estándar comercial en el agua que consumieron, las ratas del grupo control consumieron agua simple. El consumo de alimento y agua fue *ad libitum*. Durante el periodo de tratamiento, se realizó un registro diario del peso corporal, consumo de alimento y agua. El consumo de alimento y agua fue medido, colocando una cantidad conocida en cada jaula obteniendo la cantidad remanente 24 h después.

Nutriente	Porcentaje (%)	Kcal
Proteínas	29	98.6
Lípidos	13	44.2
Carbohidratos	58	197.2
Total	100	340

Tabla 1. Aporte calórico y nutrimental por cada 100 gramos de dieta Chow 5001 de Purina.

7.4 Obtención de kilocalorías (kcal) consumidas por el agua

Para la obtención de kcal por agua, se obtuvo la ingesta de agua por semana de vida de cada individuo, posteriormente todas las ingestas se promediaron para obtener los mililitros consumidos por grupo por semana. Los mililitros se multiplicaron por 30 gramos de azúcar y se dividieron entre 100 mililitros de agua para obtener los gramos de azúcar consumidos. Los gramos se multiplicaron por 4 que son las kcal que nos proporciona un gramo de azúcar para obtener las kcal consumidas por el agua.

7.5 Obtención de kilocalorías (kcal) consumidas en el alimento

La obtención de kcal consumidas por el alimento, igual se obtuvo la ingesta de alimento por semana de vida de cada individuo, después todas las ingestas se promediaron para obtener los gramos consumidos por grupo por semana. Estos gramos se multiplicaron por 3.4 que son las kcal que nos proporciona 1 gramo de alimento Chow 5001.

7.6 Estrés

Para someter las ratas a estrés, se colocaron en tubos de plástico de diferentes tamaños, fijados con cinta adhesiva en el exterior, un extremo se mantuvo abierto para que la rata respirara, las ratas fueron expuestas 1 h diaria de estrés de 11:00 a 12:00 h durante 5 días a la semana hasta que concluyeron el experimento (sin estrés los fines de semana; Macedo y cols. 2012).

7.7 Obtención de muestras sanguíneas y riñón

Al término de cada tratamiento, previo al sacrificio, las ratas de todos los grupos experimentales se dejaron en ayuno, para lo cual se les retiró el alimento a las ocho de la noche. A las ratas A30 y E+A30 se les retiró el agua azucarada, colocándoles agua simple para cumplir un ayuno de doce horas, al día siguiente, a las ocho de la mañana. Inmediatamente, tanto las ratas controles como las experimentales, fueron sacrificadas por decapitación para colectar dos tubos (13 x 100mm) de sangre. La sangre se dejó reposar en baño maría durante 15 minutos, después se centrifugó a 2500 rpm durante 15 minutos. El suero se separó para hacer alícuotas de 100µL de suero las cuales se conservaron en congelación a -30°C. Posteriormente se utilizó una alícuota para determinar las concentraciones sanguíneas de urea y creatinina. La rata decapitada inmediatamente se colocó en posición supina¹, se realizó una incisión longitudinal sobre la línea media ventral, desde la cavidad abdominal hasta el dorsal del pene. Los riñones fueron extraídos y pesados. El riñón derecho fue procesado para su análisis histológico, siendo seccionado en 2 dos partes iguales.

7.8 Análisis histológico del riñón

Una sección del riñón derecho fue procesada con Bouin² 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 cinco μm de espesor con un micrótopo. Posteriormente, las primeras laminillas de cada animal, fueron teñidas con PAS (Ácido peryodico de Schiff) para tomar fotomicrofotografías con una cámara OLYMPUS de 5.1 mega píxeles montada en un microscopio óptico Progres (a 4, 40 y 100 aumentos y con un analizador de Adobe Photoshop CS e Imágenes AxioVision REL 4.8 (ZeissInc 2007) se realizaron reconstrucciones de la corteza (figura 5a) para muestrear aleatoriamente los glomérulos y túbulo proximal. Se determinó el área del corpúsculo renal, área glomerular y área de los túbulo proximal (figura 5b). El espacio de Bowman se calculó usando la siguiente fórmula, espacio de Bowman's = área del corpúsculo renal – área glomerular (Tobar y cols. 2013). Cabe mencionar se clasificaron de acuerdo a su tamaño, siempre y cuando se encontraron diferencias en el área general. Corpúsculo renal: chicos ($< 5000 \mu\text{m}^2$) y grandes ($> 5001 \mu\text{m}^2$), espacio de Bowman: chicos ($< 900 \mu\text{m}^2$) y grandes ($> 901 \mu\text{m}^2$), glomérulo: chicos ($< 4000 \mu\text{m}^2$) y grandes ($>4001 \mu\text{m}^2$). Posteriormente, a cada glomérulo se le cuantificó las células mesangiales y se midió la cantidad de matriz mesangial a través del programa Axiovision 4.3 (figura 5c, 5d). Se tomó en cuenta la clasificación de Bernardi y cols. 2015, en donde clasificó la cantidad de matriz mesangial en rangos (**0**, no hay cambios en el glomérulo; **1**, cambios que afectan $<25\%$ del glomérulo; **2**, afecta del $25-50\%$ del glomérulo; **3**, cambios que afectan del $50-70\%$ del glomérulo y **4** es para cambios que afectan $>75\%$ del glomérulo).

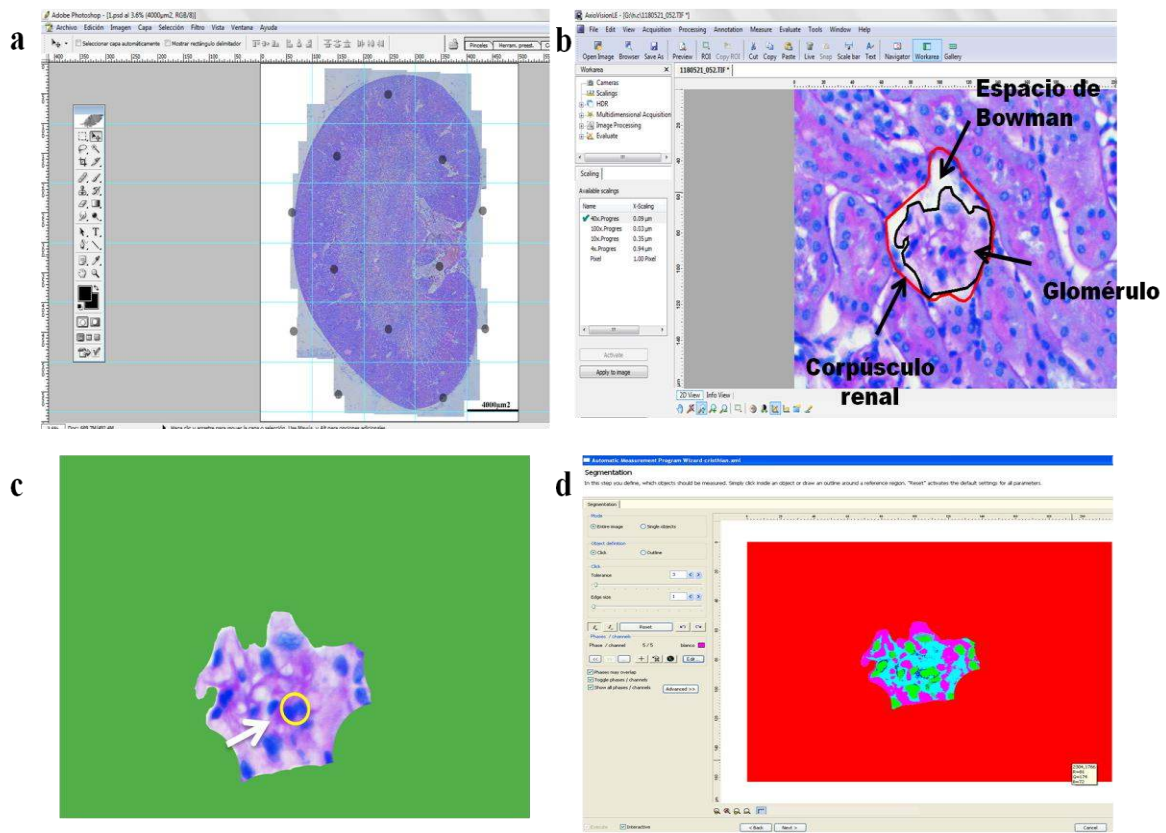


Figura 4. a) Adobe Photoshop CS y la cuadrícula. Fotomicrografías de las reconstrucciones de los cortes del riñón (40x). b) Imagen de AxioVision REL 4.8. Fotomicrografía del corpúsculo renal con tinción de PAS (40x) señalando el glomérulo y espacio de Bowman's. c y d) Axiovision 4.3. Fotomicrografías del glomérulo con tinción de PAS (40x), las flechas blancas indican la ubicación células mesangiales.

7.9 Inmunohistoquímica para la detección de acuaporina 2

Otra laminilla se utilizó para la realización de inmunohistoquímica para la detección de acuaporina 2, presente en las células principales del túbulo colector. Los cortes fueron desparafinados y rehidratados, posteriormente, se utilizó peróxido de hidrógeno al 3% (para inhibir las peroxidases endógenas), se realizaron lavados con PBS y se incubó con suero de burro (5%) durante una hora a temperatura ambiente. Después, se realizaron lavados con PBS-tritón y fueron cubiertas con anticuerpo primario (AQP-2 C-17, Santa Cruz, 1:100) e incubadas durante 72 h a 4°C. Trascorrido ese tiempo se lavaron con PBS y se secaron para la adición del anticuerpo secundario (mouse anti-goat IgG-HRP: sc-2354, Santa Cruz, 1:250), dejándolo incubar en un periodo de 2 h a temperatura ambiente. Luego, se lavaron las

laminillas con PBS y se secaron. El revelado se realizó por medio del kit de diaminobencidina, DAB (la oxidación de la DAB permite la visualización de gránulos de color pardo en citoplasma y membrana), la reacción se detuvo después de 5 minutos con PBS. Se aplicó el colorante de contraste Hematoxilina de Mayer durante 2 minutos, después se lavaron las laminillas con agua corriente, se deshidrataron con etanol en forma ascendente (70, 80, 90 y 100%), se sumergieron en xilol y se montaron con resina. Posteriormente se tomaron de 2 a 3 fotomicrografías a 10 aumentos en la parte superior e inferior de la corteza y médula con una cámara OLYMPUS de 5.1 mega píxeles montada en un microscopio óptico Progres, en donde se semi-cuantificó el porcentaje de área marcada usando el programa Axio Vision Rel 4.6 (Zeiss Software Inc.).

7.10 Cuantificación de triglicéridos en riñón

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 (J. T. Baker, México). 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 nuevo tubo para evaporar la muestra. 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 el método del kit enzimático (Elitech Clinical Systems, México). Los niveles de TG en riñón fueron reportados como mg de TG/g de peso renal.

7.11 Determinación de estrés oxidativo

El estrés oxidativo (lipoperoxidación) se determinó mediante dos técnicas: 1) TBAR's para cuantificación de dialdehído malónico (MDA) y 2) Dienos conjugados (D.O). La cuantificación de MDA se realizó con la técnica del ácido tiobarbitúrico, por espectrofotometría. Se homogenizó 0.2 gramos de riñón en 800 µl de Buffer. Posteriormente, se utilizó 1mg de proteína de cada muestra y se incubó en 1 mL de buffer de Tris 0.5 M, pH: 7.4 durante 30 minutos a 37° C en baño María. Después se adicionó 1.5 mL de ácido acético al

20% (ajustada a pH 2.5 con KOH), 1.5 mL de ácido tiobarbitúrico al 0.8 % y 0.5 mL de agua desionizada. Las muestras se hirvieron durante 45 minutos y luego se añadió 1 ml de KCl al 1.2 % a cada muestra. El complejo coloreado que se formó se extrajo con una solución de piridina-butanol (1:15, v/v) y se cuantificó a 532 nm. El MDA es utilizado como estándar (coeficiente de extinción: $1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$). La peroxidación de los lípidos *in vivo* se determinó midiendo la absorción UV a 233 nm de D.O en los extractos de lípidos (cloroformo-metanol 2:1, v/v) resuspendidos en ciclohexano en todas las muestras.

7.12 Determinación de urea y creatinina

La medición de urea en suero se realizó por el método enzimático-UV-cinético. Las muestras y estándares se analizaron por duplicado y fueron leídos con una absorbancia de 490 nm. Por otro lado, la creatinina en suero se midió por el método colorimétrico-Jaffe-cinético, las muestras y estándares también se analizaron por duplicado y se leyeron con una absorbancia de 510 nm. Se utilizaron kits disponibles por la compañía ELITech Clinical Systems, México.

7.13 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron en una base de datos por medio del programa GraphPad Prisma 5.01 (Windows). A través de pruebas de ANOVA de una vía y dos vías, seguido de una prueba post hoc de Bonferroni y Newman-Keuls, respectivamente. Los factores considerados para el análisis anterior fueron el estrés, la dieta alta en sacarosa y la interacción entre ellos. En todos los casos, $p \leq 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo. Todos los datos muestran la media \pm e.e.

8 RESULTADOS

8.1 Primer mes de tratamiento

8.1.1 Parámetros de crecimiento

La ganancia de peso corporal fue similar entre grupos (dieta, $F_{1,1,31}=1.29$, $p>0.05$; estrés, $F_{1,1,31}=4.64$, $p>0.05$; interacción, $F_{1,1,31}=0.11$, $p>0.05$; Tabla 2). Sin embargo, los grupos A30 y E+A30 disminuyeron su ingesta de alimento aproximadamente un 50% comparado con los grupos C y E, sin presentar interacción (dieta, $F_{1,1,31}=107.17$, $p<0.05$; estrés, $F_{1,1,31}=0.06$, $p>0.05$; interacción, $F_{1,1,31}=0.60$, $p>0.05$; Tabla 2). Las ratas del grupo A30 bebieron más agua, comparado con el grupo C, sin observar interacción (dieta, $F_{1,1,31}=11.47$, $p<0.05$; estrés, $F_{1,1,31}=1.83$, $p>0.05$; interacción, $F_{1,1,31}=0.93$, $p>0.05$; Tabla 2). Esta variable fue similar entre los grupos E y E+A30. Por consiguiente, la ingesta total de calorías fue más alta en los grupos A30 y E+A30 (dieta, $F_{1,1,31}=120.26$; $p<0.05$; estrés, $F_{1,1,31}=1.11$, $p>0.05$; interacción, $F_{1,1,31}=0.04$, $p>0.05$; Tabla 2).

PARÁMETROS	C	E	A30	E+A30
Ganancia de peso corporal (g)	129±9	112±8	122±8	98±12
Ingesta de alimento (g/día/100g Peso Corporal)	11 ±0.5 ^a	10±0.5 ^a	±0.2 ^b	6±0.4 ^b
Ingesta de agua (mL/día/100g Peso Corporal)	25±2.0 ^a	25±1.1 ^a	31±1.1 ^b	28±1.3 ^a
Ingesta calórica (kcal)	37±2.1 ^a	35±2.3 ^a	±1.0 ^b	54±2.1 ^b

Tabla 2. Ganancia de peso corporal, ingesta de alimento y agua, ingesta calórica. Se muestra la media±e.e. Letras diferentes, $p<0.05$; $p<0.001$; $p<0.0001$; ANOVA de dos vías Newman-Keuls pos hoc. Control (C), estrés (E), sacarosa al 30% (A30), sacarosa al 30% más estrés (E+A30) (n=8/grupo).

8.1.2 Peso renal

El peso renal disminuyó por el consumo de sacarosa ($p < 0.0001$) en los grupos A30 y E+A30 comparado con el grupo C, sin verse afectado por el estrés ($p > 0.05$). También se observó que el peso renal es aún menor en el grupo E+A30 comparado con el grupo E (Figura 6).

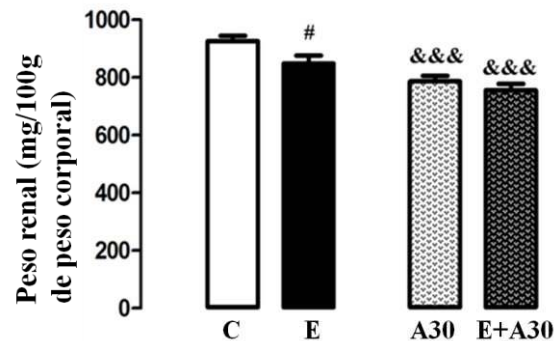


Figura 6. Peso renal. Se muestra la media \pm e.e. &&& $p < 0.0001$, C vs. A30; # $p < 0.05$, E+A30 vs E. ANOVA de una vía Bonferroni post hoc. Grupo control (C), estrés (E), sacarosa al 30% (A30), sacarosa al 30% más estrés (E+A30). (n=6-8/grupo).

8.1.3 Cualidades histológicas del riñón

En el grupo control se observó que los corpúsculos renales presentaban un adecuado espacio urinario el cual permitió llevarse a cabo la filtración. A nivel glomerular y tubular se vio una adecuada organización (Figura 7a-d). Los animales del grupo estresado presentaron menos espacio urinario, por lo cual se vio afectada la filtración glomerular. En los glomérulos se observó un aumento en el número de células mesangiales y acumulación de matriz mesangial además de dilatación en los túbulos proximales y disminución de los espacios sinusoidales (Figura 7e-h). Mientras que el grupo que consumió sacarosa se observó una reducción en el espacio de Bowman y a nivel tubular aumentaron los espacios sinusoidales (Figura 7 i-l). El grupo E+A30 presentó una reducción en el espacio urinario, hiperplasia glomerular, acumulación de matriz mesangial y disminuyeron los espacios sinusoidales a nivel tubular (Figura 7m-p).

