



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE MEDICINA  
BIOMEDICINA

**EVALUACIÓN DE LA UTILIZACIÓN DE RESVERATROL COMO MODULADOR DE  
LA LIPOGÉNESIS RENAL Y LA RESPUESTA AL ESTRÉS DEL RETÍCULO  
ENDOPLÁSMICO CON RATONES C57BL/6**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:  
**FIGUEROA JUÁREZ ELIZABETH IRINA**

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. CLAUDIA TERESA TOVAR PALACIO  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM  
COMITÉ TUTOR: DRA. ANDREA SACHI DÍAZ VILLASEÑOR  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM  
DR. SAMUEL CANIZALES QUINTEROS  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

MÉXICO, CD. MX., NOVIEMBRE, 2017.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



Lic. Ivonne Ramirez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 12 de junio de 2017, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **FIGUEROA JUÁREZ ELIZABETH IRINA** con número de cuenta **307523480**, con la tesis titulada **"EVALUACIÓN DE LA UTILIZACIÓN DE RESVERATROL COMO MODULADOR DE LA LIPOGÉNESIS RENAL Y LA RESPUESTA AL ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO CON RATONES C57BL/6"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. CLAUDIA TERESA TOVAR PALACIO**:

Presidente: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI  
Vocal: DR. ÁNGEL ALFONSO ZARAIN HERZBERG  
Secretario: DRA. ANDREA SACHI DÍAZ VILLASEÑOR  
Suplente: DR. DANIEL DAGOBERTO ORTEGA CUELLAR  
Suplente: DR. SAMUEL CANIZALES QUINTEROS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 16 de octubre de 2017

  
**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**  
**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por el honor de haber formado parte de su comunidad estudiantil, por forjarme como maestra en ciencias, por haberme permitido hacer uso de sus instalaciones y por todas las oportunidades que me brindó a lo largo de mi posgrado en todos los aspectos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por haberme concedido la beca del Programa Nacional de Posgrados de Calidad a lo largo de toda mi maestría.

A mi tutora, la Dra. Claudia Teresa Tovar Palacio, por su paciencia, tiempo, apoyo, consejo, amistad y confianza. Gracias por haber creído en mí desde el inicio y por haberme enseñado tanto en todos los aspectos. Gracias por haber sido mi guía a lo largo de todo este proyecto, tanto en la licenciatura como en el posgrado.

A los miembros de mi comité tutor, la Dra. Andrea Díaz Villaseñor y el Dr. Samuel Canizales Quinteros, por haber supervisado este proyecto investigación desde el inicio del mismo. Gracias por todas sus facilidades, por sus aportaciones en este trabajo y por su apoyo en todo momento.

## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL**

A León David Islas Weinstein. A ti, que me conoces mejor que nadie y que me has hecho plenamente feliz desde el día que te conocí. A ti, que conoces todas mis cualidades y también mis defectos, y aún así te has quedado. A ti, con quien he compartido mi corazón y mi mente, y ahora mi vida entera. Gracias por acompañarme estos 2 años de mi vida, por animarme y motivarme durante toda la maestría, y por tu apoyo incondicional en los altibajos de este proyecto. Eres el amor de mi vida León, te amo y te dedico este trabajo porque desde que estamos junto has sido mi mayor motivación para superarme y ser mejor.

En memoria de mi abuelo y mejor amigo, Anibal Figueroa, Totó. A él, que aunque el día de hoy ya no comparte el mismo mundo que nosotros, fue mi guía, mi motivación y mi inspiración durante toda la vida. Mi abuelo Aníbal creyó en mí y en mis sueños hasta el último día de su vida. Siempre me escuchó, me animó y me apoyó a salir adelante todos los días. Por él elegí hacer este posgrado, con él celebré el día que me aceptaron y en su honor, el día de hoy lo he terminado.

A mis padres, Irina Juárez Muñoz y Germán Figueroa Castrejón. A ustedes, por quienes he llegado a ser quien soy el día de hoy. He sido la persona más afortunada de este mundo al tenerlos como padres y como ejemplo, gracias por haber estado a mi lado a cada momento de mi vida y por haberme apoyado sin importar absolutamente nada. Gracias por brindarme tanto amor, comprensión, cariño y apoyo incondicional todos los días de mi vida, jamás terminaré de agradecerles por tanto. Los amo con toda mi alma, gracias por haber dedicado su vida entera para guiarme y para apoyarme.

A mi hermano, Andrés Figueroa Juárez. A ti, que has sido mi amigo, mi compañero de infancia, mi cómplice y una absoluta bendición en mi vida. Te amo, gracias por ser un ángel para mí, por cuidarme, por defenderme sin importar nada, por apoyarme y por no dejarme sola nunca. En ti confiaría mi vida entera, tu has sido siempre mi luz en la oscuridad.

A mi segunda familia, Sandra Weinstein, Robert Pariente, José Luis Islas, Tania Islas y Jan Duckiewitz. A ustedes que me han hecho sentir parte de su familia y me abrieron las puertas de su casa desde el primer día. Gracias por considerarme siempre, por preocuparse por mi y por apoyarme siempre en las buenas y en las malas; y sobretodo, gracias por todo el cariño que me han demostrado todos los días de mil maneras distintas. Los quiero muchísimo, y agradezco tenerlos en mi vida.

A mis tíos, Rosa María de la Vega, Arturo Huertas, Didier Juárez, Silvia Baca, Fabiola Juárez, Aníbal Figueroa, Guadalupe Gutierrez, Guadalupe Figueroa y Francisco Figueroa. Gracias por verme crecer, por apoyarme, y por estar ahí siempre, los quiero muchísimo y los llevo presentes en mi vida todos los días.

A mis primos, Mellany Huertas, Santiago Huertas, Lluvia Marañón, Grecia Marañón, Brenda Juárez, Didier Juárez, Natalia Figueroa y Estefanía Figueroa. A ustedes que han crecido a mi lado, siempre apoyandome y escuchándome hasta la madrugada cuando tenía algo que decir. Los amo, todos son como hermanos para mí, y su compañía ha sido invaluable toda mi vida.

A mi abuela María Rosa Muñoz. A ti, por ser un ejemplo de perseverancia y valentía, por haberme mostrado desde que era niña que con amor y trabajo no hay nada inalcanzable. Gracias por haberme impulsado siempre a seguir mis sueños y alcanzar mis metas.

A mi mejor amiga, Mariana Cisneros. A ti, por haber sido mi hermana más que mi amiga todo este tiempo. Gracias por haber estado conmigo los mejores y los peores momentos de mi vida desde hace más de 11 años, nunca podría terminar de agradecerte todo lo que has hecho por mí. Dicen que "los amigos son la familia que tu escoges", y ¡vaya que a ti te escogí bien!, porque en más de una ocasión me has demostrado que tu y yo vamos a estar junta toda la vida.

A mis mejores amigos, Carlos Medrano, Natalia García, Jesús Hurtado, Ricardo Murguía y Juan Herrera. A ustedes, con quienes he compartido más de la mitad de mi vida. Gracias por todas esas creas esos momentos increíbles con esas risas que duraron horas y que hicieron que nos doliera el estómago, y gracias también por darme esos brazos que necesité cuando las lágrimas parecían interminables. Gracias por ser personas tan extraordinarias y por ser amigos tan incondicionales. Ustedes me han mostrado siempre que no es necesario ver diario a una persona para que sea increíblemente cercana.

A mis amigas de la carrera, Libier Cabrera, Ilse Hernández e Itzel Rodríguez. A ustedes, por haber compartido conmigo 5 años de desvelos e historias increíbles, y por seguir compartiendo conmigo los mejores momentos y las mejores historias de laboratorio después de varios años.

A mi amiga invaluable durante el posgrado y el INNSZ, Adriana Reyes. A ti, por haberme regalado incontables momentos de felicidad, por darme tu apoyo incondicional cuando más lo necesité y por escucharme en todo momento. Siempre fuiste mucho más que una compañera de trabajo, tu te convertiste en alguien extraordinariamente importante en mi vida. Gracias por haber hecho de la maestría una de las mejores etapas de mi vida.

A mis amigos de patología experimental en el INNSZ, Vasti Lozano, Sujhey Hernández, Octavio Ramos, Danira Toral, Manuel López, Mario Zetter, Jacqueline Barrios, Lucía Zatarain, Yadira Rodríguez, Berenice Villareal y Jaqueline Lara. A ustedes, por siempre considerarme y por haberse convertido también en mis amigos. Gracias por todos los momentos invaluable que hemos compartido hasta ahora y por los que todavía nos faltan.

Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, por haberme dado la oportunidad de formar parte de ésta institución durante los últimos 5 años en la realización de diferentes estancias de investigación, el servicio social, la tesis de licenciatura y éste trabajo de tesis.

A los doctores Armando Tovar, Nimbe Torres, Victoria Ramírez, Consuelo Plata, Iván Torre, Lilia Noriega, Ricardo Correa y Rogelio Hernández. A ustedes, por su apoyo durante todo este proyecto. Por facilitar mi trabajo, por dejarme formar parte de sus equipos de trabajo y apoyarme siempre que los necesité.

Y finalmente, a los doctores José Pedraza, Ángel Zarain y Daniel Ortega. A ustedes, por aceptar formar parte de mi jurado evaluador; por la paciencia, compromiso y entrega para leer este proyecto; por sus valiosas aportaciones; y por facilitarme lo más posible los trámites para mi obtención de grado.

**“Let food be your medicine and medicine be your food”  
- Hippocrates**

### **DEDICATORIA**

A León David Islas Weinstein, el amor de mi vida y mi mejor amigo, por ser mi mayor motivación, apoyo e impulso todos los días. A ti, en particular, te dedico este trabajo por ser la persona más importante para mí y con quien quiero compartir toda mi vida.

En memoria de mi abuelo, Aníbal Figueroa Uriza, quien me motivó a realizar este posgrado y a quien le prometí la culminación del mismo con el máximo empeño desde el primer día. Mi abuelo fue una de las personas que más ha marcado mi vida y fue mi guía como profesionista y ser humano, y por ello, cada uno de mis éxitos lleva su nombre implicado en el mío.

A mis padres, Irina Elizabeth Juárez Muñoz y Germán Figueroa Castrejón, por su amor, trabajo y sacrificios durante toda mi vida. Gracias por su ejemplo para enseñarme a enfrentar la vida y a superarme día a día. Gracias a ustedes aprendí a que el trabajo, la perseverancia, la honestidad y la humildad son la clave para lograr cualquier cosa que te propongas en la vida.

<b><u>ÍNDICE</u></b>	<b>Página</b>
Índice de Figuras	i
Índice de Tablas	iv
Resumen de abreviaturas	v
Abreviaturas correspondientes a los grupos experimentales	vi
1. Resumen	1
2. Abstract	4
3. Introducción	6
4. Hipótesis	8
5. Objetivos	8
5.1 Objetivo general	
5.2 Objetivos específicos	
6. Antecedentes	10
6.1 Obesidad: Definición, importancia y prevalencia	
6.2 La enfermedad renal asociada a obesidad	
6.2.1 Fisiología renal: Generalidades	
6.2.2 La enfermedad renal asociada a obesidad	
6.2.3 Lipotoxicidad renal en la enfermedad renal asociada a obesidad	
6.2.3.1 Lipotoxicidad renal asociada a la hipótesis de expansibilidad y flexibilidad del tejido adiposo	
6.2.3.2 Lipotoxicidad asociada a lipogénesis <i>de novo</i> en riñón	
6.3 Estrés del retículo endoplásmico como mecanismo de la lipogénesis renal	
6.3.1 Función celular del retículo endoplásmico	
6.3.2 Definición del estrés del retículo endoplásmico	
6.3.3 Estrés del retículo endoplásmico y respuesta a proteínas mal plegadas o no plegadas (UPR: Unfolded Protein Response)	
6.3.4 El estrés del retículo endoplásmico en el metabolismo de lípidos	
6.3.4.1 SREBPs	

- 6.3.4.2 C/EBP $\alpha$  y PPAR $\gamma$
- 6.3.5 El estrés del retículo endoplásmico en la obesidad

#### 6.4 Resveratrol

- 6.4.1 Estructura, características y generalidades
- 6.4.2 Efectos benéficos del resveratrol en el metabolismo de lípidos y la activación del estrés del retículo endoplásmico
  - 6.4.2.1 Activación de SIRT1
  - 6.4.2.2 Activación de AMPK
- 6.4.3 Dosis de resveratrol

### 7. Metodología

30

- 7.1 Reactivos
- 7.2 Resumen del diseño experimental y metodología
- 7.3 Animales
- 7.4 Diseño experimental
- 7.5 Dietas
- 7.6 Prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal
- 7.7 Calorimetría indirecta
- 7.8 Determinación de parámetros bioquímicos en plasma
- 7.9 Determinación de parámetros hormonales en plasma
- 7.10 Contenido de lípidos en tejido renal y hepático
- 7.11 Análisis histológico
  - 7.11.1 Análisis morfométrico cuantitativo en tinciones histológicas (PAS & H&E) por cortes en micrótomo (parafina)
  - 7.11.2 Tinción de rojo oleoso por cortes en criostato
- 7.12 Microarreglo de expresión genética (UPR)
- 7.13 Determinación de expresión proteica de marcadores por Western Blot
- 7.14 Análisis estadístico

### 8 Resultados

43

- 8.1 La suplementación con resveratrol redujo la ganancia de peso corporal en una dieta alta en grasa
- 8.2 El resveratrol incrementó la velocidad metabólica oxidativa de lípidos en una dieta alta en grasa
- 8.3 La suplementación con resveratrol en una dieta alta en grasa no modificó la tolerancia a la glucosa
- 8.4 La suplementación con resveratrol modificó varios parámetros a nivel sistémico ante la administración de tunicamicina
  - A) Parámetros bioquímicos en suero
  - B) Parámetros hormonales en suero
- 8.5 La dieta alta en grasa y la tunicamicina incrementaron el contenido de colesterol y de triglicéridos en tejido hepático, y la

suplementación con resveratrol lo previno

8.6 Los grupos alimentados con la dieta alta en grasa, con y sin la administración de tunicamicina, desarrollaron hiperplasia mesangial en glomérulos renales y vacuolización lipídica en túbulos proximales y la suplementación con resveratrol previno el desarrollo de estas lesiones

8.7 El consumo de una dieta alta en grasa y la administración de tunicamicina indujeron la acumulación de lípidos neutros en tejido renal, y la suplementación con resveratrol previno esta alteración

8.8 El contenido de lípidos en tejido renal incrementó en los grupos que consumieron una dieta alta en grasa y que fueron administrados con tunicamicina, y la suplementación con resveratrol lo previno

8.9 La suplementación con resveratrol disminuyó la expresión del mRNA de Srebf2 en riñón en una dieta control y alta en grasa

8.10 La suplementación con resveratrol disminuyó la expresión proteica de los marcadores de estrés del RE y de síntesis de lípidos e incrementó los de la vía del eje SIRT1/AMPK