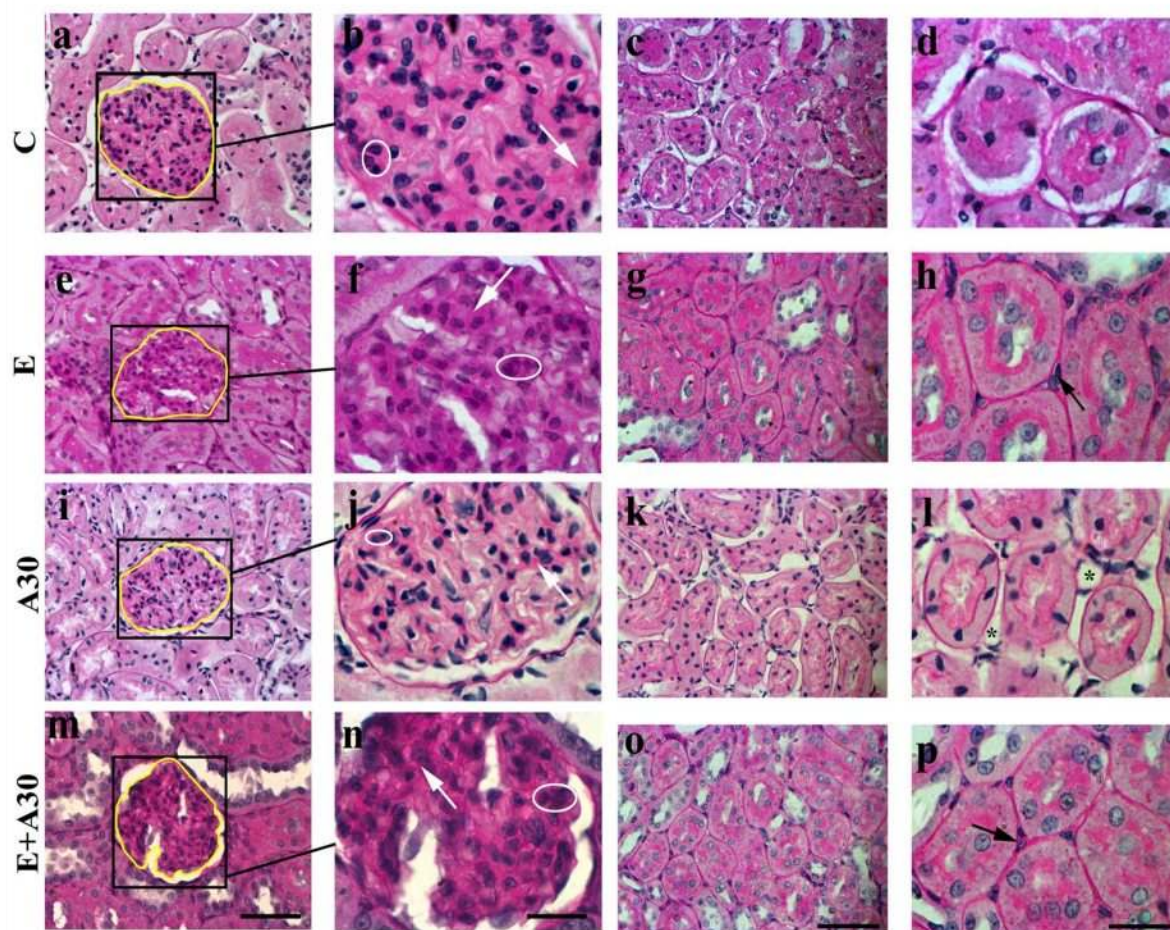


Figura 7. Fotomicrografías de cortes histológicos del riñón. Grupo control (a, b, c, d), grupo estrés (e, f, g, h), grupo de sacarosa al 30% (i, j, k, l) y grupo sacarosa al 30% más estrés (m, n, o, p) con tinción de PAS (40 y 100x). Se observa la presencia de corpúsculos renales y túbulos proximales. Área glomerular (delimitada por una línea amarilla), células mesangiales (delimitadas por ovalo blanco), matriz mesangial (flechas blancas) y espacios sinusoidales (asterisco negros y flechas negras). Barra de escala 50 μm (a, c, e, g, i, k, m, o), 20 μm (b, d, f, h, j, l, n, p) (n=6-8/grupo).

8.1.4 Cuantificación histológica del riñón

El número total de corpúsculos renales por reconstrucción no fue afectado por el consumo de sacarosa ($p > 0.05$), pero si disminuyó en el grupo E ($p < 0.05$, Figura 8a) comparado al grupo C. El área de los corpúsculos renales fue similar entre los grupos E, A30 y C. Sin embargo, el área disminuyó en el grupo E+A30 ($p < 0.05$) con respecto al grupo C (Figura 8b). Al clasificarse por tamaño se encontró que el consumo de sacarosa no afectó el porcentaje de

corpúsculos grandes, mientras que el estrés ($p < 0.05$) disminuyó el porcentaje de corpúsculos en los grupos E y E+A30 comparado al grupo C (Figura 8c). El área del espacio de Bowman's fue similar entre grupos (Figura 8d). Con respecto a su clasificación, el porcentaje de corpúsculos renales con un espacio de Bowman's grande no se afectó por el consumo de sacarosa, pero si por el estrés ($p < 0.05$) en los grupos E y E+A30 comparado con el grupo C (Figura 8e).

El área glomerular no fue afectada por el consumo de sacarosa y estrés. Sin embargo, disminuyó en el grupo E+A30 ($p < 0.001$) comparado con el grupo C (Figura 8f). Aunado a lo anterior, en la clasificación se encontró que el consumo de sacarosa no afectó el porcentaje de glomérulos grandes, pero el factor estrés ($p < 0.05$; $p < 0.001$, respectivamente) disminuyó el porcentaje de glomérulos grandes en los grupos E y E+A30 comparado al grupo C (Figura 8g). La cantidad de células mesangiales del grupo que consumió sacarosa fue similar al grupo C. Sin embargo, aumentó en los glomérulos chicos del grupo estresado ($p < 0.0001$) comparado con el grupo C (Figura 8h). En relación con la cantidad de matriz mesangial no fue afectada por el consumo de sacarosa, pero aumentó por el estímulo del estrés ($p < 0.05$, Figura 8i) en los grupos E y E+A30 comparado al grupo C. Además se encontró que fue mayor la cantidad de matriz mesangial en el grupo E+A30 comparado al grupo A30.

El área de los túbulos proximales fue similar entre los grupos E, A30 y C. Sin embargo, esta disminuyó en el grupo E+A30 ($p < 0.05$) vs el grupo C debido al consumo de sacarosa (Figura j).

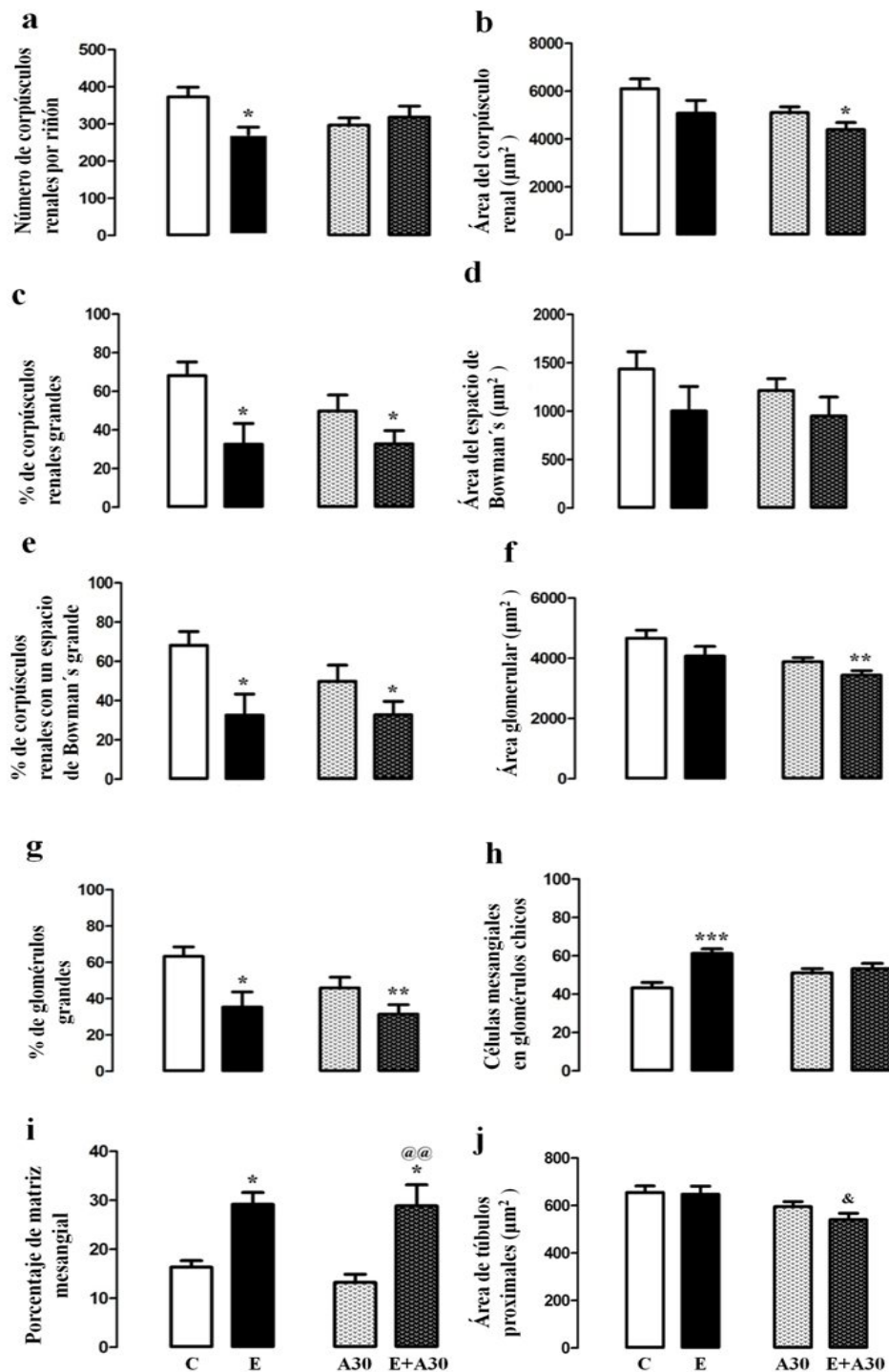


Figura 8 (a) Número de corpúsculos renales por reconstrucción de cada riñón, (b) Área del corpúsculo renal, (c) Porcentaje de corpúsculos renales grandes, (d) Área del espacio de Bowman's, (e) Porcentaje de corpúsculos renales con espacio de Bowman grande, (f) Área glomerular, (g) Porcentaje de glomérulos grandes, (h) Número de células mesangiales en glomérulos chicos, (i) Porcentaje de matriz mesangial, (j)

Área de túbulos proximales. Se muestra la media±e.e. * p<0.05, **p<0.001, *** p<0.0001, C vs. E; @@ p<0.001, E+A30 vs A30; & p<0.05, E+A30 vs C. ANOVA de una vía Bonferroni post hoc. Grupo control (C), estrés (E), sacarosa al 30% (A30), sacarosa al 30% más estrés (E+A30). (n=6-8/grupo).

8.1.5 Inmunolocalización de acuaporina 2

La inmunolocalización de AQP2 se expresó en las células principales de los conductos colectores en corteza y médula de todos los grupos (Figura 9a-p). Por lo que se realizó una semicuantificación del porcentaje de área marcada y se encontró que el grupo E (p<0.0001) tuvo mayor porcentaje de marcaje en ambas zonas comparado con los grupos E+A30 y C (Figura 9q, r). Sin embargo, la sacarosa (p<0.05) disminuyó el porcentaje de marcaje en el grupo E+A30 vs el grupo C (Figura 9r).

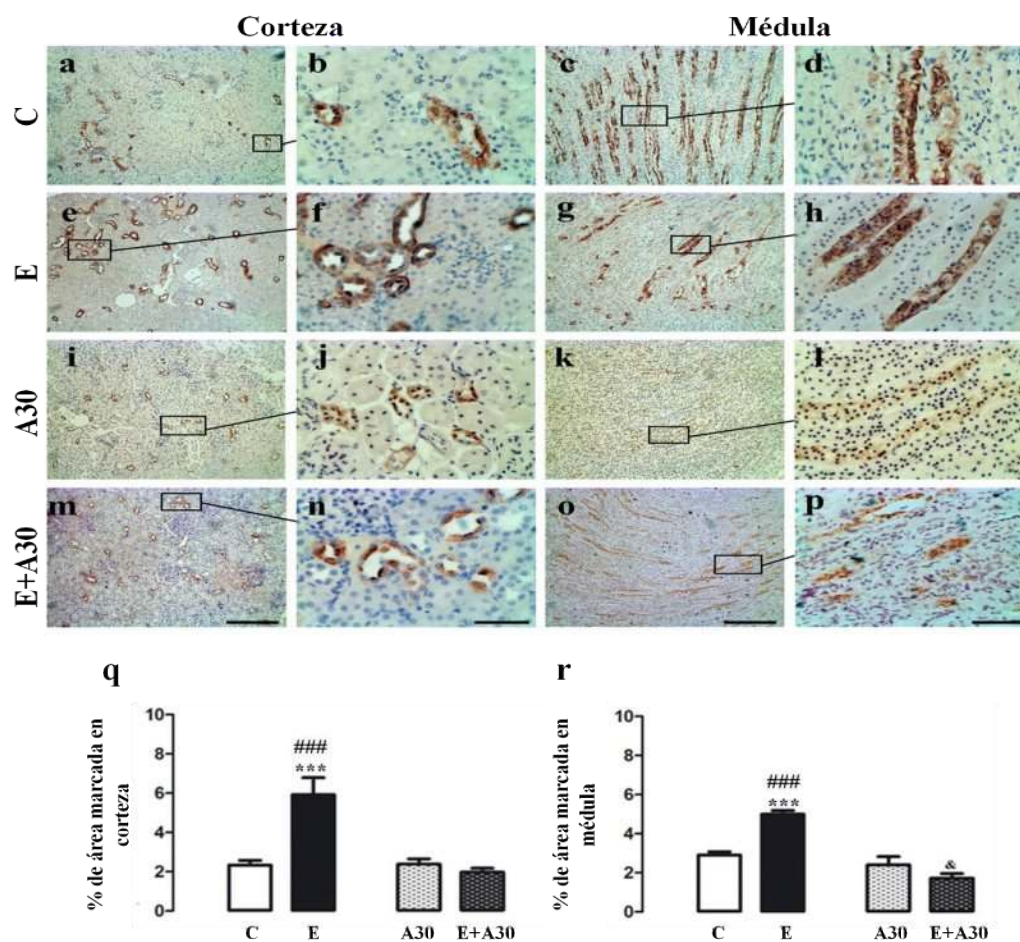


Figura 9. Fotomicrografías de acuaporina 2 en los túbulos colectores del riñón y porcentaje de área marcada. Se muestra la media±e.e. *** p<0.0001, E vs C; ###p<0.0001, E+A30 vs E; & p<0.05, E+A30 vs C.

ANOVA de una vía Bonferroni post hoc. Grupo control (C), estrés (E), sacarosa al 30% (A30), sacarosa al 30% más estrés (E+A30). (n=6-8/grupo). Grupo control (a, b, c, d), grupo estrés (e, f, g, h), grupo de sacarosa al 30% (i, j, k, l) y grupo sacarosa al 30% más estrés (m, n, o, p). Contra-teñidas con Hematoxilina de Mayer (10x y 40x). Barra de escala 200 μm (a, c, e, g, i, k, m, o), 50 μm (b, d, f, h, j, l, n, p) (n=8/grupo).

8.1.6 Estrés oxidativo

Los niveles de dienos conjugados y malondialdehído no se afectaron por el consumo de sacarosa y estrés (Tabla 3).

	C	E	A30	E + A30
D.O (233nm)	0.09 \pm 0.03	0.12 \pm 0.03	0.13 \pm 0.03	0.13 \pm 0.06
MDA (nmol/ mg proteína)	3.10 \pm 0.81	3.24 \pm 0.44	2.90 \pm 0.43	2.96 \pm 0.41

Tabla 3. Dienos conjugados y Malondialdehído. Se muestra la media \pm e.e. ANOVA de una vía Bonferroni post hoc. Grupo control (C), estrés (E), sacarosa al 30% (A30), sacarosa al 30% más estrés (E+A30). (n=6-8/grupo).

8.1.7 Urea y creatinina

Los niveles de urea sérica fueron similares entre los grupos (Figura 10a). Sin embargo, los niveles de creatinina sérica disminuyeron en el grupo E ($p < 0.001$, Figura 10b) comparado al grupo C, sin verse afectado por el consumo de sacarosa ($p > 0.05$). Sin embargo, aumentaron los niveles de creatinina en el grupo E+A30 por el consumo de sacarosa comparado con el grupo E.

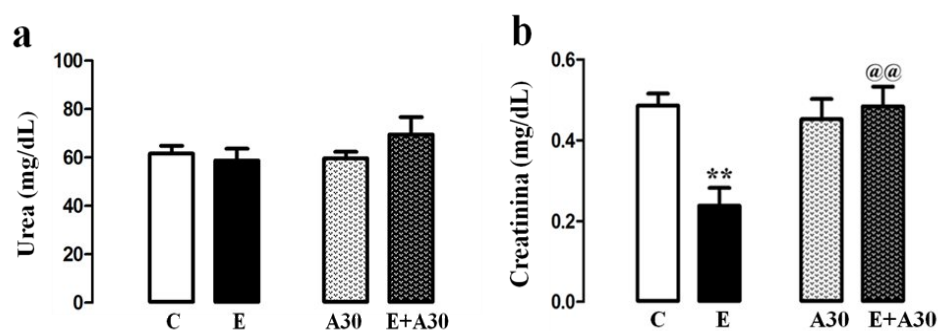


Figura 10 (a) Niveles de urea sérica, (b) Niveles de creatinina sérica. Se muestra la media \pm e.e. ** $p < 0.001$, C vs E; @@ $p < 0.001$, E+A30 vs E. ANOVA de una vía Bonferroni post hoc. Grupo control (C), estrés (E), sacarosa al 30% (A30), sacarosa al 30% más estrés (E+A30). (n=8/grupo).

8.2 Segundo mes de tratamiento

8.2.1 Parámetros de crecimiento

Al finalizar los cuatro grupos del segundo mes del experimento, observamos que disminuyó el peso corporal en los grupos E y E+A30 comparado con los grupos C y A30 (dieta, $F_{1, 1,31}=0.59$, $p>0.05$; estrés, $F_{1, 1,31}=21.34$, $p<0.05$; interacción, $F_{1, 1,31}=0.61$ $p>0.05$; Tabla 4). La ingesta de alimento disminuyó por el consumo de sacarosa ($F_{1, 1,31}=639.31$, $p<0.05$; Tabla 4), y el estrés ($F_{1, 1,31}=25.57$, $p<0.05$; Tabla 4), y esta variable fue más significativamente disminuida por la interacción de ambos factores comparado con el grupo C ($F_{1, 1,31}=4.05$, $p<0.05$; tabla 4). Por otro lado, la dieta ($F_{1, 1,31}=7.81$, $p>0.05$; tabla 4), el estrés ($F_{1, 1,31}=0.45$, $p>0.05$; tabla 4) e interacción de factores ($F_{1, 1,31}=0.02$, $p>0.05$; tabla 4) no afectaron el consumo de agua. La ingesta total de calorías aumentó por la dieta ($F_{1, 1,31}=64.78$; $p<0.05$; tabla 4) en los grupos A30 y E+A30 comparado con el grupo C; sin embargo, el estrés ($F_{1, 1,31}=10.77$, $p<0.05$; tabla 4) disminuyó la ingesta calórica comparado con el grupo C; sin afectarse por la interacción de ambos factores ($F_{1, 1,31}=0.46$, $p>0.05$; tabla 4).

PARÁMETROS	C	E	A30	E+A30
Ganancia de peso corporal (g)	212 ±11.2 ^a	169.9±6.2 ^b	209.4±9.2 ^a	156.6±13.2 ^b
Ingesta de alimento (g/día/100g Peso Corporal)	9.1±0.2 ^a	7.7±0.2 ^b	3.8±0.9	3.2±0.1 ^d
Ingesta de agua (mL/día/100g Peso Corporal)	19.3±0.7	18.8±0.9	22±0.9	21.2±1.1
Ingesta calórica (kcal)	30.9±0.7 ^a	26.3±0.7 ^b	39.4±1.5 ^c	36.5±1.5 ^c

Tabla 4. Ganancia de peso corporal, ingesta de alimento y agua, ingesta calórica. Se muestra la media±e.e. Letras diferentes, $p<0.05$; $p<0.001$; $p<0.0001$; ANOVA de dos vías Newman-Keuls pos hoc. Control (C), estrés (E), sacarosa al 30% (A30), sacarosa al 30% más estrés (E+A30) (n=8/grupo).

8.2.2 Peso renal

El peso renal disminuyó por el consumo de sacarosa ($p<0.0001$) en los grupos A30 y E+A30 comparado con el grupo C y E (Figura 11).

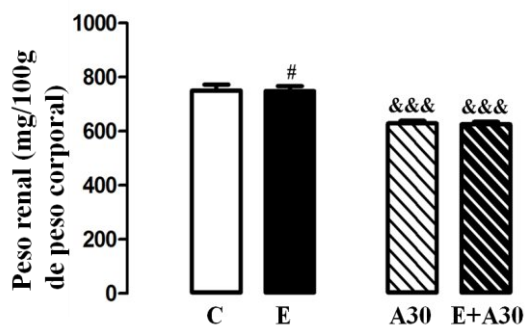


Figura 11. Peso renal. Se muestra la media \pm e.e. &&& $p < 0.0001$; C vs. A30 y E+A30; # $p < 0.05$, E+A30 vs E. ANOVA de una vía Bonferroni post hoc. Grupo control (C), estrés (E), sacarosa al 30% (A30), sacarosa al 30% más estrés (E+A30). (n=8/grupo).

8.2.3 Cualidades histológicas del riñón

El grupo control mostró una adecuada organización, a nivel glomerular se observó la presencia de células mesangiales y matriz mesangial, sin cambios a nivel tubular (Figura 12a-d). El grupo estresado presentó pérdida glomerular y atrofia tubular. Además, los corpúsculos, glomérulos y túbulos proximales que se mantuvieron intactos fueron de menor tamaño (Figura 12e-h). El grupo A30 mostró una reducción en el tamaño de corpúsculos renales y glomérulos. A nivel glomerular se observó menor presencia de matriz mesangial, sin verse cambios a nivel tubular (Figura 12i-l). Mientras que el grupo E+A30 también se observó pérdida glomerular aunque esta no fue tan significativa, además, los corpúsculos y glomérulos fueron más pequeños. A nivel tubular se observó que éstos eran pequeños y presentaban picnosis nuclear (Figura 12m-o).

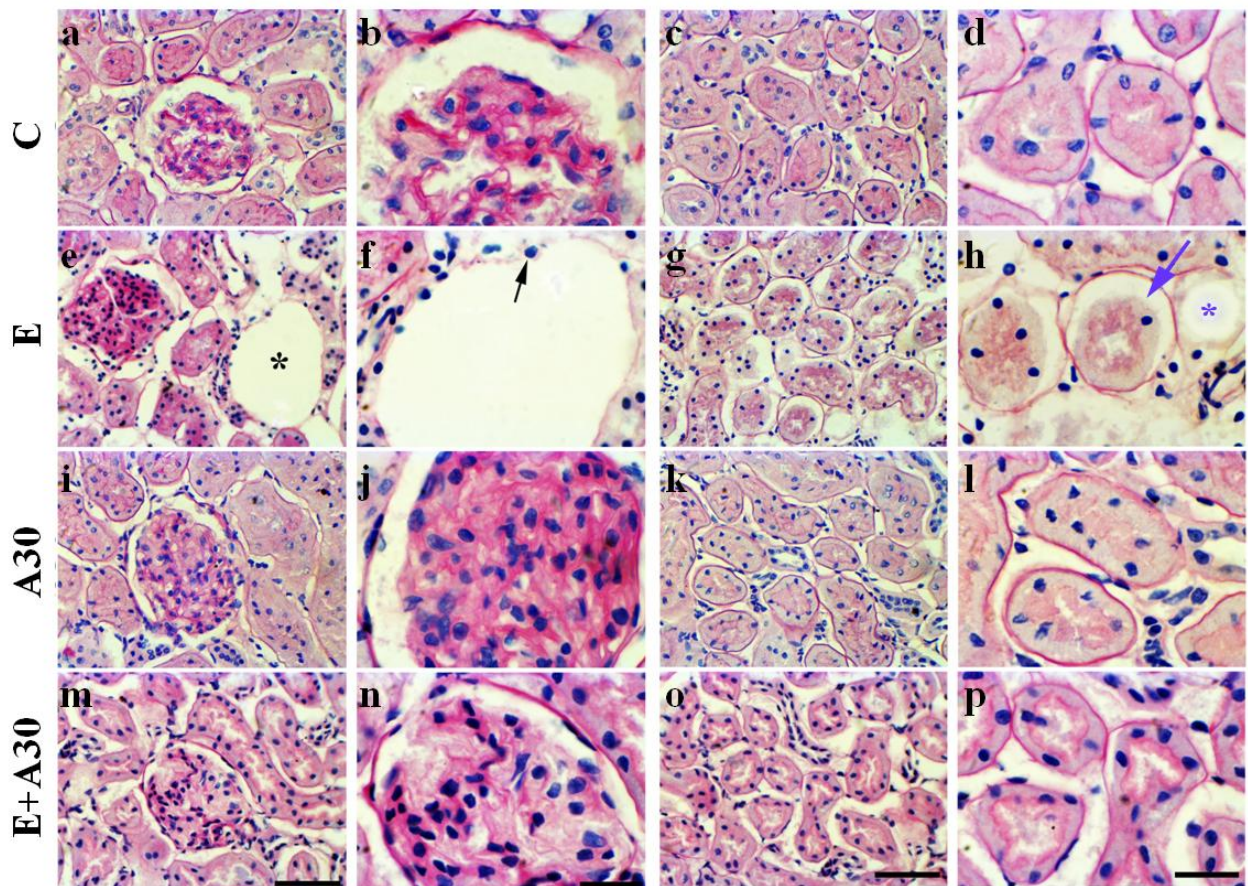


Figura 12. Fotomicrografías de cortes histológicos del riñón. Grupo control (a, b, c, d), grupo estrés (e, f, g, h), grupo de sacarosa al 30% (i, j, k, l) y grupo sacarosa al 30% más estrés (m, n, o, p) con tinción de PAS (40 y 100x). Se observa la presencia de corpúsculos renales y túbulos proximales. Corpúsculos renales que presentan pérdida glomerular (asterisco negro), presencia de la cápsula de Bowman (flecha negra), degeneración del túbulo proximal (flecha azul), atrofia tubular (asterisco azul). Barra de escala 50 μm (a, c, e, g, i, k, m, o), 20 μm (b, d, f, h, j, l, n, p) (n=8/grupo).

8.2.4 Cuantificación histológica del riñón

El número total de corpúsculos renales por reconstrucción no fue afectado por el consumo de sacarosa ni por el estrés (Figura 13a). Sin embargo, observamos que el grupo E presentaba mayor pérdida glomerular vs el grupo C y E+A30 respectivamente ($p < 0.001$; $p < 0.05$, respectivamente, Figura 13b).

El área del corpúsculo renal disminuyó por el consumo de sacarosa ($p < 0.05$) y por el estrés en los grupos E y E+A30 ($p < 0.001$, $p < 0.0001$, respectivamente) comparado al grupo C.

Adicionalmente, el área del corpúsculo renal fue aún menor en el grupo E+A30 *vs* el grupo A30 ($p < 0.05$, Figura 13c). El área del espacio de Bowman's fue similar entre los grupos A30 y C. Sin embargo, el espacio de Bowman's disminuyó por el estrés en los grupo E y E+A30 ($p < 0.0001$, $p < 0.001$, respectivamente, Figura 13d) comparado con a los grupos C y A30.

El área glomerular disminuyó por el consumo de sacarosa ($p < 0.001$), y el estrés en los grupos E y E+A30 ($p < 0.0001$) *vs* el grupo C. Sin embargo, está fue aún menor en el grupo E+A30 comparado al grupo A30 (Figura 13e). El número de células mesangiales fue similar entre grupos (Figura 13f). Mientras, que el porcentaje de matriz mesangial fue menor en el grupo A30 ($p < 0.0001$) comparado con los grupos C y E+A30 (Figura 13g).

El área de los túbulos proximales fue similar entre los grupos A30 y C. Sin embargo, el estrés disminuyó el área de los túbulos en los grupos E y E+A30 ($p < 0.0001$) comparado al grupo C (Figura 13h).

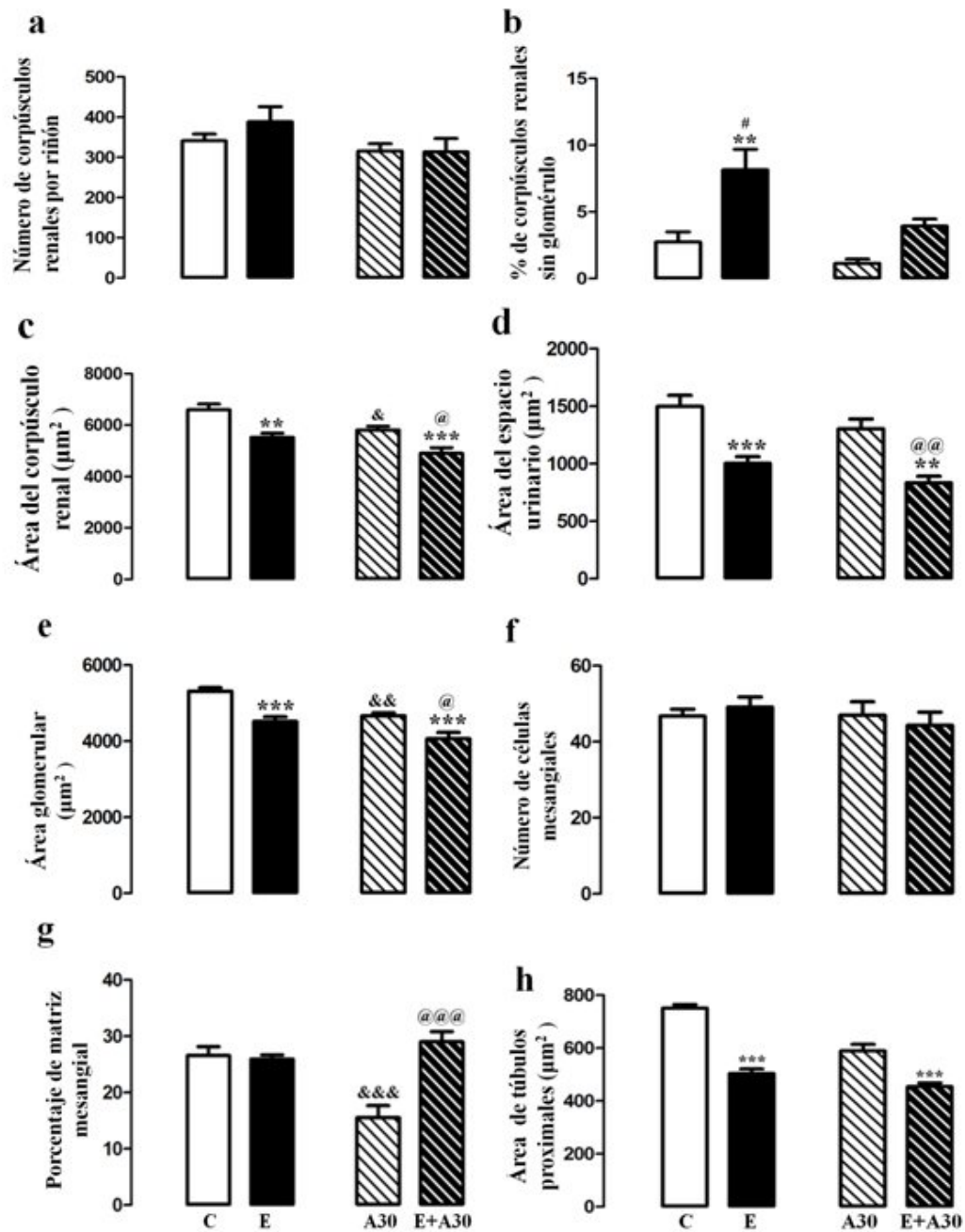


Figura 13 (a) Número de corpúsculos renales por reconstrucción de riñón derecho (b) Porcentaje de corpúsculos renales sin presencia de glomérulo, (c) Área del corpúsculo renal, (d) Área del espacio de Bowman's, (e) Área glomerular, (f) Número de células mesangiales, Porcentaje de matriz mesangial, (h) Área de túbulos proximales. Se muestra la media ± e.e. ** p < 0.001, *** p < 0.0001, C vs. E y E+A30; & p < 0.05, && p < 0.001, &&& p < 0.0001, C vs. A30; @ p < 0.05, @@ p < 0.001, @@@ p < 0.0001, E+A30 vs. A30; # p < 0.05,

E+A30 vs E. ANOVA de una vía Bonferroni post hoc. Grupo control (C), estrés (E), sacarosa al 30% (A30), sacarosa al 30% más estrés (E+A30). (n=8/grupo).

8.2.5 Inmunolocalización de acuaporina 2

La inmunolocalización de AQP2 se expresó en las células principales de los conductos colectores en corteza y médula en todos los grupos (Figura 14 a-p). Se encontró que el consumo de sacarosa ($p<0.001$) y estrés ($p<0.001$) disminuyeron el porcentaje de área marcada de AQP2 en corteza comparado al grupo C (Figura 14q). Mientras que el porcentaje de área marcada en médula sólo fue afectado por el estrés ($p<0.001$) comparado con el grupo C. Adicionalmente el porcentaje de área marcada fue aún menor en el grupo E+A30 vs el grupo A30 (Figura 14r).