9	Discusión	86
10	Resumen de resultados	118
11	Conclusiones	121
12	Literatura citada	122

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>FIGURA 1.</b> <i>Esquema de la inactivación de la UPR en condiciones de homeostasis</i>	15
<b>FIGURA 2.</b> <i>Esquema de activación de la vía de respuesta adaptativa de la UPR en condiciones de estrés del RE agudo.</i>	16
<b>FIGURA 3.</b> <i>Esquema de activación de la vía de respuesta terminal de la UPR en condiciones de estrés del RE prolongado y severo.</i>	17
<b>FIGURA 4.</b> <i>Esquema de la regulación del metabolismo de lípidos ante la activación de la UPR en condiciones de estrés del RE.</i>	19
<b>FIGURA 5.</b> <i>Estructura química del cis-resveratrol y trans-resveratrol (Imagen de Gambini et al, 2013)</i>	21
<b>FIGURA 6.</b> <i>Regulación molecular del resveratrol en el metabolismo de lípidos a partir de la activación de SIRT1 y AMPK.</i>	25
<b>FIGURA 7.</b> <i>Regulación metabólica del resveratrol en el estrés del RE a partir de la activación de SIRT1 y AMPK</i>	26
<b>FIGURA 8.</b> <i>Diagrama de diseño experimental y metodología utilizada.</i>	27
<b>FIGURA 9.</b> <i>Lista de genes clasificados de acuerdo a la ruta bioquímica asociada a la UPR.</i>	35
<b>FIGURA 10.</b> <i>Efecto de la suplementación dietaria con resveratrol sobre la ganancia de peso corporal en ratones macho C57BL/6 alimentados con una dieta control (AIN-93M) o una dieta alta en grasa (45% Kcal grasa saturada) durante 26 semanas.</i>	39
<b>FIGURA 11.</b> <i>Efecto de la suplementación con resveratrol en ratones C57BL/6 alimentados con una dieta control (AIN-93M) o una dieta alta en grasa (45% Kcal grasa saturada) por 27 semanas en la proporción de sustratos utilizados y la velocidad metabólica oxidativa en un periodo de ayuno (8 h) y un periodo de posprandio (12 h)</i>	41
<b>FIGURA 12.</b> <i>Efecto de la suplementación con resveratrol en la prueba de tolerancia a la glucosa vía intraperitoneal en ratones C57BL/6 alimentados con una dieta control (AIN-93M) o una dieta alta en grasa (45% Kcal grasa saturada) durante 26 semanas.</i>	44

<b>FIGURA 13.</b> <i>Efecto del resveratrol en el contenido de lípidos en el tejido hepático de ratones C57BL/6 alimentados durante 28 semanas con una dieta control (AIN-93M) o alta en grasa (45% Kcal), con y sin la administración de tunicamicina 8 horas previas a la eutanasia</i>	59
<b>FIGURA 14.</b> <i>Efecto del resveratrol en el análisis morfométrico histológico del riñón de ratones C57BL/6 alimentados con una dieta control (AIN-93M), alta en grasa (45% Kcal) durante 28 semanas, con o sin la administración de tunicamicina 8 horas previas a la eutanasia</i>	61
<b>FIGURA 15.</b> <i>Fotomicrografías representativas a 40X de regiones glomerulares y tubulointersticiales en cortes transversales de riñón tratados con la tinción de rojo oleoso en ratones C57BL/6 alimentados con una dieta control (AIN-93M), alta en grasa (45% Kcal de grasa saturada) o alta en grasa con resveratrol durante 28 semanas ante la inducción farmacológica de estrés del RE a través de la administración de tunicamicina 8 horas previas a la eutanasia.</i>	64
<b>FIGURA 16.</b> <i>Efecto del resveratrol en el contenido de lípidos en el tejido renal de ratones C57BL/6 alimentados durante 28 semanas con una dieta control (AIN-93M) o alta en grasa (45% Kcal), con y sin la administración de tunicamicina 8 horas previas a la eutanasia.</i>	65
<b>FIGURA 17.</b> <i>Perfil de expresión de genes involucrados en la respuesta a proteínas mal plegadas del grupo alimentado con la dieta control con Resveratrol (CR) respecto al grupo Control (C) en ratones C57BL/6 tratados por 28 semanas.</i>	67
<b>FIGURA 18.</b> <i>Perfil de expresión de genes involucrados en la respuesta a proteínas mal plegadas del grupo alimentado con la dieta alta en grasa (AG) respecto al grupo Control (C) en ratones C57BL/6 tratados durante 28 semanas.</i>	68
<b>FIGURA 19.</b> <i>Perfil de expresión de genes involucrados en la respuesta a proteínas mal plegadas del grupo alimentado con la dieta alta en grasa con resveratrol (AGR) respecto al grupo Control (C) en ratones C57BL/6 tratados durante 28 semanas.</i>	69
<b>FIGURA 20.</b> <i>Diagrama de Venn ilustrativo acerca de las proteínas para las cuales codifican los genes del perfil de expresión diferencial de la respuesta a proteínas mal plegadas en los grupos (CR), (AG) y (AGR) respecto al grupo (C)</i>	70
<b>FIGURA 21.</b> <i>Efecto del resveratrol en el análisis de expresión por Western Blot en riñón de los marcadores de estrés del RE ante la administración de tunicamicina en ratones C57BL/6 alimentados con una dieta control (AIN-93M) o una dieta alta en grasa (45% Kcal)</i>	72

<b>FIGURA 22.</b> <i>Efecto del resveratrol en el análisis de expresión por Western Blot en riñón de los marcadores de síntesis de lípidos ante la administración de tunicamicina en ratones C57BL/6 alimentados con una dieta control (AIN-93M) o alta en grasa (45% Kcal) después de 28 semanas de tratamiento dietario</i>	74
<b>FIGURA 23.</b> <i>Efecto del resveratrol en el análisis de expresión por Western Blot en riñón de los marcadores de la vía de AMPK/SIRT1 ante la administración de tunicamicina en ratones C57BL/6 alimentados con una dieta control (AIN-93M) o una dieta alta en grasa (45% Kcal) después de 28 semanas de tratamiento dietario</i>	77
<b>FIGURA 24.</b> <i>Esquema a manera de resumen de los hallazgos encontrados acerca del efecto del resveratrol en el metabolismo renal</i>	105
<b>FIGURA 25.</b> <i>Esquema a manera de resumen de los hallazgos encontrados acerca del efecto del resveratrol en el metabolismo hepático</i>	106
<b>FIGURA 26.</b> <i>Diagrama a manera de resumen de los hallazgos encontrados acerca del efecto del resveratrol a nivel sistémico</i>	108

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b> <i>Diseño experimental de los tratamientos dietarios</i>	28
<b>Tabla 2.</b> <i>Composición de las dietas experimentales</i>	29
<b>Tabla 3.</b> <i>Descripción de controles utilizados para el control de calidad del arreglo</i>	33
<b>Tabla 4</b> <i>Resultados del control de calidad de datos</i>	33
<b>Tabla 5.</b> <i>Clasificación de muestras para análisis de expresión</i>	36
<b>Tabla 6.</b> <i>Método de normalización de muestras por media aritmética de expresión en genes constitutivos evaluados</i>	36
<b>Tabla 7.</b> <i>Peso corporal inicial, peso corporal final, ganancia de peso corporal final y alimento consumido en los ratones alimentados con cada uno de los tratamientos dietarios: C, CR, AG y AGR.</i>	39
<b>Tabla 8.</b> <i>Efecto del resveratrol en valores de parámetros bioquímicos séricos de ratones C57BL/6 alimentados con una dieta control (AIN-93M) o una dieta alta en grasa (45% Kcal grasa saturada)</i>	46
<b>Tabla 9.</b> <i>Efecto del resveratrol en parámetros hormonales séricos de ratones C57BL/6 alimentados con una dieta control (AIN-93M) o una dieta alta en grasa (45% Kcal grasa saturada) por 28 semanas, con y sin la administración de tunicamicina (Tun) 8 horas previas a la eutanasia</i>	55

## **RESUMEN DE ABREVIATURAS**

ACC	Acetil CoA carboxilasa
ALT	Alanina aminotransferasa
AMP	Adenosin monofosfato
AMPK	Proteína cinasa activada por el 5' adenosin monofosfato
AST	Aspartato aminotransferasa
ATF4	Factor activador de la transcripción 4
ATF6	Factor activador de la transcripción 6
ATP	Adenosin trifosfato
C/EBP $\alpha$	Proteína potenciadora de unión de CCAAT $\alpha$
cAMP	Adenosin monofosfato cíclico
CHOP	Proteína homóloga del potenciador de la proteína de unión CCAAT
ChREBP	Proteína de unión a los elementos de respuesta a carbohidratos
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
eIF2 $\alpha$	Factor de iniciación eucariótico $\alpha$
ERAD	Vía de degradación de proteínas asociada al retículo endoplásmico
ERC	Enfermedad renal crónica
FAS	Ácido grasa sintasa
GRP78	Proteína chaperona del RE regulada por glucosa 78
HMG-CoA	Hidroximetilglutaril CoA
IRE1 $\alpha$	Proteína reclutadora de inositol 1
JNK	Cinasa c-Jun N-terminal
LDL	Lipoproteína de baja densidad
MGDC	Control de contaminación de DNA genómico
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDE-4	Fosfodiesterasa 4
PPC	Control positivo de la reacción de PCR
PERK	Proteína cinasa del retículo endoplásmico semejante a PKR
PGC-1 $\alpha$	Coactivador del proliferador de peroxisoma-receptor activado y
PKA	Proteína cinasa A dependiente de cAMP
PPAR $\alpha$	Receptor activado por proliferador de peroxisoma $\alpha$
PPAR $\delta$	Receptor activado por proliferador de peroxisoma $\delta$
PPAR $\gamma$	Receptor activado por proliferador de peroxisoma $\gamma$
RE	Retículo Endoplásmico
RT-PCR	PCR en tiempo real
RTC	Controles de transcripción reversa
RNA	Ácido ribonucleico
S1P	Proteasa de sitio 1
S2P	Proteasa de sitio 2
SERCA2	ATPasa de calcio de retículo sarco/endoplásmico 2
SIRT1	Sirtuína 1
SREBP-1	Proteínas de unión a los elementos reguladores de esteroides 1
SREBP-2	Proteínas de unión a los elementos reguladores de esteroides 2
UPR	Respuesta a proteínas mal plegadas o no plegadas
XBP1	Proteína de unión a X-box 1

## **ABREVIATURAS CORRESPONDIENTES A LOS GRUPOS EXPERIMENTALES**

(C)	Grupo control
(CR)	Grupo control suplementado con resveratrol
(AG)	Grupo alta en grasa
(AGR)	Grupo alta en grasa suplementado con resveratrol
(C+T)	Grupo control administrado con tunicamicina
(CR+T)	Grupo control suplementado con resveratrol administrado con tunicamicina
(AG+T)	Grupo alta en grasa administrado con tunicamicina
(AGR+T)	Grupo alta en grasa suplementado con resveratrol administrado con tunicamicina

## 1. RESUMEN

**Antecedentes:** La acumulación de lípidos ectópicos en riñón está asociada con el desarrollo de la enfermedad renal crónica en la obesidad. Uno de los posibles mecanismos asociados con la lipotoxicidad en el riñón, es el estrés del retículo endoplásmico (RE) y la activación subsecuente de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR). El resveratrol es un compuesto bioactivo que ha demostrado tener propiedades benéficas en las alteraciones del metabolismo de lípidos a través de la activación de la ruta de oxidación de lípidos y la inhibición de la lipogénesis, principalmente a través del eje de señalización de la proteína cinasa activada por el 5' adenosín monofosfato (AMPK) y la desacetilasa Sirtuina 1 (SIRT1).

**Objetivo:** Evaluar el efecto del resveratrol ante la inducción crónica y aguda del estrés del retículo endoplásmico.

**Metodología:** Se utilizaron 40 ratones macho C57BL/6 alimentados con uno de cuatro posibles tratamientos dietarios: Control (C), Control + Resveratrol (C+R), Alta en grasa (AG), Alta en grasa + Resveratrol (AGR). A la mitad de los ratones en cada tratamiento dietario se les administró tunicamicina (T) 8 h previas a la eutanasia, la cual bloquea la primera enzima de glucosilación de proteínas e induce la acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico. Se determinó la ganancia de peso corporal semanal de los animales, se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa y una calorimetría indirecta. Se determinaron diversos parámetros bioquímicos en suero: glucosa, colesterol total, lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteínas de alta densidad (HDL), triglicéridos, alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), creatinina y albúmina; así como parámetros hormonales: leptina, adiponectina e insulina. Se hizo un análisis morfológico cuantitativo para buscar datos de lesión renal (hipercelularidad mesangial y vacuolización lipídica en túbulos proximales), un análisis comparativo a partir de la tinción de rojo oleoso en tejido renal y se determinó el contenido total de triglicéridos y colesterol en riñón. Se realizó un microarreglo de expresión por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) con genes asociados a la UPR en el riñón, y se determinó el perfil de

expresión de ciertos marcadores proteicos en el riñón como la chaperona del RE regulada por glucosa 78 (GRP78), la proteína homóloga del potenciador de la proteína de unión a CCAAT (CHOP), la proteína de unión a los elementos reguladores de esteroides 1 (SREBP-1(p) y SREBP-1 (m)), la proteína de unión a los elementos reguladores de esteroides 2 (SREBP-2 (m)), AMPK total (t-AMPK), AMPK fosforilado (p-AMPK) y el coactivador del proliferador de peroxisoma-receptor activado  $\gamma$  (PGC1- $\alpha$ ).

**Resultados:** La ganancia de peso corporal no cambió entre los grupos control; sin embargo, en el grupo AGR fue menor que en el grupo AG, debido a un mayor consumo de oxígeno y producción de CO<sub>2</sub>. La concentración de colesterol total y LDL fue menor en AGR comparado con AG. Los grupos C+T y AG+T presentaron menor concentración de glucosa, colesterol total y LDL respecto a los mismos grupos sin tunicamicina. Los grupos CR+T y AGR+T no presentaron diferencias en la concentración sérica de albúmina, creatinina, AST, ALT y triglicéridos incluso con la administración de tunicamicina. Los niveles de leptina fueron mayores en AG+T que en AG, mientras que CR+T y AGR+T no presentaron diferencias respecto a C, CR y AGR. AG y AGR, con y sin tunicamicina, presentaron mayor concentración de insulina que C y CR. AG+T presentó menor concentración de adiponectina que AGR. En la tinción de rojo oleoso se observó la formación de gotas lipídicas en el glomérulo y los túbulos proximales de AG, y una mayor acumulación de lípidos en AG+T; AGR y AGR+T presentaron una menor cantidad de depósitos lipídicos que AG y AG+T. AG y AG+T presentaron hiperplasia mesangial y vacuolización lipídica en túbulos proximales; mientras que AGR y AGR+T se comportaron de forma similar al control. AG y AG+T presentaron un incremento significativo en el contenido de triglicéridos y colesterol en tejido renal y hepático, mientras que AGR y AGR+T presentaron valores similares al grupo C. El microarreglo de expresión por PCR de la UPR en riñón presentó una disminución en la expresión de Srebf2 en CR y AGR respecto a C. La expresión de proteínas en riñón presentó un incremento en la expresión de los marcadores de estrés del retículo endoplásmico GRP78 y CHOP en todos los grupos tratados con tunicamicina respecto a los grupos no tratados; AGR y AGR+T presentaron

una tendencia a disminuir el incremento respecto a AG y AG+T. AG, AG+T, AGR y AGR+T presentaron un incremento significativo en la expresión de SREBP-1 (p) y SREBP-1 (m) comparado con C, C+T, CR y CR+T; AG y AG+T un incremento en la expresión de SREBP-2 (m) respecto a todos los demás grupos. CR y AGR incrementaron la proporción de p-AMPK/AMPK y la expresión de PGC1- $\alpha$  respecto a C y AG, con y sin tunicamicina.