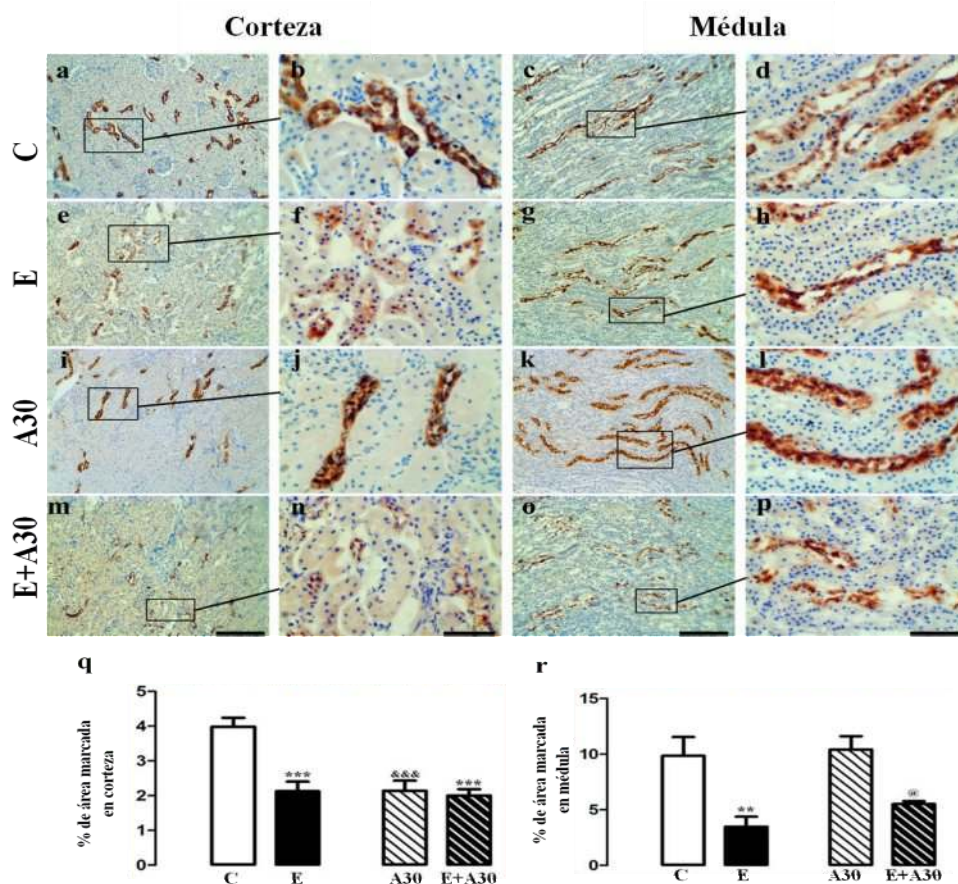


Figura 14. Fotomicrografías de acuaporina 2 en los túbulos colectores del riñón y porcentaje de área marcada. Se muestra la media±e.e. ** $p<0.001$, *** $p<0.0001$, C vs E y E+A30; &&& $p<0.00001$, C vs A30; @ $p<0.05$, E+A30 vs A30. ANOVA de una vía Bonferroni post hoc. Grupo control (C), estrés (E), sacarosa al 30%

(A30), sacarosa al 30% más estrés (E+A30). (n=6-8/grupo). Grupo control (**a, b, c, d**), grupo estrés (**e, f, g, h**), grupo de sacarosa al 30% (**i, j, k, l**) y grupo sacarosa al 30% más estrés (**m, n, o, p**). Contra-teñidas con Hematoxilina de Mayer (10x y 40x). Barra de escala 200 μm (**a, c, e, g, i, k, m, o**), 50 μm (**b, d, f, h, j, l, n, p**) (n=8/grupo).

8.2.6 Contenido de triglicéridos en riñón

La cantidad de triglicéridos en riñón fue similar entre los grupos A30 y C. Sin embargo, el estrés aumentó en contenido de triglicéridos en comparación con los grupos C y E+A30 ($p < 0.001$, $p < 0.0001$, respectivamente, Figura 15).

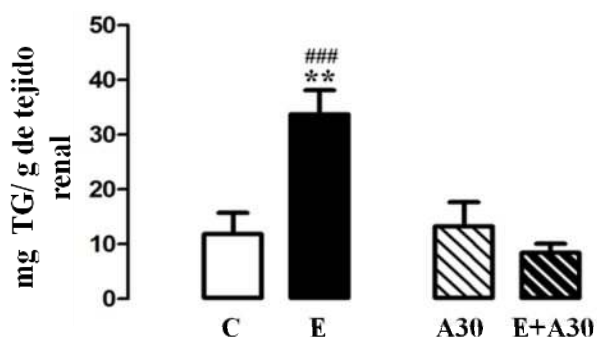


Figura 15. Contenido de triglicéridos en riñón. Se muestra la media \pm e.e. $**p < 0.001$, C vs E; $###p < 0.0001$, E+A30 vs E. ANOVA de una vía Bonferroni post hoc. Grupo control (C), estrés (E), sacarosa al 30% (A30), sacarosa al 30% más estrés (E+A30). (n=7-8/grupo).

8.2.7 Estrés oxidativo

Los niveles de dienos conjugados y malondialdehído fueron similares entre grupos (Tabla 5).

	C	E	A30	E + A30
Dienos conjugados	0.19 \pm 0.01	0.15 \pm 0.02	0.16 \pm 0.02	0.13 \pm 0.02
MDA (nmol/ mg proteína)	1.59 \pm 0.42	1.37 \pm 0.13	0.71 \pm 0.12	0.99 \pm 0.23

Tabla 5. Dienos conjugados y Malondialdehído (MDA). Se muestra la media \pm e.e. ANOVA de una vía Bonferroni post hoc. Grupo control (C), estrés (E), sacarosa al 30% (A30), sacarosa al 30% más estrés (E+A30). (n=6/grupo).

8.2.8 Urea y creatinina

Los niveles de urea sérica no fueron afectados por el consumo de sacarosa ni por el estrés comparado con el grupo C (Figura 16a). Los niveles de creatinina fueron similares entre los

grupos A30, E y C. Sin embargo, estos fueron mayor en el grupo E+A30 vs los grupos E y A30 ($p < 0.0001$, $p < 0.001$, respectivamente, Figura 16b).

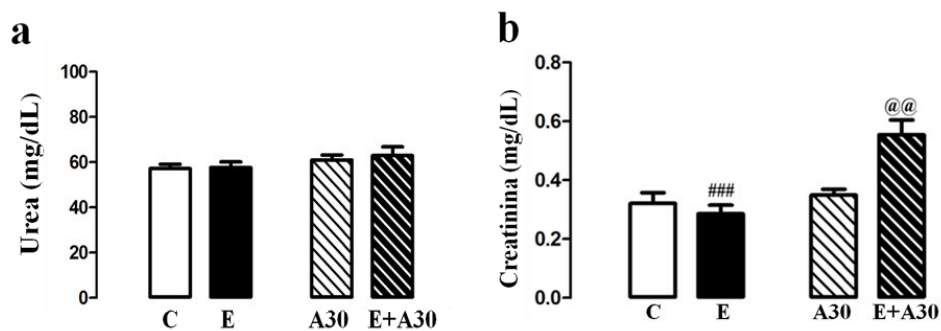


Figura 16 (a) Niveles de urea sérica, (b) Niveles de creatinina sérica. Se muestra la media \pm e.e. ### $p < 0.0001$, E+A30 vs E; @@ $p < 0.001$, E+A30 vs A30. ANOVA de una vía Bonferroni post hoc. Grupo control (C), estrés (E), sacarosa al 30% (A30), sacarosa al 30% más estrés (E+A30). (n=6-8/grupo).

8.3 Tercer mes de tratamiento

8.3.1 Parámetros de crecimiento

Al finalizar los cuatro grupos del tercer mes de experimento, no encontramos cambios en la ganancia de peso corporal (dieta, $F_{1, 1,31}=0.083$ $p>0.05$; estrés, $F_{1, 1,31}=4.30$, $p>0.05$; interacción, $F_{1, 1,31}=0.77$ $p>0.05$; Tabla 6). La ingesta de alimento disminuyó por el consumo de sacarosa ($F_{1, 1,31}=129.22$, $p<0.05$; Tabla 6), y el estrés ($F_{1, 1,31}=3.13$, $p<0.05$; Tabla 6), pero no por la interacción de ambos factores comparado con el grupo C ($F_{1, 1,31}=2.24$, $p>0.05$; tabla 6). Por otro lado, la dieta ($F_{1, 1,31}=3.47$, $p>0.05$; tabla 6) e interacción de factores ($F_{1, 1,31}=1.89$, $p>0.05$; tabla 6) no afectaron el consumo de agua, pero disminuyó por el estrés ($F_{1, 1,31}=8.95$, $p<0.05$; tabla 6). La ingesta total de calorías aumentó por la dieta ($F_{1, 1,31}=42.79$; $p<0.05$; tabla 6) en los grupos A30 y E+A30 comparado con el grupo C; sin verse afectado por el estrés ($F_{1, 1,31}=3.47$, $p>0.05$; tabla 6) e interacción de factores ($F_{1, 1,31}=0.01$, $p>0.05$; tabla 6).

PARÁMETROS	C	E	A30	E+A30
Ganancia de peso corporal (g)	244.4±10.8	262.7±10.4	262.1±17.3	217.3±19.8
Ingesta de alimento (g/día/100g Peso Corporal)	7.39±0.2 ^a	6.23±0.5 ^b	2.8±0.2 ^c	2.7±0.5 ^c
Ingesta de agua (mL/día/100g Peso Corporal)	23±1.5 ^a	15.8±1.2 ^b	23.8±2.2 ^a	21.1±1.5 ^a
Ingesta calórica (kcal)	25.2±0.8 ^a	21.2±1.6 ^a	38±2.8 ^b	34.5±2.3 ^b

Tabla 6. Ganancia de peso corporal, ingesta de alimento y agua, ingesta calórica. Se muestra la media±e.e. Letras diferentes, $p<0.05$; $p<0.001$; $p<0.0001$; ANOVA de dos vías Newman-Keuls pos hoc. Control (C), estrés (E), sacarosa al 30% (A30), sacarosa al 30% más estrés (E+A30) (n=6-7/grupo).

8.3.2 Peso renal

El peso renal no fue afectado por el consumo de sacarosa ni por el estrés (Figura 17).

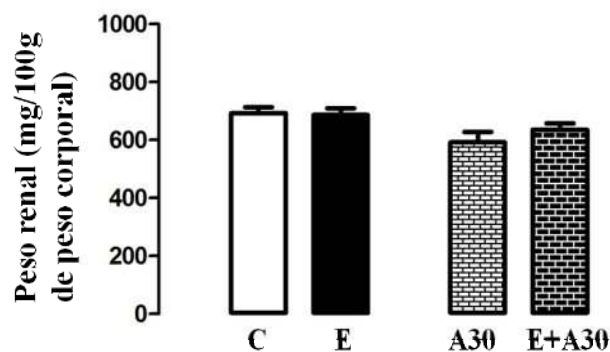


Figura 17. Peso renal. Se muestra la media \pm e.e. ANOVA de una vía Bonferroni post hoc. Grupo control (C), estrés (E), sacarosa al 30% (A30), sacarosa al 30% más estrés (E+A30). (n=6-7/grupo).

8.3.3 Cualidades histológicas del riñón

En el grupo control se observó la presencia de glomérulos y túbulos proximales, los cuales presentaban una adecuada organización en comparación a los grupos experimentales (Figura 18a-d). El grupo estresado presentó pérdida glomerular y degeneración tubular caracterizada por la formación de arrugas en la membrana basal tubular, apoptosis en las células epiteliales tubulares y reemplazo del área con matriz de proteínas fibrosas (Figura 18e-h). El grupo A30 mostró menor porcentaje de matriz mesangial a nivel glomerular y algunos túbulos proximales iniciaron a mostrar degeneración tubular (Figura 18i-l). Mientras que en el grupo E+A30 se observó que los corpúsculos y glomérulos fueron de menor tamaño, así como, reducción en el espacio urinario. Los túbulos proximales presentaron picnosis nuclear (Figura 18m-o).

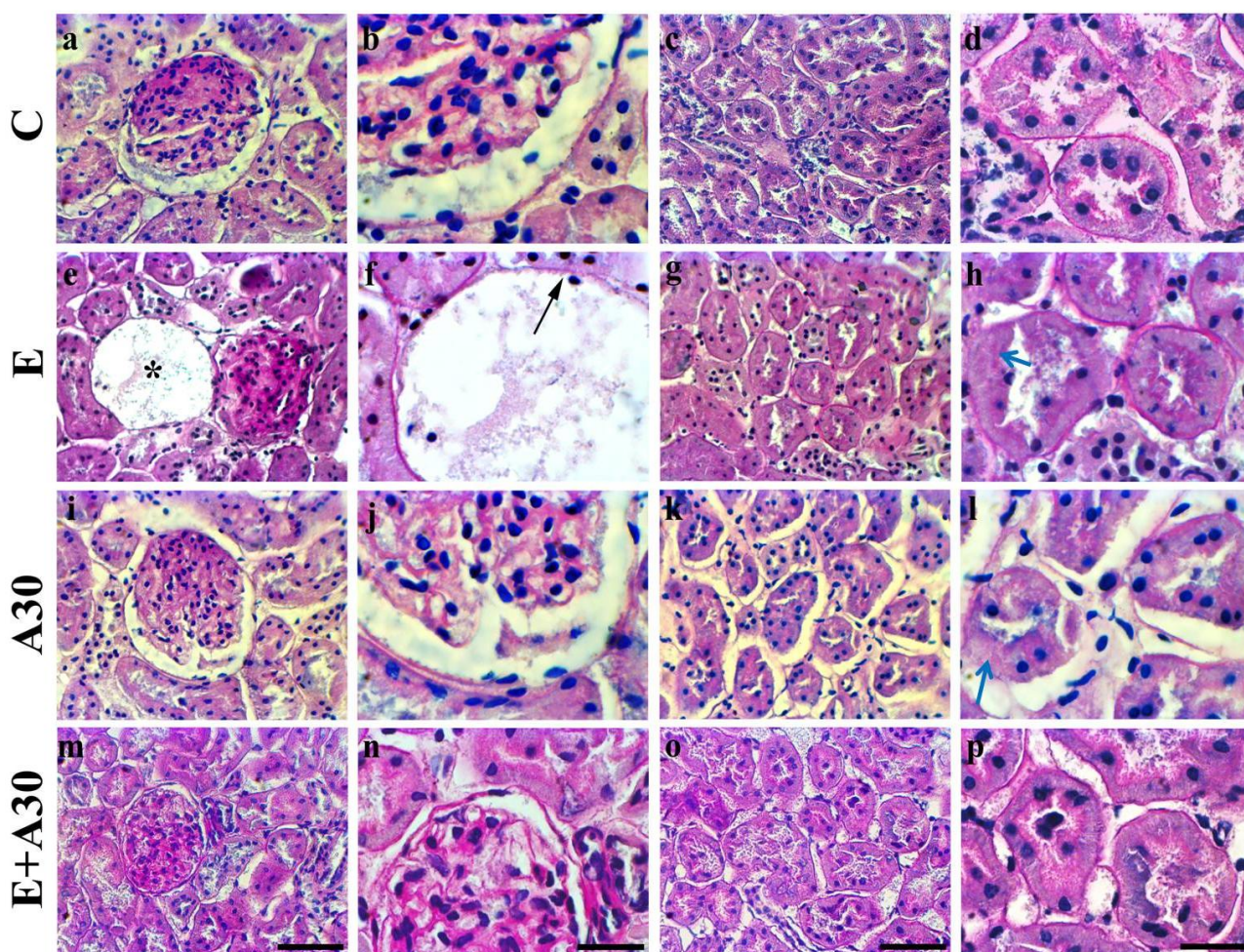


Figura 18. Fotomicrografías de cortes histológicos del riñón. Grupo control (a, b, c, d), grupo estrés (e, f, g, h), grupo de sacarosa al 30% (i, j, k, l) y grupo sacarosa al 30% más estrés (m, n, o, p) con tinción de PAS (40 y 100x). Se observa la presencia de corpúsculos renales y túbulos proximales. Corpúsculos renales que presentan pérdida glomerular (asterisco negro), presencia de la cápsula de Bowman (flecha negra), degeneración del túbulo proximal (flecha azul). Barra de escala 50 μ m (a, c, e, g, i, k, m, o), 20 μ m (b, d, f, h, j, l, n, p) (n=8/grupo).

8.3.4 Cuantificación histológica del riñón

El número total de corpúsculos renales por reconstrucción no fue afectado por el consumo de sacarosa ni por el estrés (Figura 19a). Sin embargo, el consumo de sacarosa ($p < 0.05$, Figura 19b) disminuyó el porcentaje de corpúsculos renales sin glomérulo en el grupo E+A30 vs el grupo C. Por el contrario, el grupo E presentó un mayor porcentaje de corpúsculos renales sin glomérulo comparado con los grupos C y E+A30 ($p > 0.0001$, Figura 19b).