**Resumen de resultados:** La suplementación con resveratrol presentó diversos efectos benéficos en la ganancia de peso corporal, el gasto energético, diversos parámetros bioquímicos y hormonales, marcadores histológicos de daño renal, genes asociados con la UPR, expresión de marcadores de la UPR, expresión de marcadores de lipogénesis, expresión proteínas asociadas con el eje AMPK/SIRT1 y depósitos de lípidos en el hígado y riñón ante la inducción del estrés del retículo endoplásmico.

**Conclusión:** La suplementación con resveratrol a una dosis de 200 mg/kg pc/d en un modelo de ratones macho C57BL/6 atenuó la lipogénesis renal y el estrés del RE en el riñón.

## 2. ABSTRACT

**Background:** Ectopic renal lipid accumulation is associated with the development of chronic kidney disease in obesity. One of the possible molecular mechanisms that implicate lipotoxicity on the kidney is the endoplasmic reticulum stress and the subsequent activation of the unfolded protein response (UPR). Resveratrol is a bioactive compound that improves altered lipid metabolism by activating lipid oxidation and inhibiting lipogenesis, mainly through AMPK/SIRT1 pathways.

**Purpose:** To evaluate the effect of resveratrol over a chronic and acute induction of ERS.

**Methods:** Male C57BL/6 mice were fed with one of four dietary treatments: Control (C), Control + Resveratrol (CR), High Fat (AG), and High Fat + Resveratrol (AGR). 8h before euthanasia, half of the mice on each group were treated with tunicamycin (T), which disables appropriate protein glycosilation and induces misfolded proteins accumulation. Weight gain, glucose tolerance test, indirect calorimetry, serum biochemical determinations (glucose, cholesterol, triglycerides, creatinine, ALT, AST, lipoproteins), serum hormones (leptin, adiponectin and insulin), morphological histological analysis of renal tissue, oil-red O (ORO) staining in renal tissue, triglycerides and cholesterol content determinations, microarray for UPR PCR profiler in kidney, protein markers expression profile in kidney (GRP78, CHOP, SREBP-1(p), SREBP-1 (m), SREBP-2 (m), t-AMPK, p-AMPK and PGC1- $\alpha$ ) were performed.

**Results:** Weight gain did not change in control groups, yet in AGR was lower than AG along with increased O<sub>2</sub> consumption and CO<sub>2</sub> production. AG and AGR had glucose intolerance. Total and LDL-cholesterol were lower in AGR compared to AG. C+T and AG+T had lower glucose, total and LDL-cholesterol compared to the same two groups without tunicamycin. CR+T and AGR+T had no differences in serum albumin, creatinine, AST, ALT and triglycerides despite T-treatment. Leptin was higher in AG+T than in AG, while CR+T and AGR+T had no leptin differences with C, CR and AGR. AG and AGR, with and without tunicamycin, had higher insulin than C and CR. AG+T had lower adiponectin rate than AGR. ORO staining revealed the formation of lipid droplets in proximal tubules and glomeruli of AG and

larger lipid accumulation in AG+T; AGR and AGR+T exhibited less lipid deposition than AG and AG+T. AG and AG+T showed mesangial hypercellularity and lipid vacuolization on proximal tubules; while AGR and AGR+T were observed similar to the control group. AG and AG+T had a significant increase in triglycerides and cholesterol content in renal and hepatic tissue, while AGR and AGR+T showed similar values to the control groups. UPR PCR microarray in the kidney showed under-expression of Srebf2 CR and AGR as compared to C. Renal protein analysis showed over-expression of ERS markers GRP78 and CHOP in all tunicamycin treated groups compared to non-treated groups; AGR and AGR+T showed trend to a lower increase than AG and AG+T. AG, AG+T, AGR and AGR+T showed a significant increase in SREBP-1 (p) and SREBP-1 (m) expression compared to C, C+T, CR and CR+T. C+T, AG and AG+T showed higher SREBP-2 (m) expression than the rest of the groups. CR and AGR increased p-AMPK/AMPK ratio and PGC1- $\alpha$  expression as compared to C and AG, with and without T.

**Results brief:** Resveratrol supplementation exerted beneficial effects on body weight gain, energy expenditure, biochemical and hormonal variables, histological markers of renal damage, UPR-associated gene, UPR makers, lipogenesis markers and AMPK/SIRT1 pathway protein expression, and lipid deposition in the liver and the kidney with chronic and acute ERS induction.

**Conclusion:** Resveratrol supplementation at a dose of 200 mg/kg bw/d in a model of male C57BL/6 mice fed with a high fat diet, ameliorated renal lipogenesis and ER stress in the kidney.

### 3. INTRODUCCIÓN

La obesidad es la acumulación anormal o excesiva de grasa en el cuerpo [2] causada por la desproporción del balance energético entre la nutrición y la actividad física, la carga genética, las interacciones genético-ambientales y los factores dependientes del contexto social de cada individuo [3]. Este padecimiento representa el principal factor de riesgo para el desarrollo de diversas alteraciones metabólicas, una de ellas es la enfermedad renal crónica [3,4], que presenta el 10% de la población mundial [5].

La enfermedad renal asociada a obesidad se caracteriza por presentar diversas alteraciones fisiológicas, una de ellas es la presencia de depósitos lipídicos [6,7], tanto en los glomerulos como los túbulos proximales [7–9].

La acumulación anormal de lípidos ectópicos en riñón ocurre por alteraciones en el metabolismo lipídico y consiste en un proceso tóxico que induce daño celular progresivo denominado como lipotoxicidad renal y puede provocar el desarrollo de fenómenos fisiopatológicos como: la expansión mesangial, el daño directo de podocitos, el desarrollo de glomeruloesclerosis la vacuolización lipídica en túbulos proximales, entre otras [10] [11].

Hay dos teorías para la acumulación de lípidos ectópicos en el tejido renal durante la obesidad: la lipotoxicidad renal asociada a la hipótesis de expansibilidad y flexibilidad del tejido adiposo [12–14] y la lipotoxicidad renal asociada a la lipogénesis *de novo* en riñón [15]. Y se ha descrito que el estrés del RE es un posible mecanismo de la lipogénesis *de novo* en tejido renal [16].

El retículo endoplásmico (RE) es el principal orgánulo celular encargado de la síntesis, plegamiento, modificación y transporte de proteínas [17,18]; la síntesis y distribución de lípidos y esteroides [18,19]; y el almacenamiento y liberación regulada de iones de calcio [19], entre otras.

La alteración de la homeostasis y el correcto funcionamiento del RE por diversas condiciones fisiopatológicas (como el exceso o la falta de nutrientes, una cantidad elevada de síntesis de proteínas, la hipoxia, alteraciones en la glucosilación de proteínas, retos inflamatorios, etc), genera una condición denominada: estrés del RE [20,21]. Y esta condición puede ser inducida por diversos factores fisiológicos, como la obesidad [22], o farmacológicos, como la tunicamicina [23].

La respuesta a las proteínas mal plegadas o no plegadas (UPR: Unfolded Protein Response) es la respuesta celular que ayuda a la célula a adaptarse ante el estrés de RE [17,19,21], y para ello utiliza tres rutas de señalización que actúan en paralelo y en serie, mediadas por tres sensores: 1) la proteína reclutadora de inositol 1 (IRE1), 2) el factor de activación de la transcripción 6 (ATF6), y 3) la proteína cinasa del RE semejante a PKR (PERK) [20,21,24].

La activación de la UPR conduce a alteraciones en el metabolismo de lípidos que se han vinculado con el desarrollo de enfermedades metabólicas crónicas, como la lipogénesis renal [16], principalmente a través de la expresión de los reguladores maestros de la síntesis de lípidos: las proteínas de unión a los elementos reguladores de esteroides (SREBPs) y sus blancos [25].

Es resveratrol es un compuesto bioactivo natural que ha demostrado tener diversos efectos benéficos esencialmente a través de la activación de dos sensores metabólicos: la sirtuína 1 (SIRT1) y la proteína cinasa dependiente de AMP (AMPK) [26,27].

Se ha descrito que los principales blancos de la activación de SIRT1 se encuentran implicados en la respiración mitocondrial, el metabolismo de carbohidratos (y la sensibilidad a la insulina) y el metabolismo de lípidos [27–29]. Mientras que el AMPK disminuye las rutas que consumen energía, como la síntesis de lípidos y de proteínas, y activa las rutas que producen energía, como la oxidación de lípidos y la glucólisis [27] y dos de sus principales blancos son los SREBPs [30,31]. Además de que ambas proteínas han demostrado estar implicadas en la disminución de la expresión de diversos marcadores de estrés del RE [22,32–35].

Por ello se propone observar el efecto del resveratrol en la modulación de la respuesta al estrés del RE y la lipogénesis renal en este estudio.

## **4. HIPÓTESIS**

Si se alimentan ratones C57BL/6 macho con una dieta alta en grasa suplementada con resveratrol por tiempo crónico, el consumo de resveratrol reducirá el estrés del retículo endoplásmico, y por lo tanto la respuesta a proteínas mal plegadas, lo que disminuirá la síntesis endógena de lípidos en riñón, y en consecuencia, disminuirá el daño renal. Así mismo, la suplementación crónica con resveratrol limitará el efecto del insulto agudo de la inducción farmacológica del estrés del retículo endoplásmico en los animales tratados con tunicamicina.

Así mismo, la suplementación con resveratrol inducirá diversos efectos benéficos en el estado metabólico general de los animales en el modelo de obesidad inducida por dieta.

## **5. OBJETIVOS**

### **A) OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto del resveratrol en ratones C57BL/6 sobre la respuesta a la inducción crónica (modelo de obesidad inducida por dieta) y aguda (fármaco tunicamicina) de respuesta a las proteínas mal plegadas y su impacto en el metabolismo de lípidos (lipogénesis y oxidación de ácidos grasos) en el tejido renal. Así mismo, evaluar el efecto del resveratrol en el estado metabólico general de los animales tanto en el modelo de obesidad inducida por dieta como en el modelo de inducción aguda al estrés del retículo endoplásmico por medio de tunicamicina.

### **B) OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar el efecto del resveratrol sobre el peso corporal semanal y el consumo diario de alimento de los animales en los cuatro tratamientos dietarios durante 28 semanas.
2. Evaluar el efecto del resveratrol en la tolerancia a la glucosa de los animales en los cuatro tratamientos dietarios al finalizar las 26 semanas de tratamiento.
3. Evaluar el gasto calórico de los animales en los cuatro tratamientos dietarios mediante calorimetría indirecta para observar el efecto del resveratrol en la proporción y la velocidad de oxidación de sustratos después de 27 semanas de tratamiento.
4. Analizar el efecto del resveratrol y de la administración de tunicamicina en la concentración de diversos parámetros bioquímicos (glucosa, triglicéridos, colesterol total, lipoproteínas de baja densidad, lipoproteínas de alta densidad, creatinina, albúmina, alanina-aminotransferasas y aspartato-aminotransferasas) y hormonales (leptina, adiponectina de alto peso molecular, adiponectina total e insulina) en el suero de los ratones de los cuatro tratamientos dietarios.
5. Determinar el efecto del resveratrol en el tejido renal por análisis

morfométrico cuantitativo en la presencia de marcadores de daño renal (hipercelularidad mesangial y vacuolización lipídica en túbulos proximales) en los animales tratados con una dieta alta en grasa por 28 semanas y posteriormente sometidos a estrés del retículo endoplásmico agudo con tunicamicina 8 h previas a la eutanasia.

6. Observar el efecto del resveratrol en la distribución de lípidos neutros en el tejido renal de los ratones tratados con una dieta alta en grasa por 28 semanas de tratamiento y administrados con tunicamicina 8 h previas a la eutanasia.
7. Determinar el efecto del resveratrol en el contenido de triglicéridos y de colesterol en el tejido renal y hepático de los ratones en los cuatro tratamientos dietarios después de 28 semanas de tratamiento y posteriormente sometidos al estrés del retículo endoplásmico agudo con tunicamicina 8 h previas a la eutanasia.
8. Determinar el efecto de resveratrol en la expresión de genes involucrados en las tres rutas de señalización de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) y a genes blanco relacionados con su activación, en el tejido renal de los animales en los cuatro tratamientos dietarios después de 28 semanas de tratamiento.
9. Analizar el efecto del resveratrol en la expresión de proteínas involucrados en la respuesta a las proteínas mal plegadas (GRP78 y CHOP), la ruta de síntesis de triglicéridos y colesterol (SREBP-1 y SREBP-2) y el eje de AMPK/SIRT1 (p-AMPK, AMPK total y PGC1- $\alpha$ ) en el tejido renal de los ratones de los cuatro tratamientos dietarios después de 28 semanas de tratamiento y posteriormente administrados con tunicamicina 8 h previas a la eutanasia.

## **6. ANTECEDENTES**

### **6.1 OBESIDAD: DEFINICIÓN, IMPORTANCIA Y PREVALENCIA**

La obesidad se define como la acumulación anormal o excesiva de grasa en el cuerpo que puede inducir efectos adversos en la salud [2]. Las causas fundamentales que conllevan al desarrollo de este padecimiento son: la desproporción del balance energético entre la nutrición y la actividad física, la carga genética, las interacciones genético-ambientales y los factores dependientes del contexto social de cada individuo [3]

Se considera que la obesidad es el principal problema de salud pública en el mundo, dado que en las últimas tres décadas (1980-2014), la prevalencia de este padecimiento ha incrementado más del doble a nivel mundial [2,3]. De acuerdo con los datos estimados por la Organización Mundial de la Salud, en 2014, alrededor del 13% de la población mundial (11% de hombres y 15% de mujeres) tiene obesidad [2]. Y se calcula que para el año 2030, más de la mitad de la población mundial adulta tendrá sobrepeso u obesidad [4]

A nivel mundial, México ocupa el segundo lugar en las cifras publicadas de prevalencia de sobrepeso y obesidad en población adulta, según los valores estimados por la Organización Mundial para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD) [36]. Por otro lado, de acuerdo con las cifras arrojadas en la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) del 2016, la prevalencia tanto de sobrepeso como de obesidad, se incrementó en dos de los tres grupos de edad comparados con lo descrito en 2014: en niños en edad escolar, disminuyó de 34.4% a 33.2%; en adolescentes, aumentó de 34.9% a 36.3%; y en adultos, aumentó de 71.2% a 72.5% [37].

La obesidad representa el principal factor de riesgo para el desarrollo de diversas alteraciones metabólicas, como: la resistencia a la insulina, el aumento de resistencias vasculares periféricas, el aumento de actividad adrenérgica, el aumento de aldosterona con retención de agua y sodio, el incremento del gasto cardíaco, las alteraciones en la función de los endotelios por adipocinas (leptina y adiponectina), entre otras [38]. Y estas alteraciones metabólicas conllevan al desarrollo de diversas patologías crónicas, como diversas enfermedades cardiovasculares, la diabetes mellitus tipo 2, la hipertensión arterial, la enfermedad renal crónica (ERC), entre otras [3,4]. Por lo que la obesidad se considera la segunda causa más importante de mortalidad a nivel mundial.

Por otro lado, la obesidad tiene un impacto socioeconómico muy alto, no sólo debido al alto costo que representan los tratamientos para los sistemas de salud (hospitalización, medicamentos, servicios, equipos, etc), sino también porque implica una pérdida de productividad por el desarrollo de comorbilidades que provocan discapacidades, y por la mortalidad temprana de aquellos que la padecen, lo cual repercute en el crecimiento económico. De acuerdo con los datos

publicados, sólo en el año 2014, el impacto económico global de la obesidad fue de aproximadamente \$ 40 trillones [4].

## **6.2 LA ENFERMEDAD RENAL ASOCIADA A OBESIDAD**

### **6.2.1 FISIOLÓGÍA RENAL: GENERALIDADES**

Los riñones son los órganos principales que componen el sistema renal. Son dos estructuras que se disponen en la parte posterior de la cavidad peritoneal, en cada lado de la columna vertebral [39,40].

Anatómicamente, se pueden distinguir dos regiones en el riñón: la corteza, que es la región granular externa; y la médula, que es la región interna [39,40]. En la corteza se localizan los glomérulos, que son redes de capilares sanguíneos en los cuales comienza la filtración del plasma sanguíneo, y a ello se debe su granularidad [40]. A diferencia de la médula, que contiene una cantidad mucho menor de glomérulos y consiste principalmente en túbulos renales y vasos sanguíneos, y se divide en regiones cónicas llamadas pirámides renales [40].

Cada riñón está constituido por nefronas, que son unidades funcionales independientes, incapaces de regenerarse, cuya función es formar la orina [39,40]. Una nefrona está formada por un glomérulo y un túbulo, conformado por distintas porciones [39,40].

Como se mencionó previamente, el glomérulo es en donde origina el filtrado de la sangre para la formación de la orina, y está formado por una red de capilares sanguíneos acomodados en forma de penacho, y recubiertos de células epiteliales [39,40]. Alrededor del glomérulo, hay una estructura capsular epitelial denominada cápsula de Bowman, que rodea a los capilares que conforman al glomérulo y se comunica en un extremo con el lumen del túbulo renal en su porción proximal, lo que permite el paso del filtrado del sistema vascular del glomérulo hacia el sistema epitelial tubular [39,40].

Los túbulos son estructuras epiteliales largas con varias subdivisiones, en donde el líquido filtrado se convierte en orina [39,40]. La primera porción tubular es el túbulo proximal, que conecta a la cápsula de Bowman con el asa de Henle, y cuya función principal es reabsorber los nutrientes del filtrado glomerular de regreso a la sangre (glucosa, proteínas, iones), y permitir el paso del resto del filtrado a la siguiente porción [40]. El asa de Henle es la segunda porción tubular, y consiste en una región en forma de U con túbulos delgados que tienen una rama ascendente y una descendente, cuya función principal es concentrar la orina (filtrado) y permitir su paso hacia el túbulo distal [40]. El túbulo distal pasa el filtrado hacia el túbulo conector, y éste, hacia los túbulos colectores (inicial, cortical y medular), que permiten el paso de la orina hacia el uréter, y éste, a la vejiga [40].

Los riñones tienen tres principales funciones:

- 1) Actúan como filtros para remover ciertos productos de la sangre y los desechan a través de la orina [40]. Se encargan de la excreción de productos metabólicos de desecho (urea, del metabolismo de aminoácidos; creatinina, de la creatina muscular; ácido úrico, de los ácidos nucleicos; productos finales del metabolismo de la hemoglobina, como la bilirrubina; y metabolitos de varias hormonas), toxinas y otras sustancias extrañas, como los fármacos [39].
- 2) Regulan el equilibrio hídrico y electrolítico [39], el equilibrio ácido-base [39,40] y el balance de fluidos corporales [40].
- 3) Sintetizan y activan hormonas asociadas con procesos metabólicos, como: la eritrogénesis [39,40], el metabolismo de calcio [40], la regulación de la presión arterial [39,40] y la producción de 1,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> [39].

### **6.2.2 LA ENFERMEDAD RENAL ASOCIADA A OBESIDAD**

La enfermedad renal crónica se define como la pérdida progresiva e irreversible de nefronas funcionales, que provoca la pérdida paulatina de las funciones del riñón, y es una de las causas más importantes de muerte e incapacidad en muchos países del mundo [39,41].

Aproximadamente el 10% de la población mundial presenta enfermedad renal crónica (ERC), y en México se ha descrito una prevalencia del 9.2% de la población general [5].

Entre los factores más importantes que desencadenan el desarrollo de la ERC, se encuentra la obesidad, que es un factor de riesgo importante para la hipertensión y la diabetes, las dos causas más importantes asociadas a la ERC y la enfermedad renal terminal [42]; además de que frecuentemente presenta alteraciones metabólicas asociadas, como la dislipidemia [7]. Así mismo, la obesidad genera un estado de inflamación crónica de bajo nivel provocada por un exceso de consumo de nutrimentos, y esta condición también se ha asociado con la progresión de la ERC [17].

La patogénesis de la enfermedad renal asociada a obesidad se caracteriza por presentar diversas alteraciones fisiológicas, como glomerulomegalia (incremento en el diámetro glomerular) [7], hiperfiltración de proteínas por hipertensión glomerular [42], fibrosis tubulointersticial (fibrosis alrededor de los túbulos renales)[43] y lesiones de glomeruloesclerosis (fibrosis glomerular) [7].

Recientemente, han sido descritos más características asociadas con el desarrollo de la enfermedad renal asociada a obesidad, una de las que más ha llamado la atención es la presencia de depósitos lipídicos [6,7], tanto en los glomérulos como los túbulos proximales [7–9], principalmente [6]. En éste tópico se centra este trabajo, y el mecanismo propuesto se describe a detalle en los siguientes subtemas.

### **6.2.3 LIPOTOXICIDAD RENAL EN LA ENFERMEDAD RENAL ASOCIADA A OBESIDAD**

En condiciones normales, aproximadamente el 3% del riñón está compuesto por lípidos: 1.5% son fosfolípidos, 0.6% son triglicéridos y 0.3% son ácidos grasos libres no esterificados [8]. El riñón utiliza diversos sustratos como combustible energético, pero la beta oxidación mitocondrial de ácidos grasos es el principal recurso de producción de ATP, sobretodo en los túbulos proximales [8].

Sin embargo, cuando hay un exceso de nutrimentos, ocurre la acumulación excesiva de lípidos en el tejido renal. Esta acumulación anormal de lípidos ectópicos en órganos parenquimatosos ocurre por alteraciones en el metabolismo lipídico y consiste en un proceso tóxico que induce daño celular progresivo. Este fenómeno se conoce como lipotoxicidad [12,14,44]. Así mismo, cuando este proceso afecta a varios orgánulos celulares, puede contribuir a la muerte celular inducida por lípidos o lipoapoptosis [12].

La lipotoxicidad contribuye con el daño celular en la enfermedad renal asociada a obesidad [7,45] al provocar el desarrollo de fenómenos fisiopatológicos como: la expansión mesangial (expansión de la matriz mesangial glomerular a consecuencia de la inflamación) [10], el daño directo de podocitos (tipo de células renales que rodean a los capilares glomerulares) [11] y el desarrollo de glomeruloesclerosis [10].

Se han propuesto dos diferentes teorías para la acumulación de lípidos ectópicos en el tejido renal durante la obesidad:

#### **6.2.3.1 LIPOTOXICIDAD RENAL ASOCIADA A LA HIPÓTESIS DE EXPANSIBILIDAD Y FLEXIBILIDAD DEL TEJIDO ADIPOSO**

Durante la obesidad, el consumo excesivo de calorías a través de la dieta se acumula en forma de triglicéridos en el tejido adiposo [12,13]. Sin embargo, el tejido adiposo, a pesar de tener la capacidad de hipertrofiarse, tiene un límite que cuando se alcanza, se vuelve disfuncional y ya no puede almacenar más lípidos [13,44]. En el establecimiento de la obesidad, este límite se alcanza con frecuencia, y el exceso de lípidos se acumula de forma ectópica en otros órganos, como el hígado y el riñón [12–14].

En esta acumulación anormal de lípidos, el contenido intracelular de ácidos grasos neutros libres incrementa, al igual que el de la concentración de ceramidas y diacilgliceridos, que resultan tóxicos para la célula [12,14,44].

#### **6.2.3.2 LIPOTOXICIDAD ASOCIADA A LIPOGÉNESIS *DE NOVO* EN RIÑÓN**

El segundo mecanismo que contribuye en el desarrollo de la lipotoxicidad en el riñón, es el incremento en la síntesis de lípidos *de novo*, tanto de triglicéridos como de colesterol [15].

Las proteínas de unión a los elementos reguladores de esteroides (SREBPs) son una familia de factores de transcripción maestros que regulan múltiples genes involucrados en la síntesis *de novo* de colesterol y ácidos grasos [46]. Se sabe que SREBP-1c y SREBP-2 tienen efectos relativos diferentes sobre la expresión de genes blanco [46]. El SREBP-1 activa preferencialmente genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos incluyendo a la acetil CoA carboxilasa (ACC) y la ácido graso sintasa (FAS); mientras que, SREBP-2 activa preferencialmente genes involucrados en la biosíntesis de colesterol, como la hidroximetilglutaril CoA (HMG-CoA) sintasa y la hidroximetilglutaril CoA (HMG-CoA) reductasa [46].

En estudios realizados sobre la síntesis de lípidos *de novo* en riñón, se ha demostrado que el aumento en la concentración de triglicéridos se debe al incremento en la expresión SREBP-1c [15,47,48] y sus proteínas blanco (ACC [47] y FAS [47]), así como la proteína de unión a los elementos de respuesta de carbohidratos (ChREBP) [15], que resulta en un incremento en la síntesis de triglicéridos. Aunado a ello, también se ha descrito la disminución en la expresión de los receptores activados por proliferación de peroxisomas  $\alpha$  y  $\delta$  (PPAR $\alpha$  y PPAR $\delta$ ), que resulta en la disminución de la oxidación de ácidos grasos [15].

Por otro lado, también se ha identificado la asociación entre el incremento en la expresión de SREBP-2 [15,48] y la HMG-CoA reductasa, con el incremento en la concentración de colesterol en el tejido renal [15].

Consistentemente, se observó que el incremento en la síntesis *de novo*, tanto de triglicéridos como de colesterol, está asociado con el desarrollo de expansión mesangial, el daño de podocitos y lesiones de glomerulosclerosis [15].

El mecanismo exacto a través del cual se activa la lipogénesis *de novo* en el riñón durante la obesidad aún no está claro, pero el estrés del RE se ha propuesto como un posible mecanismo asociado al desarrollo de este fenómeno patológico [8].

## **6.3 ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO COMO MECANISMO DE LA LIPOGÉNESIS RENAL**

### **6.3.1 FUNCIÓN CELULAR DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO**

El retículo endoplásmico (RE) es un orgánulo celular localizado en la región perinuclear del citoplasma [19]. Se han descrito dos tipos de estructuras membranosas del RE, que se distinguen por sus propiedades bioquímicas, morfológicas y sus características de sedimentación: el RE rugoso, unido a ribosomas, y el RE liso, libre de ribosomas [19].

El RE lleva a cabo diversos procesos, dentro de los cuales se encuentran: la síntesis, plegamiento, modificación y transporte de proteínas [17,18]; la síntesis y distribución de lípidos y esteroides [18,19]; la biogénesis de autofagosomas y peroxisomas[21]; y el almacenamiento y liberación de iones de calcio [19].

Las proteínas destinadas al RE y a otros orgánulos, o aquellas destinadas para secreción, se sintetizan en el RE [19]. Una vez sintetizadas en su conformación nativa, en el RE se realiza el plegamiento, las modificaciones post-traduccionales y el correcto ensamblaje del nuevo polipéptido [18], para lo cual, cuenta con proteínas especializadas para asistir en este proceso [19]. Una vez plegadas, se realizan diversos mecanismos de control de calidad dentro del RE, en donde sólo las proteínas plegadas correctamente se exportan al complejo de Golgi; mientras que las proteínas mal plegadas se retienen en el lumen del RE para completar el proceso correctamente o ser degradadas [18]. Éste proceso es esencial para la supervivencia y el correcto funcionamiento fisiológico de la célula [21].

### **6.3.2 DEFINICIÓN DEL ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO**

El plegamiento de proteínas es un proceso celular que requiere de grandes cantidades de energía para llevarse a cabo, además involucra la coordinación de proteínas a través de diversos orgánulos, y utiliza recursos provenientes de varias rutas metabólicas [21]. Esto hace que el correcto plegamiento de proteínas en el RE sea muy susceptible a cambios en el medio intracelular o a estímulos externos [21].

La alteración de la homeostasis y el correcto funcionamiento del RE por diversas condiciones fisiopatológicas, genera una alteración denominada: estrés del RE [20,21].

Hay diversos factores asociados a esta condición, como el exceso o la falta de nutrimentos, una cantidad elevada de síntesis de proteínas, alteraciones en el proceso de ubiquitinación de proteínas, la hipoxia, un proceso de autofagia deficiente, alteraciones en la glucosilación de proteínas, retos inflamatorios, entre otros [19–21]. La presencia de estos factores ocasiona la alteración a las funciones del RE [24] provocando una interferencia en el plegamiento normal y la maduración de las proteínas recién sintetizadas en el RE [18,20], esto provoca la acumulación de proteínas recién sintetizadas no plegadas o mal plegadas en el lumen del RE [17]. La acumulación de estas proteínas induce su agregación y propicia una toxicidad celular subsecuente, que puede afectar de manera muy importante la integridad de la célula [20].

Por esta razón, corregir el estrés de RE es esencial para la supervivencia de la célula, ya que si no lo hace, esta condición puede conllevar a su muerte [19].