El área del corpúsculo renal no fue afectada por el consumo de sacarosa. Sin embargo, el estrés disminuyó el área corpuscular en los grupos E y E+A30 ($p < 0.001$, $p < 0.0001$, respectivamente, Figura 19c) comparado con los grupos C y A30. El área del espacio de Bowman's no se afectó por el consumo de sacarosa. Sin embargo, el estímulo del estrés disminuyó el espacio de Bowman's en los grupos E y E+A30 ($p < 0.05$, Figura 19d) comparado con el grupo C. Además, el área del espacio de Bowman's fue aún menor en el grupo E+A30 ($p < 0.0001$) vs el grupo A30.

El área glomerular fue similar entre los grupos A30 y C. Mientras que el estrés disminuyó el área glomerular en los grupos E y E+A30 ($p < 0.05$, $p < 0.0001$, respectivamente, Figura 19e) vs el grupo C. Además el grupo E+A30 ($p < 0.0001$) presentó un área glomerular aún menor comparado al grupo A30. El número de células mesangiales no se afectó por el consumo de sacarosa ($p > 0.05$), pero si por el estrés ($p < 0.05$, Figura 19f) vs el grupo C. El porcentaje de matriz mesangial disminuyó por el consumo de sacarosa ($p < 0.05$) vs el grupo C. Sin verse afectado por el estrés (Figura 19g).

El área de los túbulos proximales no fue afectada por el consumo de sacarosa ni por el estrés vs el grupo C (Figura 19h).

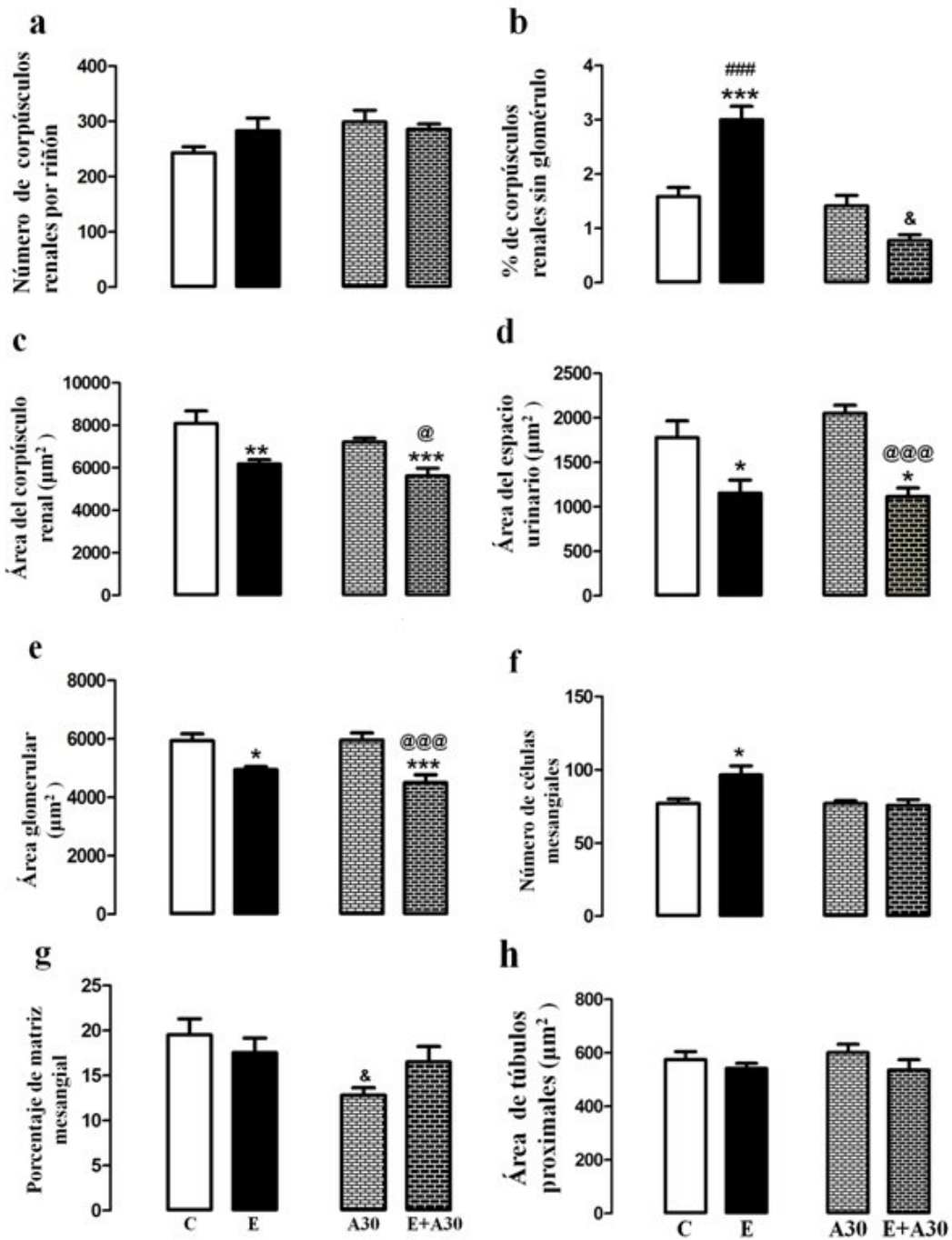


Figura 19 (a) Número de corpúsculos renales por reconstrucción de riñón derecho (b) Porcentaje de corpúsculos renales sin presencia de glomérulo, (c) Área del corpúsculo renal, Área del espacio de Bowman's, (e) Área glomerular, (f) Número de células mesangiales, (g) Porcentaje de matriz mesangial, (h) Área de túbulos proximales. Se muestra la media \pm e.e. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$, C vs. E y E+A30; & $p < 0.05$, C vs A30; @ $p < 0.05$, @@@ $p < 0.0001$, E+A30 vs A30; ### $p < 0.0001$, E+A30 vs E. ANOVA de una

vía Bonferroni post hoc. Grupo control (C), estrés (E), sacarosa al 30% (A30), sacarosa al 30% más estrés (E+A30). (n=6-7/grupo).

8.3.5 Inmunolocalización de acuaporina 2

La inmunolocalización de AQP2 se observó en las células principales de los conductos colectores presentes en corteza y médula (Figura 20 a-p). Al semicuantificar el porcentaje de área marcada por AQP2 no encontramos cambios por el consumo de sacarosa, ni el estrés en comparación al grupo C (Figura 20a-l). Sin embargo, el porcentaje de área marcada en corteza disminuyó en el grupo E+A30 versus el grupo A30 ($p < 0.05$; Figura 20q).

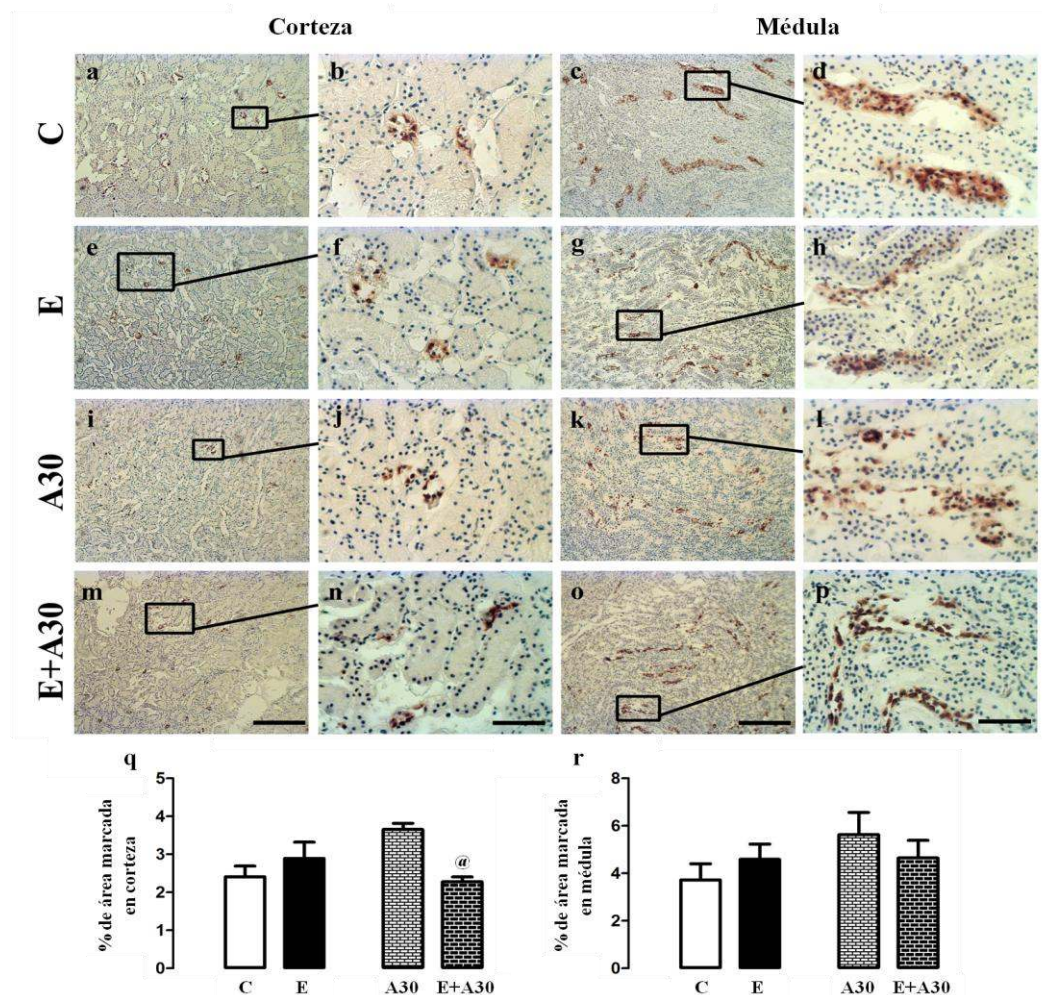


Figura 20. Fotomicrografías de acuaporina 2 en los túbulos colectores del riñón y porcentaje de área marcada. Se muestra la media±e.e. @ $p < 0.05$, E+A30 vs A30. ANOVA de una vía Bonferroni post hoc. Grupo

control (C), estrés (E), sacarosa al 30% (A30), sacarosa al 30% más estrés (E+A30). (n=6-8/grupo). Grupo control (a, b, c, d), grupo estrés (e, f, g, h), grupo de sacarosa al 30% (i, j, k, l) y grupo sacarosa al 30% más estrés (m, n, o, p). Contra-teñidas con Hematoxilina de Mayer (10x y 40x). Barra de escala 200 μm (a, c, e, g, i, k, m, o), 50 μm (b, d, f, h, j, l, n, p) (n=8/grupo).

8.3.1 Contenido de triglicéridos en riñón

El contenido de triglicéridos en riñón no fue afectado por el consumo de sacarosa. Sin embargo, el estrés aumentó la cantidad de triglicéridos en riñón vs el grupo C ($p < 0.001$, Figura 21).

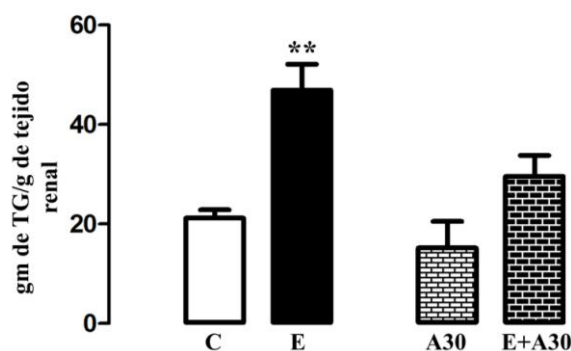


Figura 21. Contenido de triglicéridos en riñón. Se muestra la media \pm e.e. $**p < 0.001$, C vs E. ANOVA de una vía Bonferroni post hoc. Grupo control (C), estrés (E), sacarosa al 30% (A30), sacarosa al 30% más estrés (E+A30). (n=5/grupo).

8.3.2 Estrés oxidativo

Los niveles de dienos conjugados fueron similares entre grupos (Tabla 5). Por otro lado, los niveles de malondialdehído aumentaron en el grupo E ($p < 0.05$) comparado con el grupo C. Adicionalmente el consumo de sacarosa evitó el aumento en los niveles de MDA en el grupo E+A30 vs el grupo E ($p > 0.05$, Tabla 5).

	C	E	A30	E + A30
Dienos conjugados	0.18 \pm 0.02	0.17 \pm 0.03	0.16 \pm 0.02	0.15 \pm 0.02
MDA (nmol/ mg proteína)	0.65 \pm 0.20	1.37 \pm 0.13 ^{*#}	0.71 \pm 0.12	0.67 \pm 0.14

Tabla 5. Dienos conjugados y Malondialdehído (MDA). $*p < 0.05$, C vs. E; # $p < 0.05$, E+A30 vs E. Se muestra la media \pm e.e. ANOVA de una vía Bonferroni post hoc. Grupo control (C), estrés (E), sacarosa al 30% (A30), sacarosa al 30% más estrés (E+A30). (n=6-7/grupo).

8.3.3 Urea y creatinina

Los niveles de urea sérica fueron similares entre grupos (Figura 22a). Los niveles de creatinina no se afectaron por el consumo de sacarosa vs el grupo C. Sin embargo, los niveles de creatinina aumentaron en el grupo estresado ($p < 0.0001$, $p < 0.001$, respectivamente, Figura 22b) comparado los grupos C y E+A30.

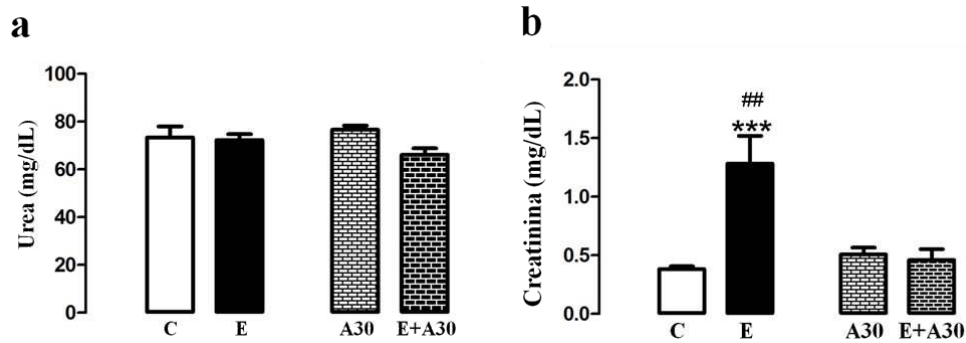


Figura 22 (a) Niveles de urea sérica, (b) Niveles de creatinina sérica. Se muestra la media \pm e.e. *** $p < 0.0001$, E vs C; ## $p < 0.001$, E+A30vs E. ANOVA de una vía Bonferroni post hoc. Grupo control (C), estrés (E), sacarosa al 30% (A30), sacarosa al 30% más estrés (E+A30). (n=6-7/grupo).

9 DISCUSIÓN

9.1 Primer mes de tratamiento

Nuestros resultados muestran que el estrés y la ingesta alta de sacarosa afecta la ingesta de alimento (Bruder-Nascimento y cols. 2013; Corona-Pérez y cols. 2015). La reducción en la ingesta de alimento provocado por el consumo de sacarosa (Corona-Pérez y cols. 2015) se ha asociado a la disminución del peso renal (Uarquin y cols. 2016; Coelho y cols. 2010). En apoyo a lo anterior, nuestros datos muestran que el estrés provoca una disminución en el área del corpúsculo renal, glomérulo y espacio de Bowman en ratas macho jóvenes. Como ha sido reportado en previos estudios, la alimentación y la exposición a eventos estresantes durante periodos intrauterinos y posnatales tempranos tiene efectos adversos sobre la distribución del peso de los órganos (Uarquin y cols. 2016; Tamashiro y cols. 2010).

Se ha mostrado que la exposición temprana a altas concentraciones de glucocorticoides tiene un efecto negativo sobre la proliferación celular, disminuyendo el volumen glomerular y reduciendo el número de nefronas (Benchimol de Souza y cols. 2011; Bensi y cols. 1997). Por consiguiente, nuestros resultados muestran que los animales que fueron sometidos a estrés presentaron menor porcentaje de glomérulos grandes; sin embargo, estos tuvieron mayor número de células mesangiales y aumento en la producción de matriz mesangial, esto pudo deberse al aumento en los niveles de corticosterona que previamente se reportó en este modelo estudiado (Corona-Pérez y cols. 2015). Ya que se ha reportado que la administración de altas dosis de dexametasona estimula la proliferación de las células mesangiales a través de la activación del factor del crecimiento del tejido conectivo promoviendo la acumulación de matriz mesangial (Okada y cols. 2006); así como, cambios en la expresión de proteoglicanos (Kuroda y cols. 2002). Modelos animales sometidos a estrés crónico muestran que hay una relación entre el aumento en los niveles de ACTH, corticosterona y aldosterona (Antonov y cols. 2016). Bernardi y cols. en el 2015 demostraron que la aldosterona induce un aumento en la matriz mesangial y permeabilidad glomerular promoviendo la excreción de albumina. Por otro lado, el estrés también aumenta la expresión de vasopresina, la cual se asocia al aumento en la expresión de acuaporina 2 a nivel renal (Aguilera y Rabadan-Diehl 2000). Estos cambios

se asocian con un proceso de hiperfiltración glomerular, en este estudio se encontró una disminución de creatinina sérica, sugiriéndose que esta aumentada la excreción de este metabolito en orina.