Hay diversos modelos que pueden utilizarse para el estudio de la activación del estrés del RE. Por un lado, están los modelos farmacológicos agudos, que han permitido estudiar los mecanismos involucrados en la ruta de la UPR, dentro de los cuales los más comunes son:

- La tunicamicina: antibiótico sintetizado por *Streptomyces spp*, que inhibe la N-glucosilación de proteínas bloqueando la transferencia de la N-acetilglucosamina-1-dosfato (GlcNAc-1-P) a partir del UDP-GlcNAc al dolicol-P [23]. La inhibición de la glucosilación de proteínas induce la acumulación de proteínas mal plegadas, y por lo tanto el estrés del RE [23]. En este estudio, se utiliza este fármaco como inductor del estrés del RE de forma aguda.
- La tapsigargina: inhibe la actividad de la ATPasa de calcio del retículo endoplásmico, incrementando la concentración de calcio en el citosol y bloqueando la entrada del mismo al RE. Este desbalance provoca la activación del estrés del RE [49].

Por otro lado están los modelos fisiológicos de inducción al estrés del RE [22], en donde la activación es crónica, y moderada. Entre otros, tenemos a los siguientes:

- Modelos de obesidad inducida por dieta o por modificación genética. La concentración excesiva de lípidos circulantes y el estado crónico inflamatorio inducido durante la obesidad conllevan a la activación de estrés del RE y la activación subsecuente del estrés del RE en diversos órganos: tejido adiposo, hígado, músculo, cerebro, riñón, etc [17,19,50]. En este proyecto, utilizamos un modelo de inducción a obesidad por medio de una dieta alta en grasa como modelo de inducción fisiológica crónica del estrés del RE.
- Modelos de DM2 inducida por dieta, por modificación genética o por vía farmacológica. La exposición crónica de concentraciones elevadas de glucosa conlleva a la activación de la UPR en el páncreas, lo que eventualmente lleva a la disfunción celular y muerte de las células  $\beta$ -pancreáticas [51,52].
- Modelos de esteatosis hepática inducida por dieta. Se ha demostrado que el exceso de ácidos grasos libres a partir del proceso de lipólisis en el tejido adiposo durante la obesidad y el exceso de lípidos circulantes provenientes de la ingesta dietaria activan el estrés del RE en hígado, lo que conlleva a la activación de la UPR, y ésta regula lipogénesis que se ve implicada en la fisiopatología del desarrollo de esteatosis hepática [53].

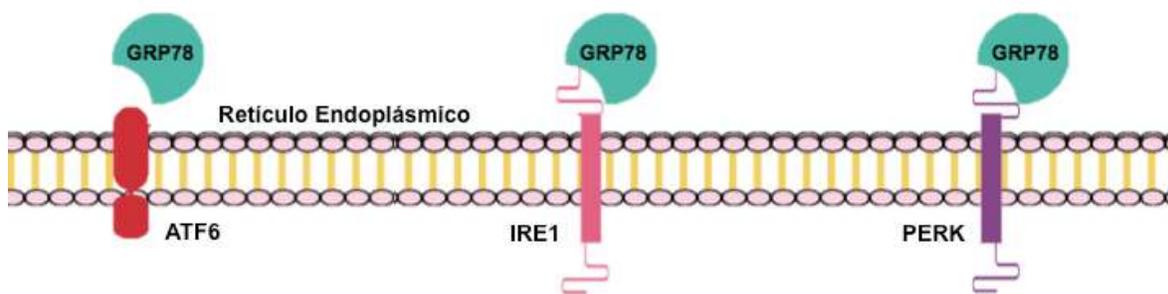
### **6.3.3 ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO Y RESPUESTA A PROTEÍNAS MAL PLEGADAS O NO PLEGADAS (UPR: UNFOLDED PROTEIN RESPONSE)**

La respuesta a las proteínas mal plegadas o no plegadas (UPR: Unfolded Protein Response) es la respuesta celular que ayuda a la célula a adaptarse ante el estrés de RE [17,19,21].

La UPR es una ruta de señalización que busca resolver la situación celular inducida por el estrés del RE a través de diversos mecanismos:

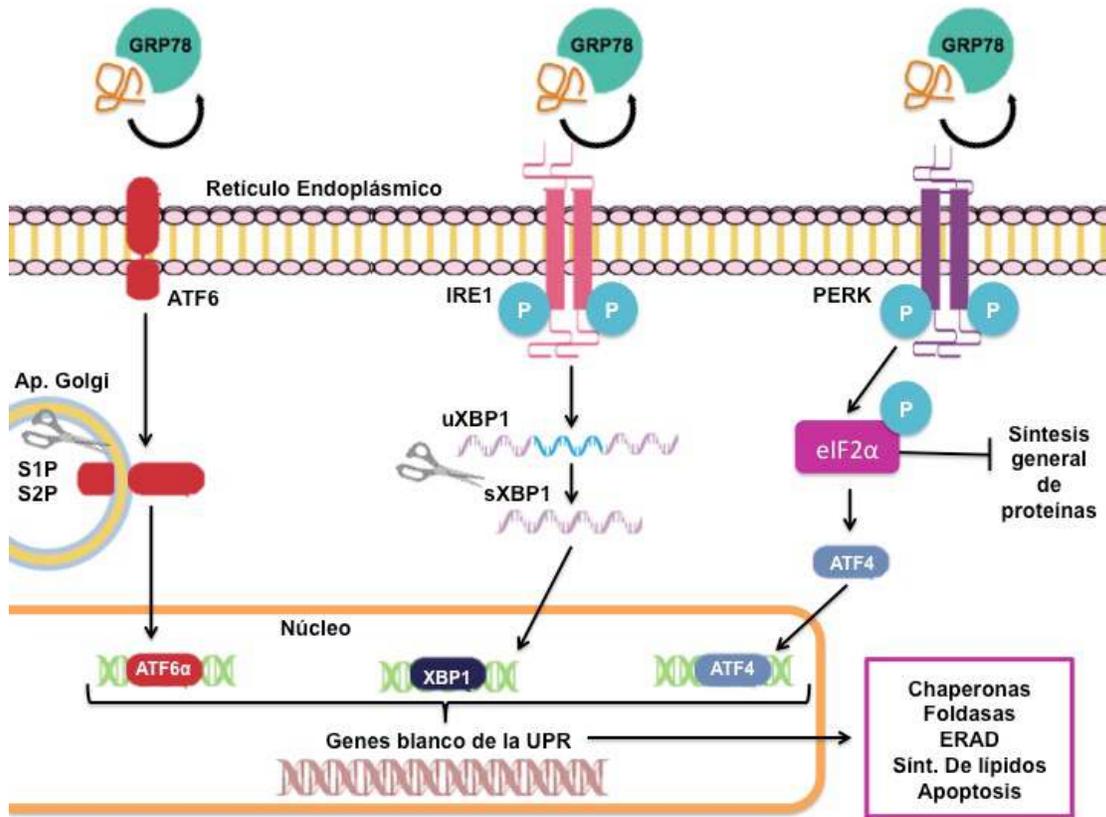
- 1) Induce la inhibición general de la traducción de proteínas para reducir la cantidad de proteínas detenidas en el RE [19], excepto por las proteínas chaperonas y foldasas del RE implicadas en el plegamiento o degradación de proteínas [20,24]. Esto es, con la finalidad de prevenir la agregación y facilitar el correcto plegamiento y transporte de las proteínas acumuladas [19].
- 2) Incrementa la degradación de proteínas mal plegadas a través de la activación de la ruta de degradación de proteínas asociada al RE (ERAD) [19]. Esta vía consiste en el marcaje de las proteínas mal plegadas por la unión covalente de cadenas de ubiquitina, que actúan como señal para la degradación de las mismas dentro de un complejo proteico denominado proteasoma [20,54,55].
- 3) Estimula la síntesis de lípidos de membrana *de novo* [19], tanto de colesterol como de ácidos grasos y triglicéridos, con la finalidad de incrementar el volumen del RE [25]. Esto genera una alteración en el metabolismo de lípidos, que provoca la síntesis acelerada de los mismos a partir de la sobreexpresión de genes maestros reguladores de lipogénesis [24], cuyo mecanismo propuesto se describirá más adelante.

En el **estrés del RE agudo**, la respuesta a las proteínas mal plegadas o no plegadas (UPR) busca restablecer el correcto funcionamiento del RE a través de la vía de respuesta adaptativa, utilizando tres rutas de señalización que actúan en paralelo y en serie [20,21] mediadas por tres sensores: 1) la proteína reclutadora de inositol 1 (IRE1), 2) el factor de activación de la transcripción 6 (ATF6), y 3) la proteína cinasa del RE semejante a PKR (PERK) [24] (**Figuras 1 y 2**).



**FIGURA 1. Esquema de la inactivación de la UPR en condiciones de homeostasis.** En condiciones normales, la UPR es reprimida por la unión de la proteína chaperona GRP78 a los dominios luminales de IRE1, ATF6 y PERK y los mantiene inactivos [20].

*GRP78= Proteína chaperona del RE regulada por glucosa 78; IRE1= Proteína reclutadora de inositol 1; ATF6= Factor activador de la transcripción 6; PERK= Proteína cinasa del retículo endoplásmico semejante a PKR*



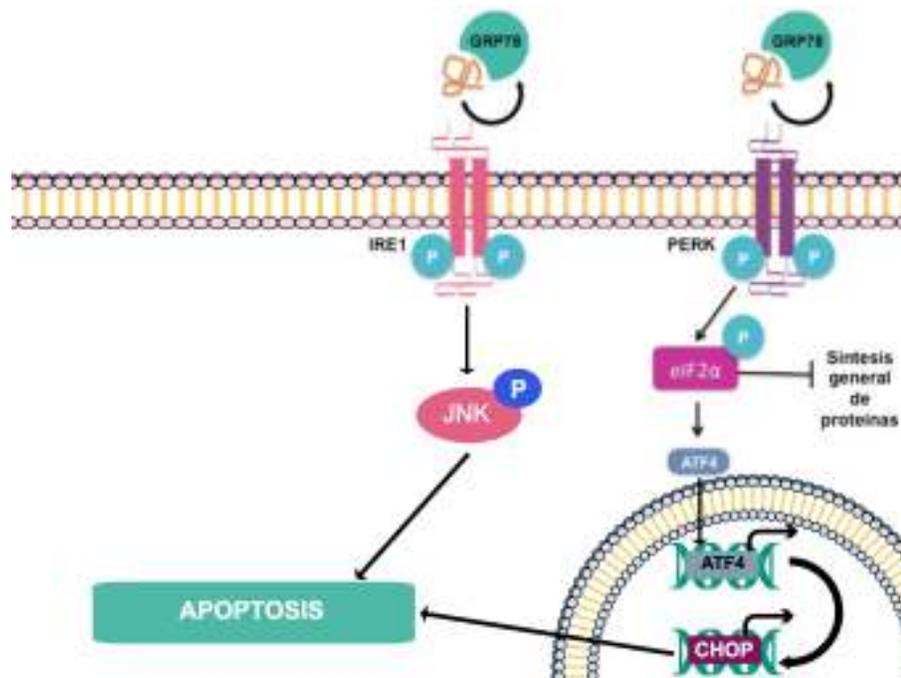
A

**FIGURA 2. Esquema de activación de la vía de respuesta adaptativa de la UPR en condiciones de estrés del RE.** Ante la acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del RE, la GRP78 se disocia de los tres sensores permitiendo la activación de la red de señalización. **A)** La separación de GRP78 permite la traslocación de ATF6 del RE al aparato de Golgi, donde sufre un corte proteolítico por las proteasas 1 y 2 (S1P y S2P) que libera un fragmento (ATF6 $\alpha$ ) que se trasloca al núcleo, donde actúa como factor de transcripción [19,21,56,57]. **B)** Tras la disociación de GRP78, la proteína transmembranal IRE1 se activa al homodimerizarse y autofosforilarse, lo que le da la capacidad de actuar como RNasa sobre el mRNA del gen de la proteína de unión a X-box1 (XBP1) (uXBP1: unspliced XBP1), permitiendo la traducción de sXBP1 (spliced XBP1), que actúa como factor de transcripción en el núcleo [19,21,56,57]. **C)** Finalmente, la ruta de la proteína transmembranal PERK, que se activa a partir de su homodimerización y autofosforilación, y, al ser una cinasa, fosforila al factor eucariótico de iniciación de la traducción eIF2 $\alpha$ , lo que provoca una inhibición generalizada de la síntesis de proteínas, excepto por algunos mRNAs asociados a la respuesta al estrés del RE, como el factor activador de la transcripción 4 (ATF4). La activación y traslocación al núcleo de los factores de transcripción ATF6 $\alpha$ , sXBP1 y ATF4, induce la expresión de genes asociados con las respuestas involucradas a la UPR, como los de chaperonas y foldasas, proteínas involucradas en la síntesis de lípidos, componentes de la red de degradación del ERAD y proteínas involucradas en la apoptosis (en caso de no resolver el estrés del RE) [19,21,56,57].

UPR= Respuesta a proteínas mal plegadas; GRP78= Proteína chaperona del RE regulada por glucosa 78; IRE1= Proteína reclutadora de inositol 1; ATF6= Factor activador de la transcripción 6; PERK= Proteína cinasa del retículo endoplásmico semejante a PKR; S1P=Proteasa de sitio 1; S2P= Proteasa de Sitio 2; XBP1= proteína de unión X-box1; eIF2 $\alpha$ = Factor eucariótico de iniciación 2 $\alpha$ ; ATF4= Factor activador de la transcripción 4

La finalidad de las tres rutas de señalización es restaurar la homeostasis del plegamiento de proteínas en el RE, aunque se ha sugerido que no son activadas simultáneamente[57]. Las rutas de ATF6 e IRE1 se activan de forma inmediata, y se atenúan con el tiempo a través de mecanismos que aún no han sido descritos. Mientras que, la ruta de PERK, se activa después de las rutas de ATF6 e IRE1, pero persiste durante el estrés de RE crónico[57].

En el caso del **estrés del RE crónico o severo**, cuando la vía de respuesta adaptativa de la UPR no logra restablecer la homeostasis en el RE, los tres sensores de la UPR activan una vía de señalización alterna, que dirige a la célula hacia la apoptosis con el fin de eliminar a las células dañadas de forma irreversible. Esta vía no-adaptativa se encuentra mediada de forma esencial por dos proteínas: 1) La proteína de unión al potenciador CCAAT: CHOP; y 2) La cinasa de c-Jun N-terminal: JNK [58] (**FIGURA 3**). El mecanismo que modula la regulación diferencial entre la respuesta adaptativa y la de apoptosis no se ha descrito aún [59].



**FIGURA 3.** Esquema de activación de la vía de respuesta terminal de la UPR en condiciones de estrés del RE prolongado y severo. Ante el estrés del RE crónico y severo, se activa la ruta de la UPR “terminal” o pro-apoptótica. La activación de PERK-eIF2α induce al factor de transcripción ATF4, que tiene como uno de sus blancos el mRNA que codifica para la proteína CHOP, uno de los principales factores de transcripción proapoptóticos en la regulación celular. Así mismo, IRE1 actúa como cinasa de la proteína JNK, y la activa desencadenando diversas cascadas de señalización proapoptóticas como consecuencia.

UPR= Respuesta a proteínas mal plegadas; IRE1= Proteína reclutadora de inositol 1; PERK= Proteína cinasa del retículo endoplásmico semejante a PKR; S1P=Proteasa de sitio 1; eIF2α= Factor eucariótico de iniciación 2α; ATF4= Factor activador de la transcripción 4; CHOP= Proteína homóloga del potenciador de la proteína de unión a CCAAT; JNK= Cinasa c-Jun N-terminal

### **6.3.4 EL ESTRÉS DEL RE EN EL METABOLISMO DE LÍPIDOS**

El correcto funcionamiento del RE y la vía de activación de la UPR tienen implicaciones importantes en el metabolismo. En diversos estudios se ha demostrado el vínculo a través del cuál el estrés del RE conduce a alteraciones en el metabolismo de lípidos que se han vinculado con el desarrollo de enfermedades metabólicas crónicas, como la obesidad [50,60,61], la esteatosis hepática [62–64] y la lipogénesis renal [16].

Se ha demostrado que las principales asociaciones que vinculan al estrés del RE con el metabolismo de lípidos son a través de la expresión de los SREBPs y sus blancos, C/EBP $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , [25]

#### **6.3.4.1 SREBPs**

Como se mencionó previamente, los SREBPs son una familia de factores de transcripción de genes lipogénicos que presentan 3 isoformas: SREBP-1a, SREBP-1c y SREBP-2 [65,66].

Los SREBPs son sintetizados como precursores inactivos que se anclan en la membrana del RE [65,66]. Para poder activarse, los SREBPs deben pasar por dos cortes proteolíticos dirigidos por las proteasas de sitio 1 y 2 (S1P y S2P) [65,66], que liberan el dominio NH<sub>2</sub> terminal de estos precursores, y les permiten su traslocación al núcleo. En el núcleo, los SREBPs actúan como factores de transcripción de genes lipogénicos, uniéndose a secuencias de potenciadores localizadas en los promotores de estos genes, denominadas como SREs (sterol regulatory elements, por sus siglas en inglés) [65,66].

Se ha demostrado que en la ruta de señalización de PERK, la fosforilación de eIF2 $\alpha$  regula la traducción de S1P y por lo tanto, incrementa la activación de los SREBPs [25].

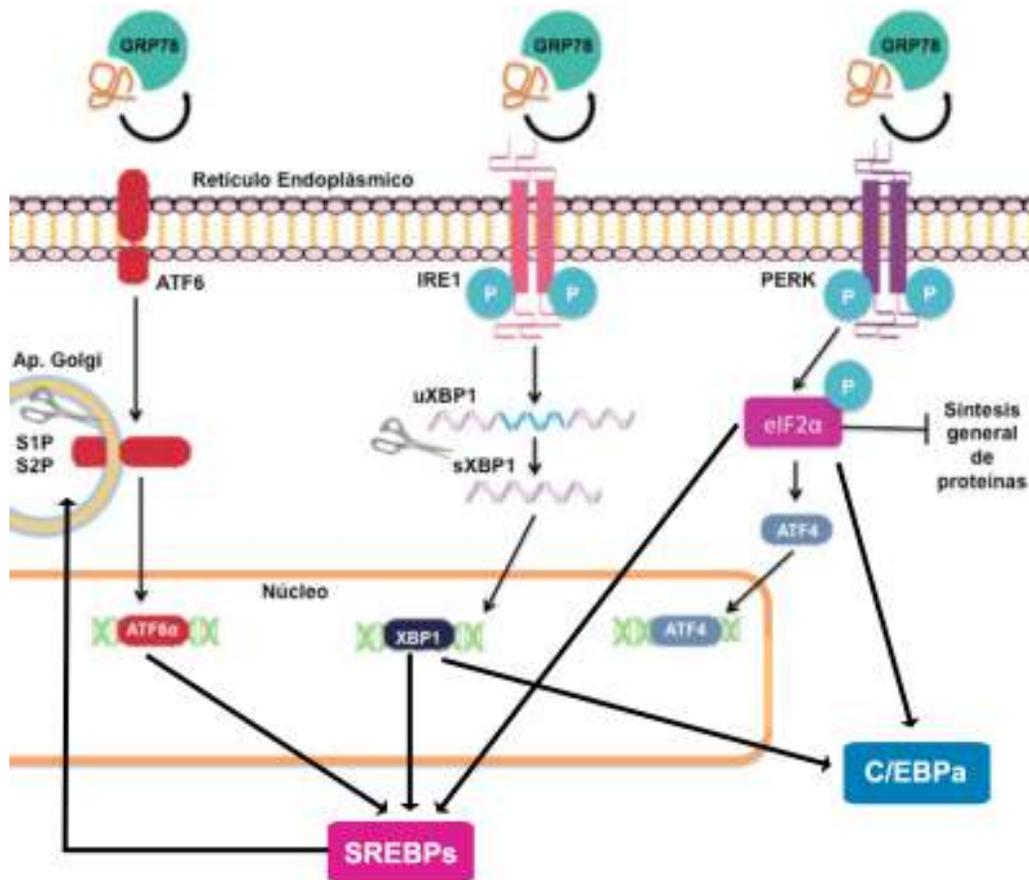
Por otro lado, como se menciona en párrafos anteriores, S1P y S2P, son las mismas proteasas que permiten la activación y liberación de ATF6 para su traslocación al núcleo, resultando en la activación de la respuesta de la UPR asociada a este factor de transcripción [67,68]. Este proceso se ha propuesto como un vínculo entre la asociación de la activación de la ruta de ATF6 con la activación de los SREBPs.

Así mismo, se sabe que ATF6 $\alpha$  y XBP1s (activado a través de la ruta de IRE1) poseen una especificidad de unión a DNA muy similar, y pueden heterodimerizarse entre sí. Esto sugiere que ambos comparten la activación de determinados genes blanco [25]. Esta asociación resulta consistente con los datos presentados por Lee et al. en 2008 [69], que han demostrado que la expresión de XBP1, también resulta en la activación de diversos genes lipogénicos.

#### **6.3.4.2 C/EBP $\alpha$**

El C/EBP $\alpha$  es un factor de transcripción involucrado en la activación de genes asociados con dos principales procesos celulares vinculados al metabolismo de lípidos: la adipogénesis (proceso de diferenciación de adipocitos) [70] y la lipogénesis *de novo* [71].

Durante la activación de la UPR en el estrés del RE, tanto la ruta de PERK como la ruta de IRE1, están implicadas en el incremento de la expresión de C/EBP $\alpha$  [25]. Por un lado, se ha demostrado que la fosforilación de eIF2 $\alpha$  en la ruta de PERK, permite la traducción preferencial de ambas proteínas [25]. Por otro lado, también se sabe que sXBP1 transcrito por la ruta de IRE1, también actúa como factor de transcripción para la expresión de esta proteína [25].



**FIGURA 4.** Esquema de la regulación del metabolismo de lípidos ante la activación de la UPR en condiciones de estrés del RE. La regulación del metabolismo de lípidos por la activación de la UPR se da principalmente a través de los SREBPs y C/EBP $\alpha$ . Se ha demostrado que los factores de transcripción sXBP-1 y ATF6 $\alpha$  inducen la expresión de los SREBPs, que posteriormente son procesados en el aparato de Golgi por las mismas proteasas que cortan a ATF6. Por otro lado, se sabe que la fosforilación de eIF2 $\alpha$  incrementa la expresión de C/EBP $\alpha$ , al igual que el factor de transcripción activo sXBP1.

*UPR= Respuesta a proteínas mal plegadas; GRP78= Proteína chaperona del RE regulada por glucosa 78; IRE1= Proteína reclutadora de inositol 1; ATF6= Factor activador de la transcripción 6; PERK= Proteína cinasa del retículo endoplásmico semejante a PKR; S1P=Proteasa de sitio 1; S2P= Proteasa de Sitio 2; XBP1= proteína de unión X-box1; eIF2 $\alpha$ = Factor eucariótico de iniciación 2 $\alpha$ ; ATF4= Factor activador de la transcripción 4; SREBPs= Proteínas de unión a los elementos reguladores de esteroides; C/EBP $\alpha$ = Proteína potenciadora de unión a CCAAT  $\alpha$ .*

En el riñón, se ha demostrado que el estrés del RE inducido de forma farmacológica con tunicamicina provoca un aumento en la concentración de triglicéridos en el tejido renal, a través del incremento en la expresión de SREBP-1, FAS y ACC. También se relacionó, que la acumulación de lípidos inducida por el estrés del RE esta asociada con alteraciones renales como la disminución del diámetro glomerular y el espacio urinario, así como alteraciones mitocondriales en los podocitos [16].

A través de este mecanismo, se ha propuesto que el estrés de RE propicia el incremento en la acumulación de lípidos ectópicos en el riñón, que es un mecanismo mediador del daño renal [16]. Ahora, en diversos estudios se ha demostrado que la obesidad induce la activación del estrés del RE y la UPR [50,60,61], y ese es el vínculo que se propone entre la asociación de la obesidad y la lipogénesis renal para la fundamentación de este proyecto.

### **6.3.5 EL ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLÁSMICO EN LA OBESIDAD**

Hay diversas condiciones presentes durante el establecimiento de la obesidad que la han asociado con la activación del estrés del RE como la disminución de la disponibilidad de nutrientes [19], la concentración excesiva de lípidos circulantes [19], y la activación de rutas de señalización de estrés celular e inflamación [17,50].

El mecanismo exacto a través del cual la obesidad activa el estrés del RE aún no se ha descrito. Se ha propuesto que la obesidad provoca la acumulación de colesterol libre y ácidos grasos saturados en la membrana del RE, y esto inhibe la actividad de la ATPasa de calcio del retículo sarco/endoplásmico (SERCA2) y provoca una pérdida de fluidez en la membrana alterando la concentración de calcio y provocando la acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del RE [72–74]. Aunque se cree que no es el único mecanismo involucrado en la activación de la UPR durante la obesidad.

Sin embargo, a pesar de que el mecanismo exacto no se descrito, se ha demostrado en modelos murinos de obesidad, tanto por dieta alta en grasa como por modificaciones genéticas (*ob/ob*), que la obesidad es un estímulo crónico para el estrés de RE en varios tejidos, como el tejido adiposo, el riñón y el hígado [50,60,75,76]. En dichos estudios se publicó que la obesidad provoca la inactivación del factor de iniciación eIF2 $\alpha$  (p- eIF2 $\alpha$ ) [50], la activación de las proteínas transmembranales PERK involucrada en la UPR (p-PERK) [50,60,76] e IRE1 [76], la activación del factor proapoptótico JNK (p-JNK) [50,60,76], la expresión de la expresión de sXBP1 [50] y el incremento en la expresión del mRNA de la proteína chaperona GRP78 [50].

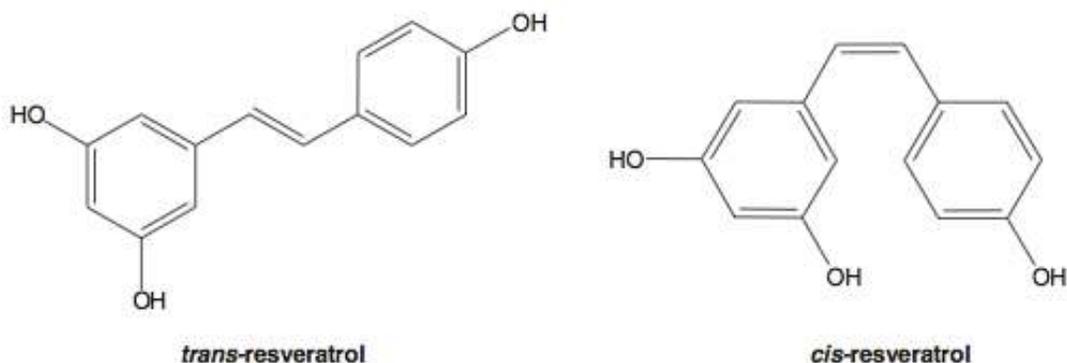
Por lo tanto, se sabe que la obesidad activa al estrés del RE, y, la activación de la UPR está asociada con la lipogénesis *de novo* en el riñón, que es un importante mediador de la enfermedad renal. Es por ésto que es importante encontrar algún compuesto modulador de la respuesta al estrés del RE y por lo tanto de la lipogénesis renal durante el establecimiento de la obesidad. Para ello, se propone observar el efecto del resveratrol, un compuesto bioactivo que ha demostrado tener diversas regulaciones metabólicas benéficas.

## 6.4 RESVERATROL

### 6.4.1 ESTRUCTURA, CARACTERÍSTICAS Y GENERALIDADES

El resveratrol (3, 5, 4'-trans-trihidroxiestilbeno) es un polifenol natural miembro de la familia de los estilbenos [1,77]. Su estructura base consiste en la unión de dos anillos fenólicos por un doble enlace estireno que forma el 3,5,4'-trihidroxiestilbeno, con un peso molecular de 228.25 g/mol [1,77].

El doble enlace estireno que el resveratrol posee en su estructura, permite la existencia de dos isoformas en este compuesto; cis-resveratrol y trans-resveratrol [1] (**FIGURA 3**). Siendo el isómero trans el más estable desde el punto de vista estérico [1].



**FIGURA 5.** Estructura química del cis-resveratrol y trans-resveratrol (Imagen de Gambini et al, 2013 [1])

El resveratrol pertenece al grupo de las fitoalexinas [1,78], sustancias químicas producidas como consecuencia de un mecanismo de resistencia a condiciones adversas, caracterizadas por ser capaces de inhibir el progreso de ciertas infecciones fúngicas al inactivar las ATPasas de ciertos hongos e inducir la disociación de algunas chaperonas de su citoesqueleto [1].

Hay diversos alimentos en la dieta humana en los que se encuentra presente el resveratrol [1], tales como: diferentes tipos de bayas, arándanos (*Vaccinum spp.*), moras (*Vaccinum spp.*), cacahuate (*Arachis hypogaea*), pistache (*Pistaciaceae*), uvas (*Vitaciaceae*), entre otros [1,79]. De los alimentos mencionados, las uvas de viñedo *Vitis vinifera* presentan el mayor contenido de resveratrol, por lo que el vino tinto es una de las fuentes principales de resveratrol en la dieta [1,78], ya que además, el alcohol producido durante la fermentación del vino favorece su solubilidad y extracción [1].

El resveratrol es un compuesto bioactivo que presenta diversos efectos benéficos para la salud a través de la regulación de rutas de señalización metabólica, como las que se presentan a continuación.