El consumo de sacarosa no fue suficiente para afectar la estructura renal. Esto puede estar relacionado con la falta de efectos sobre las concentraciones de corticosterona sérica que estas ratas mostraron durante este periodo (Corona Pérez y cols.2015). Tal vez un tratamiento más prolongado con una dieta alta en sacarosa podría provocar un daño importante en el riñón. También encontramos que el consumo de sacarosa disminuyó la expresión de AQP-2 en el riñón, probablemente esté relacionado con la reducción de los niveles de corticosterona (Corona Pérez y cols. 2015).

La combinación de ambos factores (estrés crónico y el consumo de sacarosa) no potenciaron el daño en los corpúsculos renales, aunque mantiene el daño provocado por el estrés en todos los parámetros evaluados. Sin embargo, el área de los túbulos proximales se redujo significativamente en el grupo E+A30, posiblemente como un efecto sumatorio a la ingesta de sacarosa.

9.2 Segundo mes de tratamiento

El estímulo del estrés y el consumo de sacarosa durante dos meses, disminuyó la ingesta de alimento (Corona-Pérez y cols. 2017; Bruder-Nascimento y cols. 2013). El consumo de sacarosa proveniente del agua redujo la ingesta de alimento (Corona-Pérez y cols. 2017) afectando el peso renal (Coelho y cols. 2010). Nuestros resultados muestran que el estrés crónico promueve la acumulación de triglicéridos en riñón, pérdida glomerular y atrofia tubular. Mientras que, el consumo de sacarosa provocó una disminución en el área del corpúsculo renal y glomerular. Además, evitó la pérdida glomerular y almacenamiento de triglicéridos inducido por el estrés crónico en ratas macho adultas jóvenes.

A pesar de que los niveles de corticosterona fueron similares entre el grupo estrés y control (Corona-Pérez y cols. 2017). Se ha demostrado que en ratas adrenalectomizadas aumenta transitoriamente la afinidad del receptor de mineralocorticoides (Reul y cols. 1990), por lo que sugerimos que estos animales presentan niveles elevados de aldosterona. Algunos estudios han mostrado que la aldosterona, además de regular el volumen del líquido extracelular y el balance de sodio-potasio, promueve el crecimiento celular, inflamación, fibrosis, hipertrofia glomerular, glomeruloesclerosis y albuminuria (Bernardi y cols. 2015; Remuzzi y cols. 2008; Han y cols. 2006). En particular, los animales estresados correspondientes al segundo mes, mostraron una reducción en el tamaño del glomérulo y túbulo proximal, además se pudo observar la pérdida de glomérulos y atrofia tubular, acompañado de un aumento en la acumulación de triglicéridos. Se ha descrito que la administración de aldosterona en ratas adrenalectomizadas, aumenta la actividad del citrato sintasa mejorando la formación de ATP y favorece la formación de NADPH, lo que permite la síntesis de lípidos (Morris 1981). La acumulación de triglicéridos, también se ha asociado a la sobreexpresión de la proteína de unión al elemento regulador del estero1-1 (SREBP-1), aumentando la expresión del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) causando glomeruloesclerosis (Chen y cols. 2014) y apoptosis tubular (Patni y cols. 2007). Estudios realizados in vivo e in vitro han mostrado que la aldosterona tiene un efecto deletéreo a nivel renal, a través, del aumento en la actividad de NADPH oxidasa, que conlleva a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) provocando una reducción en la expresión de nefrina, pérdida de podocitos y proteinuria (Zhu

y cols. 2011; Kiyomoto y cols. 2008); así como, un aumento en la expresión del factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF) en células mesangiales y túbulo proximales (Han y cols. 2006). De igual manera, encontramos que la expresión de acuaporina 2 estaba disminuida. Hasler y cols. (2003) reportaron que la aldosterona puede alterar transitoriamente la transcripción del gen de acuaporina 2, regulando la unión de uno o varios factores que reprimen la transcripción de este gen.

El consumo de sacarosa empezó a reducir el tamaño del corpúsculo y glomérulo, así como la matriz mesangial. Estos animales presentaron niveles bajos de corticosterona (Corona Pérez y cols. 2017), lo que evitó la acumulación de triglicéridos y formación de estrés oxidativo. Rosenmman y cols. (1971), mostraron que el consumo elevado de sacarosa durante un periodo prolongado es capaz de provocar glomeruloesclerosis y proteinuria asociado con el deterioro a la tolerancia de la glucosa. Lo que sugiere que la resistencia a la insulina regule el desarrollo de la glomeruloesclerosis.

El grupo E+A30, el cual recibió ambos estímulos, presentó una reducción en el tamaño corpuscular, glomerular y tubular acompañado de un aumento en el número de células mesangiales, esto pudo deberse al aumento en las concentraciones de testosterona (Corona-Pérez y cols. 2017; Long y cols. 2013). Se ha reportado que la presencia de andrógenos reduce el volumen glomerular y modifica la composición y síntesis de matriz extracelular (Elliot y cols. 2007). Además, la testosterona tiene la capacidad de activar la vía de las caspasas provocando apoptosis (Elliot y cols. 2007; Verzola y cols. 2004).

9.3 Tercer mes de tratamiento

Por último, el estrés crónico y el consumo elevado de sacarosa durante 3 meses provocó una reducción en la ingesta de alimento (Bruder-Nascimento y cols. 2013; Díaz Águila y cols. 2016). Además, el consumo de sacarosa proveniente del agua disminuyó la ingesta de alimento. Estos resultados son similares con otros trabajos en donde evalúan el consumo de sacarosa hasta la edad adulta (Díaz Águila y cols. 2016; El Hafidi y cols. 2006). El estrés crónico presentó acumulación de triglicéridos en riñón, estrés oxidativo, pérdida glomerular, degeneración tubular y aumentó en los niveles de creatinina sérica. Por otra parte, el consumo de sacarosa mostró menor porcentaje de matriz mesangial en ratas macho adultas.

Se ha descrito en diferentes modelos animales que el aumento en la expresión de la proteína de unión al elemento regulador del estero1-1 (SREBP-1) inducida por la aldosterona, estimula la síntesis y acumulación de triglicéridos en riñón (Jiang y cols. 2007). Además, la exposición de ácidos grasos puede estimular la síntesis de *novo* de diacilglicerol (DAG) favoreciendo la formación de estrés oxidativo, a través de la activación de NADP-H oxidasa dependiente de proteína quinasa C (Sieber y cols. 2013; Inoguchi y cols. 2003, 2000). Con respecto a nuestros resultados, los animales estresados correspondientes al tercer mes presentaron una disminución en el tamaño de los corpúsculos y glomérulos, aumento en el número de células mesangiales sin verse afectada la producción de matriz mesangial, pérdida glomerular y degeneración tubular, esto pudo deberse a la presencia de estrés oxidativo ocasionado por la acumulación de triglicéridos lo que provocó un aumento en los niveles de creatinina sérica. Se ha reportado que el estrés oxidativo promueve la autofagia y apoptosis en los podocitos, glomeruloesclerosis y altera la barrera de filtración glomerular provocando proteinuria (Ratliff 2016; Daehn y cols. 2014). Además, el aumento en los niveles de creatinina se han asociado al deterioro de la filtración glomerular (Papinska y Rodgers 2018), así como la disminución en la síntesis de *novo* de proteoglicanos de heparán de sulfato (Kashihara y cols. 1992).

A diferencia de otros trabajos, donde se ha visto que el consumo de dietas ricas en sacarosa y grasas durante un periodo prolongado induce la aparición de alteraciones metabólicas (hiperinsulinemia y dislipidemias) provocando una disminución en el área glomerular,

acumulación de lípidos, inflamación y estrés oxidativo, lo que lleva a un deterioro en la función renal (Li y cols. 2015; Kong y cols. 2011, 2012). Nuestros datos mostraron que el consumo de sacarosa no fue suficiente para afectar la estructura y función renal en etapas tempranas, a pesar de presentar principios de alteraciones metabólicas (niveles elevados de triglicéridos, leptina, insulina y resistencia a la insulina) (Díaz Águila y cols. 2016). A diferencia de lo que se ha mostrado en animales adultos con resistencia a la insulina.

El grupo combinado (estrés crónico más sacarosa) presentó cambios estructurales similares al grupo estrés, como fueron la reducción en el área del corpúsculo renal y glomerular. Sin embargo, la acumulación de triglicéridos y la producción de estrés oxidativo fueron mitigadas por el consumo de sacarosa, lo que evitó el deterioro de la función renal en este grupo. Lo que refuerza la idea de que la ausencia de aldosterona evite la acumulación de triglicéridos y la producción de estrés oxidativo (Morris 1981).

10 CONCLUSIÓN

El estrés por restricción induce cambios morfológicos a nivel glomerular y tubular, desde el periodo posnatal, alterando la función renal independientemente de los niveles de corticosterona y la edad. Por otro lado, el consumo de sacarosa no afecta la estructura renal. La combinación de estrés por restricción y consumo de sacarosa, presentó efectos similares en la estructura renal como los observados en el grupo estresado desde el destete hasta la edad adulta; sin embargo, la sacarosa evitó la acumulación de triglicéridos en el riñón de estos animales en edad adulta.

De manera que, estos resultados nos permiten concluir que el estrés es un factor mucho más crítico para desencadenar daño renal independientemente de la edad.

11 PERSPECTIVAS

En nuestro trabajo, el modelo de estrés crónico podría servir como una herramienta para inducir daño renal. Además sería interesante medir los niveles de angiotensina y aldosterona a nivel sistémico y local, para ver como este sistema interviene en la regulación de la actividad de la proteína de unión al elemento regulador del esterol-1 (SREBP-1) y la actividad enzimática, lo que lleva a la acumulación de triglicéridos y formación de estrés oxidativo deteriorando la función renal.

También, sería importante analizar cómo se modifican los componentes que constituyen la membrana basal como son el colágeno tipo III y IV, laminina, nefrina, así como el número de podocitos, debido a que están involucrados en el desarrollo de glomeruloesclerosis lo que altera el proceso de filtración glomerular.

Por otro lado, sería importante medir otros parámetros hormonales (insulina), para ver cómo el consumo de sacarosa mitiga el daño inducido por el estrés en el grupo combinado (estrés crónico y consumo de sacarosa).

12 REFERENCIAS

- Abraham NG, Brunner EJ, Eriksson JW, Robertson RP. 2007. Metabolic syndrome: psychosocial, neuroendocrine, and classical risk factors in type 2 diabetes. *Ann N Y Acad Sci.* 1113:256-75.
- Aguilera AA, Díaz GH, Barcelata ML, Guerrero OA, Ros RM. 2004. Effects of fish oil on hypertension, plasma lipids, and tumor necrosis factor-alpha in rats with sucrose-induced metabolic syndrome. *J Nutr Biochem.* 15 (6): 350-7.
- Aguilera G, Rabadan-Diehl C. 2000. Vasopressinergic regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: implications for stressadaptation. *Regul Pept.* 96(1-2):23-9.
- Amin KA, Kamel HH, Abd Eltawab MA. 2011. Protective effect of Garcinia against renal oxidative stress and biomarkers induced by high fat and sucrose diet. *Lipids Health Dis.* 10(6):1-13.
- Antonov YV, Alexandrovich YV, Redina OE, Gilinsky MA, Markel AL. 2016. Stress and hypertensive disease: adrenals as a link. Experimental study on hypertensive ISIAH rat strain. *Clin Exp Hypertens.* 38(5):415-23.
- Aoki T, Suzuki T, Hagiwara H, Kuwahara M, Sasaki S, Takata K, Matsuzaki T. 2012. Close association of aquaporin-2 internalization with caveolin-1. *Acta Histochem Cytochem.* 45(2):139-46.
- Bhattacharyya MR, Steptoe A. 2007. Emotional triggers of acute coronary syndromes: strength of evidence, biological processes, and clinical implications. *Prog Cardiovasc Dis.* 49(5):353-65.
- Bernardi S, Toffoli B, Zennaro C, Bossi F, Losurdo P, Michelli A, Carretta R, Mulatiero P, Fallo F, Veglio F, Fabris B. 2015. Aldosterone effects on glomerular structure and function. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 16(4):730-8.
- Benchimol de Souza D, Silva D, Marinho Costa Silva C, Barcellos Sampaio FJ, Silva Costa W, Martins Cortez C. 2011. Effects of immobilization stress on kidneys of Wistar male rats: morphometrical and stereological analysis. *Kidney Blood Press Res.* 34(6):424-9.

- Bensi N, Bertuzzi M, Armario A, Gauna HF. 1997. Chronic immobilization Stress reduces sodium intake and renal excretion in rats. *Physiol Behav.* 62(6):1391-6.
- Bleisch VR, Mayer I, Dickie MM. 1952. Familial diabetes mellitus in mice associated with insulin resistance, obesity and hyperplasia of the islands of Langerhans. *Am J Pathol.* 28: 369-85.
- Brown JR, McCullough PA, Splaine ME, Davies L, Ross CS, Dauerman HL, Robb JF, Boss R, Goldberg DJ, Fedele FA, Kellett MA, Phillips WJ, Ver Lee PN, Nelson EC, MacKenzie TA, O'Connor GT, Sarnak MJ, Malenka DJ; Northern New England Cardiovascular Disease Study Group. 2012. How do centres begin the process to prevent contrast-induced acute kidney injury: a report from a new regional collaborative. *BMJ Qual Saf.* 21(1):54-62.
- Bruder-Nascimento T, Campos DH, Alves C, Thomaz S, Cicogna AC, Cordellini S. 2013. Effects of chronic stress and high-fat diet on metabolic and nutritional parameters in Wistar rats. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 57(8):642-49.
- Bruder-Nascimento T, Campos DH, Cicogna AC, Cordellini S. 2015. Chronic stress improves NO- and Ca²⁺ flux-dependent vascular function: a pharmacological study. *Arq Bras Cardiol.* (3):226-33.
- Carroll TJ, Park JS, Hayashi S, Majumdar A, McMahon AP. 2005. Wnt9b plays a central role in the regulation of mesenchymal to epithelial transitions underlying organogenesis of the mammalian urogenital system. *Dev Cell.* 9(2):283-92.
- Caruana G, Cullen-McEwen L, Nelson AL, Kostoulas X, Woods K, Gardiner B, Davis MJ, Taylor DF, Teasdale RD, Grimmond SM, Little MH, Bertram JF. 2006. Spatial gene expression in the T-stage mouse metanephros. *Gene Expr Patterns.* 6(8):807-25.
- Cebrián C, Borodo K, Charles N, Herzlinger DA. 2004. Morphometric index of the developing murine kidney. *Dev Dyn.* 231(3):601-8.
- Costantini F, Kopan R. 2010. Patterning a complex organ: branching morphogenesis and nephron segmentation in kidney development. *Dev Cell.* 18(5):698-712.
- Coelho MS, Lopes KL, Freitas Rde A, de Oliveira-Sales EB, Bergamaschi CT, Campos RR, Casarini DE, Carmona AK, Araújo Mda S, Heimann JC, Dolnikoff MS. 2010. High

- sucrose intake in rats is associated with increased ACE2 and angiotensin-(1-7) levels in the adipose tissue. *Regul Pept.* 162(1-3):61-7.
- Chen G, Wang T, Uttarwar L, vanKrieken R, Li R, Chen X, Gao B, Ghayur A, Margetts P, Krepinsky JC. 2014. SREBP-1 is a novel mediator of TGF β 1 signaling in mesangial cells. *J Mol Cell Biol.* 6(6):516-30.
- Chen J, Muntner P, Hamm LL, Jones DW, Batuman V, Fonseca V, Whelton PK, He J. 2004. The metabolic syndrome and chronic kidney disease in U.S. adults. *Ann Intern Med.* 140(3):167-74.
- Chen SC, Hung CC, Kuo MC, Lee JJ, Chiu YW, Chang JM, Hwang SJ, Chen HC. 2013. Association of dyslipidemia with renal outcomes in chronic kidney disease. *PLoS One.* 8(2):e55643.
- Chi X, Hadjantonakis AK, Wu Z, Hyink D, Costantini F. 2009. A transgenic mouse that reveals cell shape and arrangement during ureteric bud branching. *Genesis.* 47(2):61-6.
- Choi BH, Kang KS, Kwak MK. 2014. Effect of redox modulating NRF2 activators on chronic kidney disease. *Molecules.* 19(8):12727-59.
- Corona Pérez A, Díaz Muñoz M, Soto Rodríguez I, Cuevas E, Matrínez Gómez M, Castelán F, Rodríguez Antolín J, Nicolás Toledo L. High Sucrose Intake Ameliorates the Accumulation of Hepatic Triacylglycerol Promoted by Restraint Stress in Young Rats. 2015. *Lipids.* 50:1103-13.
- Corona-Pérez A, Díaz-Muñoz M, Cuevas-Romero E, Luna-Moreno D, Valente-Godínez H, Vázquez-Martínez O, Martínez-Gómez M, Rodríguez-Antolín J, 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.
- Dai HY, Zheng M, Tang RN, Ma KL, Ni J, Liu BC. 2012. Inhibition of integrin-linked kinase by angiotensin II receptor antagonist, irbesartan attenuates podocyte injury in diabetic rats. *Chin Med J.* 125(5):888-93.
- Daehn I, Casalena G, Zhang T, Shi S, Fenninger F, Barasch N, Yu L, D'Agati V, Schlondorff D, Kriz W, Haraldsson B, Bottinger EP. 2014. Endothelial mitochondrial oxidative stress determines podocyte depletion in segmental glomerulosclerosis. *J Clin Invest.* 124(4):1608-21.