#### **6.4.2 EFECTOS BENÉFICOS DEL RESVERATROL EN EL METABOLISMO DE LÍPIDOS Y LA ACTIVACIÓN DEL ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO**

El consumo de resveratrol se ha asociado con diversos efectos metabólicos positivos, tanto en modelos murinos como en humanos que padecen obesidad, como por ejemplo, la disminución en la ganancia de peso corporal [80], la mejora en la sensibilidad a insulina y en el metabolismo de carbohidratos [81], el aumento en la velocidad de oxidación lipídica y la disminución en la acumulación de lípidos [82], tanto en tejido adiposo como en órganos periféricos [83–85]

Se ha demostrado que el mecanismo molecular de acción del resveratrol es esencialmente a través de la activación de dos principales sensores metabólicos: 1) la Sirtuina 1 (SIRT1) y 2) la proteína cinasa dependiente de AMP (AMPK) [26,27]. La activación metabólica de estos dos sensores y de sus blancos, le confieren al resveratrol diversas propiedades terapéuticas. Para fines de este estudio, la revisión de los mecanismos descritos se van a centrar en la regulación del metabolismo de lípidos y en la regulación de los marcadores de estrés del RE.

##### **6.4.2.1 ACTIVACIÓN DE SIRT1**

La SIRT1 es una desacetilasa que actúa de forma dependiente de la concentración de NAD<sup>+</sup>, un cofactor de diversas reacciones metabólicas, lo que la convierte en un sensor que se activa de acuerdo con el estado metabólico de la célula[29]. Se ha descrito que los principales blancos de la activación de esta enzima se encuentran implicados en la respiración mitocondrial, el metabolismo de carbohidratos (y la sensibilidad a la insulina) y el metabolismo de lípidos [27–29]. La activación de SIRT1 es un mediador crítico de la regulación metabólica en la restricción calórica y de sus beneficios a nivel molecular [86]; y se ha propuesto al resveratrol como el activador alostérico más potente de esta enzima, a partir de la formación de un complejo estable de enzima-sustrato en el dominio N-terminal de la SIRT1 [86].

Uno de los blancos metabólicos de la activación de la SIRT1 es la desacetilación de la proteína coactivadora 1 $\alpha$  del receptor activado por el proliferador de peroxisomas: PGC1- $\alpha$  [27,28]. El PGC1- $\alpha$  es un factor de transcripción maestro de la biogénesis mitocondrial, que induce la transcripción de genes de diversos receptores nucleares y otros factores de transcripción que regulan la expresión de genes mitocondriales [27,28,87]. La suplementación crónica con resveratrol en modelos murinos con obesidad inducida por dieta, provoca el incremento del contenido mitocondrial en tejidos metabólicamente activos (como el músculo y el tejido adiposo pardo [82]), y esto conlleva a la aceleración del gasto energético, el incremento de la respiración mitocondrial y la oxidación lipídica [27,28].

Por otro lado, también se ha demostrado en modelos *in vitro* de células humanas de riñón y de cáncer cervical (HK-2 y HeLa), que la activación de la SIRT1 disminuye la expresión de diversos marcadores de estrés del RE ante la inducción farmacológica del mismo por tunicamicina, como GRP78 [33], p-eIF2 $\alpha$  [33], ATF4 [32] y CHOP [33]. Lo que sugiere que el resveratrol, al ser un activador de esta enzima, podría tener un efecto similar *in vivo* sobre los marcadores de estrés del RE, y sobre sus rutas blanco, dentro de la que se encuentra la síntesis de lípidos *de novo*.

#### 6.4.2.2 ACTIVACIÓN DE AMPK

El AMPK es un sensor nutrimental que se activa por medio de la relación AMP/ATP, por lo que, al igual que la SIRT1, refleja el estado energético de la célula [27,88]. Este sensor metabólico tiene un papel importante en mantener el balance entre las rutas anabólicas y catabólicas, principalmente en el metabolismo de carbohidratos y de lípidos, para mantener la homeostasis bajo condiciones de estrés metabólico [27,28,88]: disminuye las rutas que consumen energía, como la síntesis de lípidos y de proteínas, y activa las rutas que producen energía, como la oxidación de lípidos y la glucólisis [27].

El resveratrol es uno de los activadores más conocidos del AMPK, y se ha probado que su mecanismo de activación es a través de la inhibición de, complejo V mitocondrial (F1 F0 ATPasa/ATP sintasa), por lo que bloquea la producción de ATP mitocondrial e incrementa los niveles de AMP [88,89]. La elevación en la relación AMP/ATP intracelular resulta en la inhibición competitiva de la fosfodiesterasa específica del cAMP (PDE-4) que eleva el nivel de cAMP, y esto provoca la activación de un factor de intercambio de nucleótidos de guanina regulado por cAMP (Epac1) y la proteína cinasa A dependiente de cAMP (PKA), lo cual resulta en la fosforilación del AMPK y provoca su activación enzimática [90]

Dos de los blancos metabólicos de la activación de AMPK, son los SREBPs, tanto SREBP-1c [30] como SREBP-2 [30,31], que, como se mencionó en subtemas previos, son los reguladores más importantes de la síntesis *de novo* de triglicéridos y colesterol. La proteína AMPK, como su nombre lo indica, es una cinasa capaz de interactuar y fosforilar directamente a sus proteínas blanco, y se ha demostrado, que la fosforilación de SREBP-1c y SREBP-2 inhibe el procesamiento proteolítico del mismo y su traslocación al núcleo, y por lo tanto, inhibe la expresión de sus genes blanco y reduce la acumulación de lípidos y la síntesis de lípidos *de novo*, tanto de triglicéridos [30] como de colesterol [30,31]. Por ello se ha utilizado al resveratrol como un compuesto protector ante el desarrollo de esteatosis hepática [31], hiperlipidemia [30,31], adipogénesis y aterosclerosis [30] en modelos murinos de obesidad inducida por dieta.

Por otra parte, también se ha demostrado que la activación de AMPK en modelos *in vitro* de células humanas de riñón y de músculo liso vascular (HK-2 y VSMC) inhibe la expresión de diversos marcadores de estrés del RE ante la inducción

farmacológica con tunicamicina, como: XBP1 [34], p-eIF2 $\alpha$  [34,35] y GRP78 [34,35]. Por lo que se ha propuesto que los compuestos activadores de la proteína AMPK podrían actuar como moduladores del estrés del RE, siendo el resveratrol uno de ellos [22].

Se ha descrito que el resveratrol activa tanto la vía de señalización de la activación del AMPK como la vía de la SIRT1 de forma independiente, sin embargo, se ha propuesto que la activación de ambas rutas metabólicas correlacionan de alguna forma [91]. Se ha descrito que la activación del AMPK se da antes que la activación de la SIRT1, lo que podría sugerir que la activación del AMPK es la que dirige la activación de la SIRT1 en modelos experimentales *in vivo* e *in vitro* [92,93]. El mecanismo exacto a partir del cual ocurre esta regulación aún no está claro, pero se ha sugerido que la activación del AMPK incrementa la concentración de NAD<sup>+</sup> a partir de la oxidación de lípidos después de algunas horas, y, como se mencionó previamente, el incremento de la disponibilidad de NAD<sup>+</sup> conlleva a la activación de la SIRT1 [92,93].

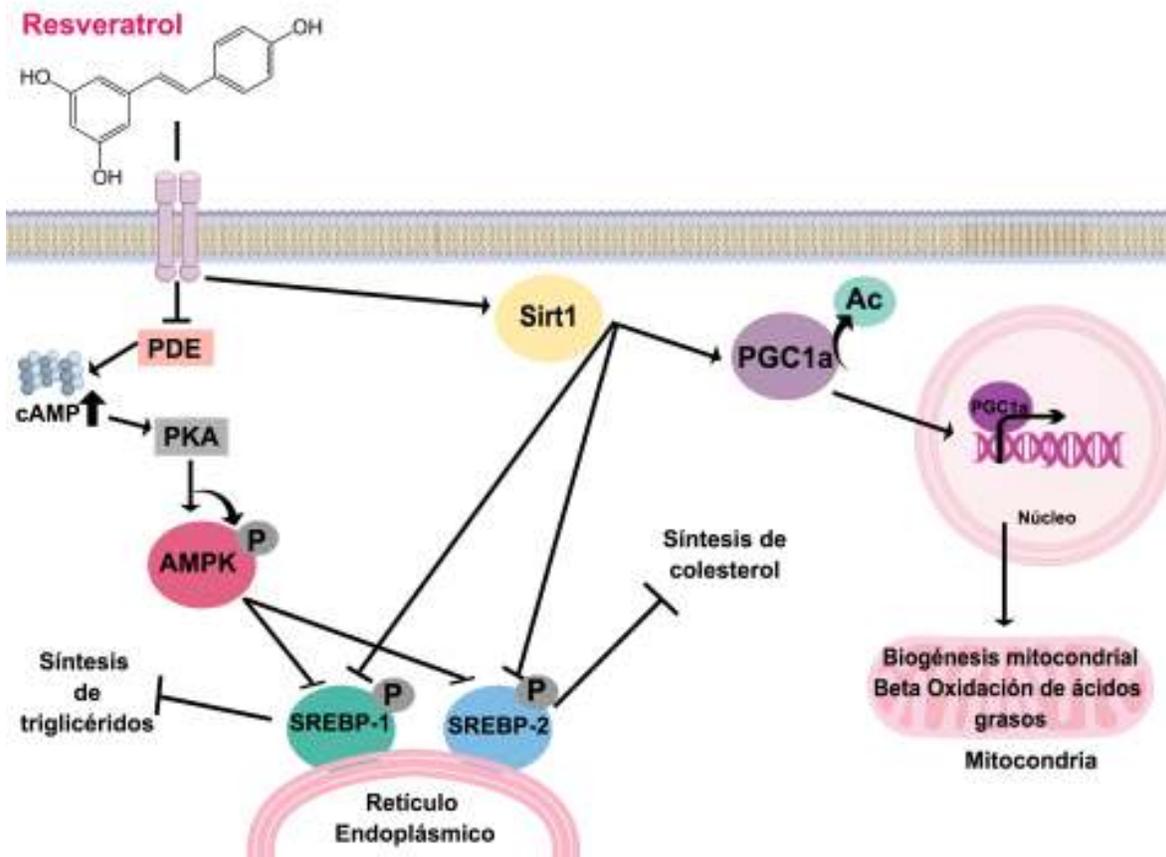
En la **FIGURA 6** se ejemplifica a manera de esquema la regulación propuesta del resveratrol sobre el metabolismo de lípidos, que contribuye en la justificación del planteamiento de este proyecto. Y, en la **FIGURA 7** se ejemplifica la regulación propuesta del resveratrol sobre el estrés del RE.

De acuerdo con los efectos que han sido descritos acerca del resveratrol en el metabolismo de lípidos y en el estrés del RE, en este proyecto, se propone al resveratrol como un posible compuesto modulador de la respuesta al estrés del RE, la acumulación de lípidos y la síntesis *de novo* de triglicéridos y colesterol en el riñón en un modelo murino de obesidad inducida por dieta.

#### **6.4.3 DOSIS DE RESVERATROL**

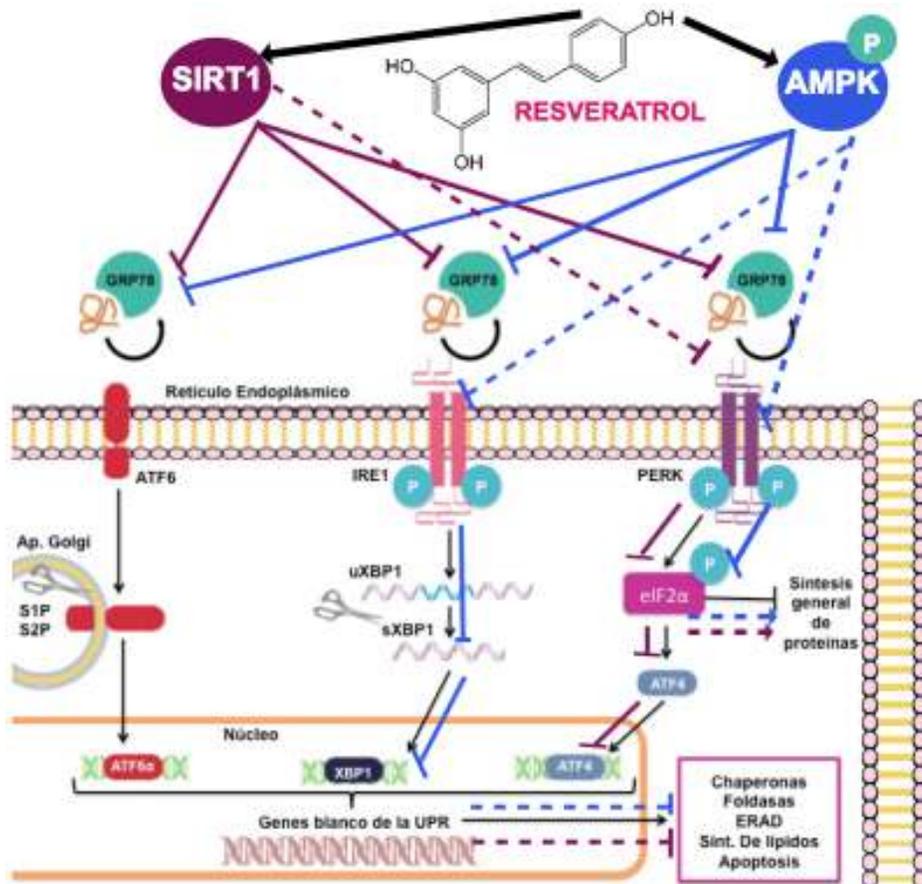
La suplementación de resveratrol se ha evaluado en dosis desde 4.9 mg/kg p.c./día [94] y hasta 4 g/kg pc/día [95] en modelos murinos. La dosis utilizada para la suplementación de resveratrol en la dieta de este estudio fue de 200 mg/kg pc/d, considerada como una dosis moderada, que ha demostrado tener efectos benéficos a nivel metabólico, ya que Lagouge y colaboradores [82], así como Robb y colaboradores [96], han demostrado que el resveratrol activa la ruta de AMPK/SIRT1 a partir de ésta dosis, por lo que se propone que utilizando esta dosis sea posible tener un efecto significativo en el metabolismo lipídico en estudio.

Por otro lado, se sabe que la absorción del resveratrol por su consumo mediante la vía oral es del 75%, sin embargo, la biodisponibilidad de éste compuesto es del 1%, por lo que para obtener efectos significativos las dosis empleadas en general se utilizan entre moderadas y altas.