- Davies J, Lyon M, Gallagher J, Garrod D. 1995. Sulphated proteoglycan is required for collecting duct growth and branching but not nephron formation during kidney development. *Development*.121(5):1507-17.
- De Almeida AR, Monte-Alegre S, Zanini MB, Souza AL, Etchebehere M, Gontijo JA. 2014. Association between prehypertension, metabolic and inflammatory markers, decreased adiponectin and enhanced insulinemia in obese subjects. *Nutr Metab*. 2; 11: 25.
- Della Penna SL, Cao G, Kouyoumdzian NM, Sarati L, Fellet A, Balaszczuk AM, Choi MR, Zotta E, Gorzalczy S, Pandolfo M, Toblli JE, Rosón MI, Fernández BE. 2014. Role of angiotensin II and oxidative stress on renal aquaporins expression in hypernatremic rats. *J Physiol Biochem*. 70(2):465-78.
- Díaz-Aguila Y, Cuevas-Romero E, Castelán F, Martínez-Gómez M, Rodríguez-Antolín J, Nicolás-Toledo L. 2018. Chronic stress and high sucrose intake cause distinctive morphometric effects in the adrenal glands of post-weaned rats. *Biotech Histochem*. 23:1-10.
- Díaz-Aguila Y, Cuevas-Romero E, Castelán F, Martínez-Gómez M, Rodríguez-Antolín J, Nicolás-Toledo L. 2018. Chronic stress and high sucrose intake cause distinctive morphometric effects in the adrenal glands of post-weaned rats. *Biotech Histochem*. 93(8):565-574.
- Diniz DH, Schor N, Blay SL.2006. Stressful life events and painful recurrent colic of renal lithiasis. *J Urol*. 176(6 Pt 1):2483-7.
- Ducher M, Bertram D, Pozet N, Laville M, Fauvel JP. 2002. Stress-induced renal alterations in normotensives offspring of hypertensives and in hypertensives. *Am J Hypertens*. 1):346-50.
- Elliot SJ, Berho M, Korach K, Doublier S, Lupia E, Striker GE, Karl M. 2007. Gender-specific effects of endogenous testosterone: female alpha-estrogen receptor-deficient C57Bl/6J mice develop glomerulosclerosis. *Kidney Int*. 72:464-72.
- El Hafidi M, Cuellar A, Ramírez J, Baños G. 2001. Effect of sucrose addition to the drinking water that induces hypertension in the rats on liver microsomal $\Omega 9$ and $\Omega 5$ -desaturase activity. *J Nutr Biochem*. 12:65-71.
- El Hafidi M, Pérez I, Carrillo S, Cardoso G, Zamora J, Chavira R, Baños G. 2006. Effect of

sex hormones on non-esterified fatty acids, intra-abdominal fat accumulation, and hypertension induced by sucrose diet in male rats. *Clin Exp Hypertens*. 28(8):669-81.

Estrada Flores E. 2002. Atlas de histología de vertebrados. Editorial: Medica Panamericana. 1ra edición.

Felizardo RJ, da Silva MB, Aguiar CF, Câmara NO. 2014. Obesity in kidney disease: A heavyweight opponent. *World J Nephrol*. 3(3):50-63.

Flynn ER, Alexander BT, Lee J, Hutchens ZM Jr, Maric-Bilkan C. 2013. High-fat/fructose feeding during prenatal and postnatal development in female rats increases susceptibility to renal and metabolic injury later in life. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 304(4):R278-85.

García-García PM, Getino-Melián MA, Domínguez-Pimentel V, Navarro-González JF. 2014. Inflammation in diabetic kidney disease. *World J Diabetes*. 5(4):431-43.

Georgas K, Rumballe B, Valerius MT, Chiu HS, Thiagarajan RD, Lesieur E, Aronow BJ, Brunskill EW, Combes AN, Tang D, Taylor D, Grimmond SM, Potter SS, McMahon AP, Little MH. 2009. Analysis of early nephron patterning reveals a role for distal RV proliferation in fusion to the ureteric tip via a cap mesenchyme-derived connecting segment. *Dev Biol*. 332(2):273-86.

Goldstein DS, McEwen B. 2002. Allostasis, homeostats, and the nature of stress. *Stress*. 5(1):55-8.

Gupta MA, Gupta AK. Stressful major life events are associated with a higher frequency of cutaneous sensory symptoms: an empirical study of non-clinical subjects. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 18(5):560-5.

Hadtstein C, Schaefer F. 2008. Hypertension in children with chronic kidney disease: pathophysiology and management. *Pediatr Nephrol*. 23(3):363-71.

Hall JE, do Carmo JM, da Silva AA, Wang Z, Hall ME. 2015. Obesity-induced hypertension: interaction of neurohumoral and renal mechanisms. *Circ Res*. 116(6):991-1006.

Han KH, Kang YS, Han SY, Jee YH, Lee MH, Han JY, Kim HK, Kim YS, Cha DR. 2006. Spironolactone ameliorates renal injury and connective tissue growth factor expression in type II diabetic rats. *Kidney Int*. 70(1):111-20.

- Hartman HA, Lai HL, Patterson LT. 2007. Cessation of renal morphogenesis in mice. *Dev Biol.* 310(2):379-87.
- Hyink DP, Abrahamson DR. 1995. Origin of the glomerular vasculature in the developing kidney. *Semin Nephrol.* 15(4):300-14.
- Hook JB, Bowman HM, Ecker JL, Hewitt WR, Hirsch GH, Pegg DG. 1975. Influence of environmental stresses on functional maturation of renal organic anion transport. *Proc West Pharmacol Soc.* 18:344-7.
- Holtbäck U, Aperia AC. 2003. Molecular determinants of sodium and water balance during early human development. *Semin Neonatol.* 8(4):291-9.
- Holmes ME, Ekkekakis P, Eisenmann JC. 2010. The physical activity, stress and metabolic syndrome triangle: a guide to unfamiliar territory for the obesity researcher. *Obes Rev.* 11(7):492-507.
- Ingelfinger JR, Woods LL. 2002. Perinatal programming, renal development, and adult renal function. *Am J Hypertens.* 15:46S-49S.
- Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H. 2000. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes.* 49(11):1939-45.
- Jiang T, Wang XX, Scherzer P, Wilson P, Tallman J, Takahashi H, Li J, Iwahashi M, Sutherland E, Arend L, Levi M. 2007. Farnesoid X receptor modulates renal lipid metabolism, fibrosis, and diabetic nephropathy. *Diabetes.* 56(10):2485-93.
- Kahn BB, Flier SJ. 2000. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest.* 106: 473 -81.
- Kaissling B, Le Hir M. 2008. The renal cortical interstitium: morphological and functional aspects. *Histochem Cell Biol.* 130(2):247-62.
- Kashihara N, Watanabe Y, Makino H, Wallner EI, Kanwar YS. 1992. Selective decreased de novo synthesis of glomerular proteoglycans under the influence of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(14):6309-13.
- Kaung HC. 1994. Growth dynamics of pancreatic islet cell populations during fetal and neonatal development of the rat. *Dev Dyn.* 200:163-75.

- Kiyomoto H, Rafiq K, Mostofa M, Nishiyama A. 2008. Possible underlying mechanisms responsible for aldosterone and mineralocorticoid receptor-dependent renal injury. *J Pharmacol Sci.* 108(4):399-405.
- Kong X, Zhang DY, Wu HB, Li FX. 2011. Losartan and pioglitazone ameliorate nephropathy in experimental metabolic syndrome rats. *Biol Pharm Bull.* 34(5):693-9.
- Kong X, Zhang Y, Wu HB, Li FX, Zhang DY, Su Q. 2012. Combination Therapy With losartan and pioglitazone additively reduces renal oxidative and nitrative stress induced by chronic high fat, sucrose, and sodium intake. *Oxid Med Cell Longev.* 856085: 1-9.
- Kubota M, Watanabe R, Kabasawa H, Iino N, Saito A, Kumagai T, Fujimura S, Kadowaki M. 2013. Rice protein ameliorates the progression of diabetic nephropathy in Goto-Kakizaki rats with high-sucrose feeding. *Br J Nutr.* 110(7):1211-9.
- Kurella M, Lo JC, Chertow GM. 2005. Metabolic syndrome and the risk for chronic kidney disease among nondiabetic adults. *J Am Soc Nephrol.* 16(7):2134-40.
- Kuroda M, Sasamura H, Shimizu-Hirota R, Mifune M, Nakaya H, Kobayashi E, Hayashi M, Saruta T. 2002. Glucocorticoid regulation of proteoglycan synthesis in mesangial cells. *Kidney Int.* 62(3):780-9.
- Li L, Zhao Z, Xia J, Xin L, Chen Y, Yang S, Li K. 2015. A Long-Term High-Fat/High-Sucrose Diet Promotes Kidney Lipid Deposition and Causes Apoptosis and Glomerular Hypertrophy in Bama Minipigs. *PLoS One.* (11):e0142884.
- Lindström NO, Chang CH, Valerius MT, Hohenstein P, Davies JA. 2015. Node retraction during patterning of the urinary collecting duct system. *J Anat.* 226(1):13-21.
- Little MH, Brennan J, Georgas K, Davies JA, Davidson DR, Baldock RA, Beverdam A, Bertram JF, Capel B, Chiu HS, Clements D, Cullen-McEwen L, Fleming J, Gilbert T, Herzlinger D, Houghton D, Kaufman MH, Kleymenova E, Koopman PA, Lewis AG, McMahon AP, Mendelsohn CL, Mitchell EK, Rumballe BA, Sweeney DE, Valerius MT, Yamada G, Yang Y, Yu J. 2007. A high-resolution anatomical ontology of the developing murine genitourinary tract. *Gene Expr Patterns.* 7(6):680-99.
- Liao MT, Sung CC, Hung KC, Wu CC, Lo L, Lu KC. 2012. Insulin resistance in patients with chronic kidney disease. *J Biomed Biotechnol.* 2012:691369.

- Liu Y, Wang Z, Yin W, Li Q, Cai M, Zhang C, Xiao J, Hou H, Li H, Zu X. 2007. Severe insulin resistance and moderate glomerulosclerosis in a minipig model induced by high-fat/high-sucrose/ high-cholesterol diet. *Exp Anim.* 56(1):11-20.
- Lobato NS, Filgueira FP, Akamine EH, Tostes RC, Carvalho MH, Fortes ZB. 2012. Mechanisms of endothelial dysfunction in obesity-associated hypertension. *Braz J Med Biol Res.* 45(5):392-400.
- Long DA, Kolatsi-Joannou M, Price KL, Dessapt-Baradez C, Huang JL, Papakrivopoulou E, Hubank M, Korstanje R, Gnudi L, Woolf AS. 2013. Albuminuria is associated with too few glomeruli and too much testosterone. *Kidney Int.* 2013 Jun;83(6):1118-29.
- Lucas A. 1998. Programming by early nutrition. An experimental approach. *J Nutr* 128:401S–406S.
- Macedo IC, Medeiros LF, Oliveira C, Oliveira CM, Rozisky JR, Scarabelot VL, Souza A, Silva FR, Santos VS, Cioato SG, Caumo W, Torres IL. 2012. Cafeteria diet-induced obesity plus chronic stress alter serum leptin levels. *Peptides.* 38(1):189-96.
- Majumdar A, Vainio S, Kispert A, McMahon J, McMahon AP. 2003. Wnt11 and Ret/Gdnf pathways cooperate in regulating ureteric branching during metanephric kidney development. *Development.* 130(14):3175-85.
- Mataix VJ. 2009. *Nutrición y alimentación humana*. Editorial: Ergón. 2da edición.
- Melamed S, Shirom A, Toker S, Berliner S, Shapira I. 2006. Burnout and risk of cardiovascular disease: evidence, possible causal paths, and promising research directions. *Psychol Bull.* 132(3):327-53.
- Méndez-Durán A, Méndez-Bueno J.F, Tapia-Yáñez T, Muñoz Montes A, Aguilar-Sánchez L. 2010. Epidemiología de la insuficiencia renal crónica en México. *Dial Traspl.* 31(1):7-11.
- Meyer TN, Schwesinger C, Bush KT, Stuart RO, Rose DW, Shah MM, Vaughn DA, Steer DL, Nigam SK. 2004. Spatiotemporal regulation of morphogenetic molecules during in vitro branching of the isolated ureteric bud: toward a model of branching through budding in the developing kidney. *Dev Biol.* 275(1):44-67.
- Meyer JS. 1985. Biochemical effects of corticosteroids on neural tissues. *Physiol Rev.* 65(4):946-1020.

- Morris DJ. 1981. The metabolism and mechanism of action of aldosterone. *Endocr Rev.* 2(2):234-47.
- Moritz KM, Dodic M, Wintour EM. 2003. Kidney development and the fetal programming of adult disease. *Bioessays.* 25(3):212-20.
- Mohammed H, Munavvar A, Sattar, Abdullah NA, Khan. 2010. The contribution of $\alpha 1B$ -adrenoceptor subtype in the renal vasculature of fructose-fed Sprague–Dawley rats. *Eur J Nutr.* 50:251–60.
- Najem GR, Seebode JJ, Samady AJ, Feuerman M, Friedman L. 1997. Stressful life events and risk of symptomatic kidney stones. *Int J Epidemiol.* 26(5):1017-23.
- Nigam SK, Shah MM. 2009. How does the ureteric bud branch? *J Am Soc Nephrol.*20(7): 1465-9.
- Norris K, Nissenson AR. 2008. Race, gender, and socioeconomic disparities in CKD in the United States. *J Am Soc Nephrol.*19(7):1261-70.
- Obara-Ishihara T, Kuhlman J, Niswander L, Herzlinger D.1999. The surface ectoderm is essential for nephric duct formation in intermediate mesoderm. *Development.* 126(6):1103-8.
- Odermatt A. 2011. The Western-style diet: a major risk factor for impaired Kidney function and chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol.* 301(5):F919-31.
- Okada H, Kikuta T, Inoue T, Kanno Y, Ban S, Sugaya T, Takigawa M, Suzuki H. 2006. Dexamethasone induces connective tissue growth factor expression in renal tubular epithelial cells in a mouse strain-specific manner. *Am J Pathol.*168(3):737-47.
- Papinska AM, Rodgers KE. 2018. Long-Term Administration of Angiotensin (1-7) to *db/db* Mice Reduces Oxidative Stress Damage in the Kidneys and Prevents Renal Dysfunction. *Oxid Med Cell Longev.* 1841046.
- Patni H, Mathew JT, Luan L, Franki N, Chander PN, Singhal PC. 2007. Aldosterone promotes proximal tubular cell apoptosis: role of oxidative stress. *Am J Physiol Renal Physiol.* 293(4):F1065-71.
- Pérez-Torres I, Roque P, El Hafidi M, Diaz-Diaz E, Baños G. 2009. Association of renal damage and oxidative stress in a rat model of metabolic syndrome. Influence of gender. *Free Radic Res.* 43(8):761-71.

- Pointer MA, Daumerie G, Bridges L, Yancey S, Howard K, Davis W, Huang P, Loscalzo J. 2012. Physiological stress increases renal injury in eNOS-knockout mice. *Hypertens Res.* 35(3):318-24.
- Rahmoune H, Thompson PW, Ward JM, Smith CD, Hong G y Brown J. 2005. Glucose transporters in human renal proximal tubular cells isolated from the urine of patients with non- insulin- dependent diabetes. *Diabetes.* 54:3427- 34.
- Ratliff BB, Abdulmahdi W, Pawar R, Wolin MS. 2016. Oxidant Mechanisms in Renal Injury and Disease. *Antioxid Redox Signal.* 25(3):119-46.
- Reidy KJ, Rosenblum ND. 2009. Cell and molecular biology of kidney development. *Semin Nephrol.* 29(4):321-37.
- Reul JM, Sutanto W, van Eekelen JA, Rothuizen J, de Kloet ER.1990. Central action of adrenal steroids during stress and adaptation. *Adv Exp Med Biol.* 274:243-56.
- Remuzzi G, Cattaneo D, Perico N. 2008. The aggravating mechanisms of aldosterone on kidney fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 19(8):1459-62.
- Rhodin MM, Anderson BJ, Peters AM, Coulthard MG, Wilkins B, Cole M, Chatelut E, Grubb A, Veal GJ, Keir MJ, Holford NH. 2009. Human renal function maturation: a quantitative description using weight and postmenstrual age. *Pediatr Nephrol.* 24(1):67-76.
- Rojas J, Bermúdez V, Leal E, Aparicio D, Peña G, Acosta L, Finol F, Urdaneta A, Colmenares C, Almarza J, Linares S, Carrillo M, Bustamante M. 2008. Orígenes étnicos y enfermedades cardiovasculares. *Redalyc.* 1:2-23.
- Romagnani P, Lasagni L, Remuzzi G. 2013. Renal progenitors: An evolutionary conserved strategy for kidney regeneration. *Nat Rev Nephrol.* 9(3):137-46.
- Roncal-Jimenez CA, Lanaspá MA, Rivard CJ, Nakagawa T, Sanchez-Lozada LG, Jalal D, Andres-Hernando A, Tanabe K, Madero M, Li N, Cicerchi C, Mc Fann K, Sautin YY, Johnson RJ. 2011. sucrose induces fatty liver and pancreatic inflammation in male breeder rats independent of excess energy intake. *Metabolism.* 60(9):1259-70.
- Ross HM y Pawlina W. 2007. *Histología: Texto y atlas color con Biología celular y molecular.*
- Editorial: Médica Panamericana. 5ta edición.

- Rosenmann E, Teitelbaum A, Cohen AM. 1971. Nephropathy in sucrose-fed rats. Electron and light microscopic studies. *Diabetes*.12:803-10.
- Saburi S, Hester I, Fischer E, Pontoglio M, Eremina V, Gessler M, Quaggin SE, Harrison R, Mount R, McNeill H. 2008. Loss of Fat4 disrupts PCP signaling and oriented cell division and leads to cystic kidney disease. *Nat Genet*. 40(8):1010-5.
- Saxén L, Sariola H.1987. Early organogenesis of the kidney. *Pediatr Nephrol*. 1(3):385-92.
- Schmidt-Ott KM, Yang J, Chen X, Wang H, Paragas N, Mori K, Li JY, Lu B, Constantini F, Schiffer M, Bottinger E, Barasch J.2005. Novel regulators of kidney development from the tips of the ureteric bud. *J Am Soc Nephrol*.16(7):1993-2002.
- Sieber J, Weins A, Kampe K, Gruber S, Lindenmeyer MT, Cohen CD, Orellana JM, Mundel P, Jehle AW. 2013. Susceptibility of podocytes to palmitic acid is regulated by stearoyl-CoA desaturases 1 and 2. *Am J Pathol*. 83(3):735-44.
- Short KM, Hodson MJ, Smyth IM. 2010. Tomographic quantification of branching morphogenesis and renal development. *Kidney Int*. 77(12):1132-9.
- Smeeton J, Zhang X, Bulus N, Mernaugh G, Lange A, Karner CM, Carroll TJ, Fässler R, Pozzi A, Rosenblum ND, Zent R..2010. Integrin-linked kinase regulates p38 MAPK-dependent cell cycle arrest in ureteric bud development. *Development*. 137(19):3233-43.
- Spieker LE, Hürlimann D, Ruschitzka F, Corti R, Enseleit F, Shaw S, Hayoz D, Deanfield JE, Lüscher TF, Noll G. 2002. Mental stress induces prolonged endothelial dysfunction via endothelin-A receptors. *Circulation*. 105(24):2817-20.
- Tamashiro KL, Moran TH. 2010. Perinatal environment and its influences on metabolic programming of offspring. *Physiol Behav*.100(5):560-6.
- Tobar A, Ori Y, Benchetrit S, Milo G, Herman-Edelstein M, Zingerman B, Lev N, Gafter U, Chagnac A. 2013. Proximal tubular hypertrophy and enlarged glomerular and proximal tubular urinary space in obese subjects with proteinuria. *PLoS One*. 8(9):e75547.
- Toker S, Shirom A, Shapira I, Berliner S, Melamed S. 2005. The association between burnout, depression, anxiety, and inflammation biomarkers: C-reactive protein and fibrinogen in men and women. *J Occup Health Psychol*. 10(4):344-62.
- Tortora G y Reynolds G. 2000. *Principios de Anatomía y Fisiología*. Editorial: Médica Panamericana. 9na edición.

- Torres M, Gómez-Pardo E, Dressler GR, Gruss P.1995. Pax-2 controls multiple steps of urogenital development. *Development*. 121(12):4057-65.
- Uarquin DG, Meyer JS, Cardenas FP, Rojas MJ. 2016 Effect of Overcrowding on hair Corticosterone Concentrations in Juvenile Male Wistar Rats. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 5(6):749-755.
- Vaziri ND, Rodríguez-Iturbe B. 2006. Mechanisms of disease: oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of hypertension. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2(10):582-93.
- Verzola D, Gandolfo MT, Salvatore F, Villaggio B, Gianiorio F, Traverso P, Deferrari G, Garibotto G. 2004. Testosterone promotes apoptotic damage in human renal tubular cells. *Kidney Int*. 65:1252-61.
- Warady BA, Chadha V.2007. Chronic kidney disease in children: the global perspective. *Pediatr Nephrol*. 22(12):1999-2009.
- Williams SF, Nicholas SB, Vaziri ND, Norris KC. 2014. African Americans, hypertension and the renin angiotensin system. *World J Cardiol*. 6(9):878-89.
- Wühl E, Schaefer F. 2008. Therapeutic strategies to slow chronic kidney disease progression. *Pediatr Nephrol*. (5):705-16
- Yadav SP, Shah GS, Mishra OP, Baral N. 2016. Pattern of renal diseases in children: A developing country experience. *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 27(2):371-6.
- Yasui K, Sumida Y, Mori Y, Mitsuyoshi H, Minami M, Itoh Y, Kanemasa K, Matsubara H, Okanoue T, Yoshikawa T. 2011. Nonalcoholic steatohepatitis and increased risk of chronic kidney disease. *Metabolism*. 60(5):735-9.
- Yu J, Carroll TJ, Rajagopal J, Kobayashi A, Ren Q, McMahon AP. 2009. A Wnt7b-dependent pathway regulates the orientation of epithelial cell division and establishes the cortico-medullary axis of the mammalian kidney. *Development*. 136(1):161-71.
- Zhu C, Huang S, Yuan Y, Ding G, Chen R, Liu B, Yang T, Zhang A. 2011. Mitochondrial dysfunction mediates aldosterone-induced podocyte damage: a therapeutic target of PPAR γ . *Am J Pathol*. 178(5):2020-31.

13 GLOSARIO

1.- Posición supina: la persona tendida y descansando sobre nalgas, espalda, cabeza y hombros.

2.-Bouin Dubois: es un fijador popular para estudios de histología, debido a su excelente estado de conservación de los núcleos y cromosomas.

14 ANEXOS

Deshidratación del riñón

- a) Después de la disección, el riñón derecho se secciona a la mitad para obtener dos partes iguales.
- b) Mantener ambas porciones de riñón en Bouin durante 24 horas.
- c) Sacar el tejido del Bouin y realizar la deshidratación de acuerdo a la siguiente lista, cuidando que la solución cubra el tejido, manteniéndolo en agitación.

N. de solución	Solución y concentración	Tiempo en minutos
1	OH 60%	15 minutos
2	OH 70%	20 minutos
3	OH 80%	50 minutos
4	OH 96%	50 minutos
5	OH 100%	50 minutos
6	OH 100% -Xileno	30 minutos
7	Xileno I	30 minutos
8	Xileno II	30 minutos
9	Paraplast Plus I	1 hora
10	Paraplast Plus II	2 horas
11	Paraplast Plus II	2 horas

- d) Incluir todos los tejidos con Paraplast Plus limpio y dejar que solidifiquen.

Nota: Previamente poner a licuar el Paraplast Plus en el horno a una temperatura máxima de 56°C.

Tinción de ácido peryodico de Shiff (PAS)

Después de obtener los cortes histológicos en el micrótopo se dejan secar mínimo 15 días, posteriormente se tiñen con los siguientes tiempos en las diferentes soluciones.

Paso	No.	Solución	Tiempo
Desparafinar	1	Xileno I	5 minutos
	2	Xileno II	5 minutos
	3	Xileno: Etanol	5 minutos
Hidratación	4	Etanol 100%	5 minutos
	5	Etanol 100%	5 minutos
	6	Etanol 96%	3 minutos
	7	Etanol 80%	3 minutos
	8	Etanol 60%	3 minutos
	9	Agua destilada	3 minutos
	10	Hematoxilina de Harris	35 minutos
	11	Agua corriente	40 segundos
	12	Ácido peryodico	5 minutos
	13	Colorante de Shiff	15 minutos
Contra-tinción	14	Hematoxilina de Harris	2 minutos
Deshidratación	15	Etanol 96%	30 segundos
	16	Etanol 100%	30 segundos
	17	Etanol: Xileno	20 segundos
	18	Xileno I	20 segundos
Montaje	19	Entellan	

- Revisar la laminilla al salir del colorante de Shiff y hematoxilina, para ver si se tiñó.
- En el caso de que a la hora de montar con el Entellan queden burbujas regresar el portaobjetos al Xileno para volver a montar.

26. El estrés crónico y el consumo de sacarosa a temprana edad afecta el tamaño de los glomérulos

Sánchez-Solís CN¹, Cuevas Romero E³, Martínez-Gómez M^{2,3}, Rodríguez-Antolín J³, Nicolás Toledo L³

1Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, 2Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM, 3Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala.

netsol_4@hotmail.com

Introducción. Estudios en humanos han mostrado que dietas hipercalóricas y el estrés promueve el desarrollo de obesidad y trastornos metabólicos afectando la estructura y función renal. En la rata adulta se ha mostrado que el consumo de dietas altas en carbohidratos causa hipertrofia glomerular, estrés oxidativo y aumenta los niveles de creatinina. Por otro lado, el estrés induce una disminución en el número de nefronas, alteraciones en el tamaño de los glomérulos e inflamación. Sin embargo, no hay estudios que analicen el efecto del estrés y consumo elevado de sacarosa sobre el riñón a edad temprana.

Objetivo. Evaluar el efecto del estrés crónico y el consumo de elevado de sacarosa sobre la organización histológica y función renal a temprana edad en la rata macho. **Métodos.** Se utilizaron 32 ratas machos Wistar de 21 días de edad, fueron divididos en 4 grupos experimentales (8/grupo): Control (C), Estrés (E), Sacarosa al 30% diluida en agua (A30), y Estrés más agua azucarada al 30% (E+A30). Los animales fueron estresados por restricción de movimiento durante 4 semanas. Al sacrificio se extrajeron los riñones y fueron pesados. El riñón derecho fue fijado en Bouin y deshidratado con alcoholes de forma ascendente, aclarado en xilol e incluido en paraplast. Se realizaron cortes longitudinales de 5µm y fueron teñidos con PAS. Las concentraciones de creatinina y urea se midieron con el método enzimático-colorimétrico- Jaffe cinético. Los datos se analizaron aplicando una ANOVA de dos vías, Newman-Keuls y Prueba de Fisher ($p < 0.05$).

Resultados. El estrés crónico promueve un mayor porcentaje de glomérulos chicos comparado con el grupo C. Resultados similares fueron encontrados en el grupo A30. Mientras que los dos estímulos inducen un mayor aumento de glomérulos chicos en el grupo E+A30 comparado con el grupo E y A30. Adicionalmente una disminución de creatinina fue encontrada en el grupo E.

Conclusión. El estrés crónico y el consumo elevado de sacarosa a una edad temprana, afecta el tamaño de los glomérulos, posiblemente retrasando el desarrollo del riñón. Sin verse comprometida la función renal.

Financiamiento: CONACYT a SSCN (487305).

Efecto del estrés crónico sobre el arreglo histológico renal en la rata macho infante con dieta alta en sacarosa

Sánchez-Solis Cristhian Neftaly¹, Cuevas Romero Estela⁴, Cervantes Rodríguez Margarita³, Martínez-Gómez Margarita^{2,4}, Rodríguez-Antolín Jorge⁴, Nicolás Toledo Leticia⁴
1Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, 2Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM, 3Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Tlaxcala, 4Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala.

El daño renal ha sido asociado con alteraciones metabólicas inducidas por el consumo de dietas hipercalóricas y la exposición a estrés. En la rata adulta se ha mostrado que el consumo de dietas altas en carbohidratos provoca hipertrofia glomerular, estrés oxidativo y un aumento en los niveles de creatinina. Por otro lado, el estrés induce una disminución en el número de nefronas e inflamación. Sin embargo, hemos mostrado que la dieta alta en sacarosa revierte el efecto de la corticosterona inducido por el estrés crónico en el hígado. No se sabe si el consumo de elevado de sacarosa revierte el efecto inducido por estrés y si las modificaciones en el arreglo histológico renal se pueden inducir desde temprana edad. Al sacrificio se extrajeron los riñones y fueron pesados. El riñón derecho fue fijado en Bouin y deshidratado con alcoholes de forma ascendente, aclarado en xilol e incluido en paraplast. Se realizaron cortes longitudinales de 5µm y fueron teñidos con PAS. Las concentraciones de creatinina y urea se midieron con el método enzimático-colorimétrico- Jaffe cinético. Los datos se analizaron aplicando una ANOVA de dos vías, Newman-Keuls y Prueba de Fisher ($p < 0.05$). El estrés crónico promueve un mayor porcentaje de glomérulos chicos comparado con el grupo C. Resultados similares fueron encontrados en el grupo A30. Mientras que los dos estímulos inducen un mayor aumento de glomérulos chicos en el grupo E+A30 comparado con el grupo E y A30. Adicionalmente una disminución de creatinina fue encontrada en el grupo E. Los resultados sugieren que ambos estímulos pueden afectar el desarrollo de las nefronas desde una temprana edad. Financiamiento: CONACYT a SSCN (487305).



Contents lists available at ScienceDirect

Biomedicine & Pharmacotherapy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bioph

Morphometric changes and AQP2 expression in kidneys of young male rats exposed to chronic stress and a high-sucrose diet

Cristhian Neftaly Sánchez-Solís^a, Estela Cuevas-Romero^b, Alvaro Muñoz^c,
Margarita Cervantes-Rodríguez^d, Jorge Rodríguez-Antolín^b, Leticia Nicolás-Toledo^{b,*}

^a Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, Mexico

^b Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, Mexico

^c Centro Universitario del Norte, Universidad de Guadalajara, Jalisco, Mexico

^d Facultad de Nutrición, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, Mexico



ARTICLE INFO

Keywords:

Creatinine
Mesangial cell
Mesangial matrix
Puberty rats
Restriction stress
High sucrose diet

ABSTRACT

Objective: Consumption of a cafeteria-like diet and chronic stress have a negative impact on kidney function and morphology in adult rats. However, the interaction between chronic restraint stress and high-sucrose diet on renal morphology in young rats is unknown. A high-sucrose diet does not modify serum glucose levels but reduces serum corticosterone levels in stressed young rats, in this way it is confusing a possible potentiate or protector effect of this diet on kidney damage induced by stress.

Methods: Wistar male rats at 4 weeks of age were randomly assigned into 4 groups: control (C), stressed (St), high-sucrose diet (S30), and chronic restraint stress plus a 30% sucrose diet (St + S30). Rats were fed with a standard chow and tap water (C group) or 30% sucrose diluted in water (S30 group). Chronic restraint stress consisted of 1-h daily placement into a plastic cylinder, 5 days per week, and for 4 weeks.

Results: Stressed rats exhibited a low number of corpuscles, glomeruli, high number of mesangial cells, major deposition of mesangial matrix and aquaporin-2 protein (AQP-2) expression, and low creatinine levels. Meanwhile, high-sucrose diet ameliorated AQP-2 expression and avoided the reduction of creatinine levels induced by chronic stress. The combination of stress and high-sucrose diet maintained similar effects on the kidney as stress alone, although it induced a greater reduction in the area of proximal tubules.

Conclusions: Our results show that both chronic stress and a high-sucrose diet induce histological changes, but chronic stress may generate an accelerated glomerular hypertrophy associated with functional changes before puberty.

1. Introduction

Consumption of soft drinks contribute to obesity-related chronic kidney disease (CKD) in humans [1,2] and rats [3,4]. Particularly, the consumption of a cafeteria diet induces inflammation and advanced glycation end products in the kidneys of adult rats [5] which induce glomerulosclerosis in adult mice [6], as well as glomerular hypertrophy associated with an excessive mesangial matrix [7,8], proximal tubular hypertrophy [9,10], and glomerular hyperfiltration [11]. Additionally, hyperglycemia induced by streptozotocin affects the aquaporin-2 protein (AQP-2) expression in the collecting duct principal cells of rats [12]. However, it is unknown whether a high-sucrose diet in young rats could increase enough to affect renal function, considering that it does not modify serum glucose levels [13].

Stress is considered an important cause for the development of metabolic syndrome [14], which also induces morphometric [15], and functional renal alterations [16]. In this regard, glucocorticoids increase AQP-2 protein expression and glomerular filtration rate in adult [17] and infant [18] rats, decrease proteoglycans synthesis in mesangial cells [19], and regulate renal transport [20,21], which have been associated with hypertension [22].

The physiological renal effects of combining a rich-sucrose diet and stress on the kidneys is unknown, and may be confuse because a high-sucrose diet reduces corticosterone levels in serum and the activity of the hepatic 11-beta hydroxysteroid dehydrogenase, which coincides with a reduced response to chronic restraint stress [13].

For these reasons, we investigated the histological changes at glomeruli level, expression of AQP-2, and serum creatinine levels in young

* Corresponding author at: Leticia Nicolás Toledo, Ph. D., Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, 90000-Tlaxcala, México. fax: (52) 246 46 215 57.

E-mail address: leticia.nicolast@uatx.mx (L. Nicolás-Toledo).

<https://doi.org/10.1016/j.bioph.2018.06.086>

Received 10 April 2018; Received in revised form 13 June 2018; Accepted 14 June 2018
0753-3322/ © 2018 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.