**FIGURA 6.** Regulación molecular del resveratrol en el metabolismo de lípidos a partir de la activación de SIRT1 y AMPK. Se ha descrito que el resveratrol activa esencialmente a dos sensores metabólicos: SIRT1 y AMPK, y ambos han sido descritos como importantes mediadores del metabolismo de lípidos. Por un lado, se ha demostrado que el resveratrol, al entrar a la célula, inhibe competitivamente a la fosfodiesterasa 4 (PDE-4) que eleva la concentración de cAMP y genera la activación de la proteína cinasa A dependiente de cAMPK (PKA), que induce la fosforilación del sensor energético AMPK. El AMPK es una cinasa, por lo que fosforila e inhibe a los reguladores maestros de la síntesis de lípidos SREBP-1 y SREBP-2, lo que conlleva a la inhibición de la síntesis de triglicéridos y colesterol. Por otro lado, la SIRT1, es una desacetilasa que desacetila y activa al factor de transcripción PGC1- $\alpha$ , que está implicado en la activación de genes involucrados en la biogénesis mitocondrial y la beta oxidación de ácidos grasos. Además se sabe que la activación de la SIRT1 también inhibe la expresión de los factores de transcripción SREBP-1 y SREBP-2 aunque el mecanismo exacto aún no se ha descrito.

*PDE-4= Fosfodiesterasa 5; cAMP= Adenosín Monofosfato cíclico; PKA= Proteína cinasa A dependiente de cAMP; SIRT1= Sirtuina 1; AMPK= Proteína cinasa activada por AMP; SREBP-1 y 2= Proteínas de unión a los elementos reguladores de esteroides 1 y 2; PGC-1 $\alpha$ = Coactivador 1 $\alpha$  del proliferador de peroxisoma-receptor activado  $\gamma$*



**FIGURA 7.** Regulación metabólica del resveratrol en el estrés del RE a partir de la activación de SIRT1 y AMPK. La regulación del resveratrol en el estrés del RE no ha sido descrita todavía, sin embargo, hay algunos estudios que se han realizado estudiando el efecto de sus proteínas blanco en los principales marcadores del estrés del RE. Se ha descrito que la activación del AMPK inhibe la expresión de GRP78 y sXBP1, así como la fosforilación de eIF2α. Por otro lado, la SIRT1 ha demostrado inhibir la expresión de GRP78 y de ATF4.

SIRT1= Sirtuina 1; AMPK= Proteína cinasa activada por AMP; GRP78= Proteína chaperona del RE regulada por glucosa 78; sXBP1= Proteína de unión a X-box 1; eIF2 cortada; eIF2α= Factor eucariótico de iniciación de la traducción 2α; ATF4= Factor activador de la transcripción 4

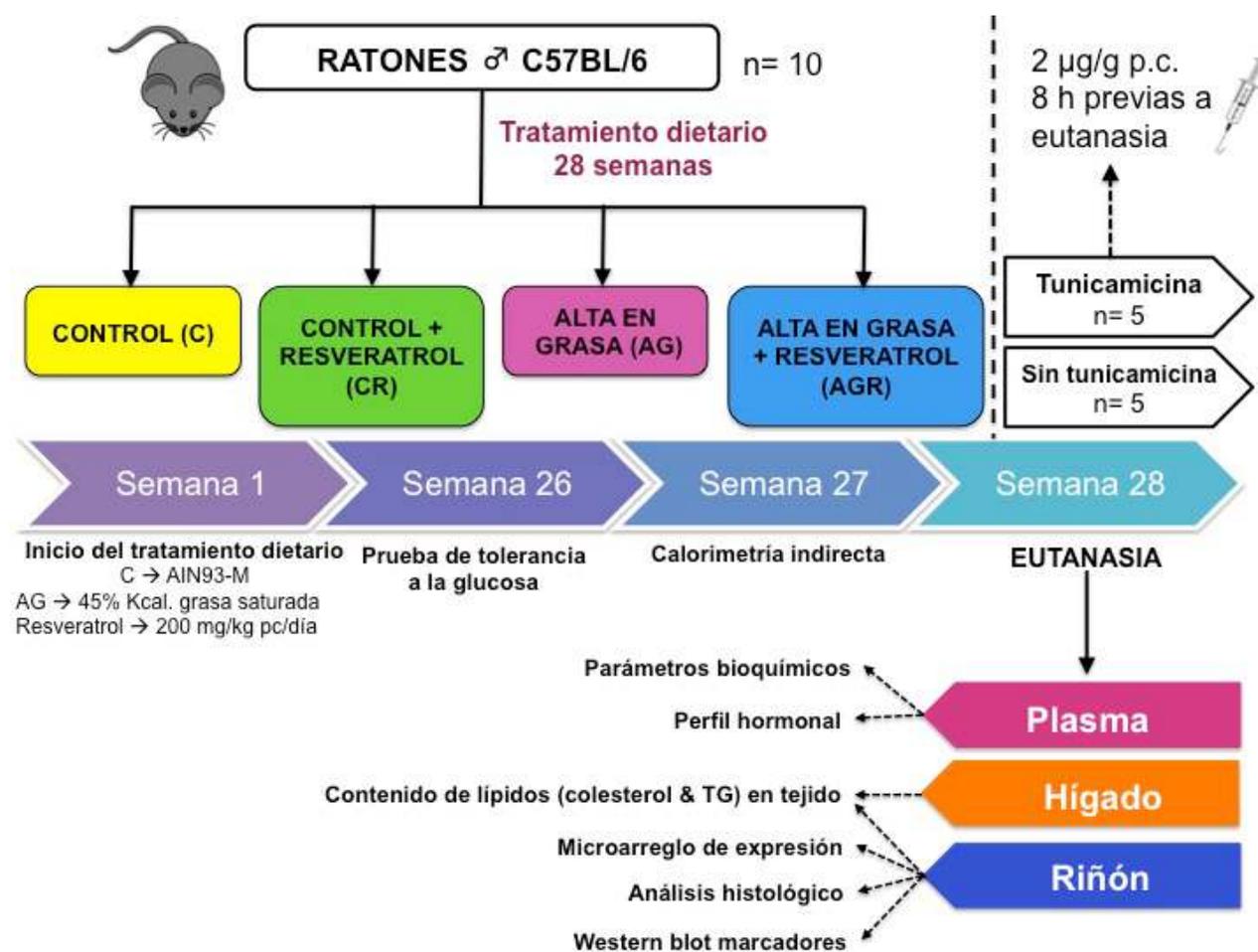
## 7. METODOLOGÍA

### 7.1 Reactivos y equipos

- Caseína (Harlan, Indianápolis, Indiana, EUA)
- Cistina (Sigma, St Louis, EUA)
- Aceite de soya (Nutrioli, Ragasa Industrias, Querétaro, México)
- Manteca (Inca, ACH Foods, Ciudad de México, México)
- Mezcla de Vitaminas (Sigma, St Louis, EUA)
- Colina (Sigma, St Louis, EUA)
- Minerales (Sigma, St Louis, EUA)
- Tunicamicina (Sigma, St Louis, EUA)
- *Trans*-resveratrol liofilizado con 99% de pureza (Mega Resveratrol, Danbury, EUA)
- Estuche para determinación de glucosa, colesterol total, colesterol de baja densidad (LDL), colesterol de alta densidad (HDL), triglicéridos, actividad de transaminasas (AST y ALT), creatinina y albúmina (Roche, Basilea, Suiza).
- Equipo Cobas c111 para determinación de parámetros bioquímicos (Roche, Basilea, Suiza).
- Estuches comerciales de ELISA para insulina, leptina y adiponectina (ALPCO, Boston, USA)
- Glucómetro de tiras reactivas (FreeStyle Optium, Abbott, Witney, Reino Unido; Tiras reactivas FreeStyle Optium para prueba de glucosa en sangre, Abbott, Reino Unido).
- Calorímetro de circuito abierto computadorizado (Oxymax, Comprehensive Lab Animal Monitoring System, Columbus Instruments, Columbus, Ohio, EUA).
- Estuches para determinación de triglicéridos y colesterol: Triglyceride FS\* y Cholesterol FS\* (DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim, Alemania).
- Microscopio óptico asistido por computadora (DMLS, Leica, Milton Keynes, Cambridge, Inglaterra) tipo de cámara Olympus DP70
- Solución para extracción de tejido (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA)
- Estuche comercial RNeasy Fibrous Tissue (QIAGEN, Valencia, California, EUA).
- Equipo NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies Inc.)
- Estuche de conversión RT<sup>2</sup> First Strand (QIAGEN, Valencia, California, EUA)
- Estuche para amplificación RT2 SYBR Green qPCR MasterMix (QIAGEN, Valencia, California, EUA)
- Instrumento ABI PRISM 7000 Sequence Detection System No. De serie 278870331 (Applied Biosystems, Foster City, California, EUA)
- Software QuantStudio Flex Real-Time PCR System v1.3 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA)

- Microarreglo comercial de expresión de genes asociados a la UPR en ratón (RT2 Profiler PCR Array Mouse Unfolded Protein Response, QIAGEN, Valencia, California, EUA)
- Tabletas comerciales de inhibidores de proteasas (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania)
- Reactivos para ensayo de proteína DC (Bio-Rad, Hercules California, EUA)
- Geles prehechos de poliacrilamida con gradiente de concentración de 4 a 20% ó de concentración fija al 10% (Bio-Rad, Hercules California, EUA)
- Sevofluorano (Baxter, Oklahoma, EUA)
- Rojo oleoso en polvo (Sigma, St Louis, MO, EUA)
- Hematoxilina de Harris (Sigma, St Louis, MO, EUA)
- Estuche de ácido peryódico de Schiff (Sigma, St Louis, MO, EUA)
- Leche descremada para bloqueo (Bio-Rad Hercules, California)
- Reactivo de rebelado Immobilon Western Chemiluminiscent HRP substrate (Millipore, Billerica, MA, EUA)
- Sistema electrónico de imagen ChemiDoc MP (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA).
- Anticuerpos y concentraciones empleadas:
  - Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, EUA)**
  - GRP78 sc-13968 1:1000
  - CHOP (GADD 153) sc-7351 1:1000
  - AMPK sc-74461 1:1000
  - p-AMPK sc-33524 1:500
  - $\beta$ -Actina sc-1616 1:1000
  - Anti-conejo, -cabra o -ratón 1:3000
- Abcam (Cambridge, Massachusetts, EUA)**
- SREBP-1 ab3259 1:1000
- SREBP-2 ab30682 1:1000
- PGC1- $\alpha$  ab54481 1:800

## 7.2 Resumen del diseño experimental y metodología



**FIGURA 8.** Diagrama de diseño experimental y metodología utilizada.

## 7.3 Animales

Como modelo de estudio, se utilizaron ratones macho C57BL/6 de entre 5 y 6 semanas de edad de aproximadamente 20 g procedentes del bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán. Los animales se mantuvieron en microaisladores dentro de un cuarto de temperatura controlada (22°C) con periodos alternados de luz-oscuridad de 12h y tuvieron acceso *ad libitum* de agua y alimento.

El protocolo animal fue aprobado por el Comité de Ética para la Investigación con Animales Experimentales del INCMN, SZ.

## 7.4 Diseño experimental

Los 40 animales estudiados se dividieron de forma aleatoria en tres grupos con diferentes tratamientos dietarios (Control + Resveratrol, Alta en grasa y Alta en

grasa + Resveratrol) más un grupo control. Cada grupo estuvo conformado por 10 animales (n=10) alimentados por 28 semanas. El consumo de alimento se determinó todos los días del tratamiento y el peso corporal se evaluó semanalmente.

Para la finalidad de este proyecto, se empleó un modelo de inducción de estrés del RE de forma crónica-fisiológica (modelo de obesidad inducida por dieta) y un modelo de inducción de estrés del RE de forma farmacológica aguda (por medio de tunicamicina). Para la evaluación del efecto de la inducción farmacológica del RE, a la mitad de los animales en cada uno de los tratamientos dietarios (n=5) se les administró una dosis única de tunicamicina vía intraperitoneal 8 horas previas a la eutanasia [16]. Para la preparación del fármaco, se diluyeron 100 mg/ml de tunicamicina en una solución de dextrosa 150 mM, y la dosis administrada fue de 1 g/kg pc.

Los grupos experimentales finales fueron los siguientes: grupo con dieta control (C), grupo con dieta control administrado con tunicamicina (C+T), grupo con dieta control suplementado con resveratrol (CR), grupo con dieta control suplementado con resveratrol y administrado con tunicamicina (CR+T), grupo con dieta alta en grasa (AG), grupo con dieta alta en grasa administrado con tunicamicina (AG+T), grupo con dieta alta en grasa suplementado con resveratrol (AGR), y grupo con dieta alta en grasa suplementado con resveratrol y administrado con tunicamicina (AGR+T) (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Diseño experimental de los tratamientos dietarios

	Sin tunicamicina		Con tunicamicina	
	Sin Resveratrol	Con Resveratrol	Sin Resveratrol	Con Resveratrol
<b>Dieta Control</b>	<b>C</b>	<b>CR</b>	<b>C+T</b>	<b>CR+T</b>
<b>Dieta Alta en grasa</b>	<b>AG</b>	<b>AGR</b>	<b>AG+T</b>	<b>AGR+T</b>

Los ratones fueron privados de alimento ocho horas previas a la eutanasia, y anestesiados con sevoflurano. La muestra de sangre fue recolectada del ventrículo izquierdo y se centrifugó a 10,000 rpm (26880 g) por 10 min a 4 °C, el plasma resultante se almacenó a -70 °C para su análisis.

Los riñones se disectaron, se pesaron, se lavaron en solución salina al 0.9% y se cortaron en forma longitudinal. Los segmentos de riñón se almacenaron en amortiguador de formalina al 10% para análisis histológico posterior ó se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70 °C.

## 7.5 Dietas

La dieta control (C) siguió la recomendación AIN93-M del Instituto Americano de Nutrición (American Institute of Nutrition, AIN) [97], para la composición estimada de nutrimentos necesarios para el mantenimiento de peso de roedores adultos. Consistió en cantidades balanceadas de proteínas, carbohidratos y grasas en una proporción de 31.22%/ 58.35%/ 10.42% de las calorías totales respectivamente.

La dieta control suplementada con resveratrol (CR) siguió la recomendación de la dieta AIN93-M y se adicionó *trans*-resveratrol liofilizado con 99% de pureza mezclado con el alimento. La dosis administrada de resveratrol fue de 200 mg/kg pc/d y se calculó de acuerdo al promedio de consumo de alimento diario de los animales y al promedio de peso corporal por grupo.

La composición de la dieta alta en grasa (AG) fue modificada a una relación de proteínas, carbohidratos y grasas en una proporción de 20.69%/ 34.11%/ 45.2% para obtener un modelo de obesidad inducida por dieta.

La dieta alta en grasa suplementada con resveratrol (AGR) siguió la composición de la dieta alta en grasa y se adicionó *trans*-resveratrol liofilizado con 99% de pureza mezclado con el alimento. La dosis administrada de resveratrol también fue de 200 mg/kg pc/d y se calculó de forma equivalente a la dieta CR.

La formulación de las dieta experimentales con que se alimentaron los animales se presenta en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Composición de las dietas experimentales

Porcentaje (%)	Control (C)	Control + 200mg/kg pc/d Resveratrol (CR)	Dieta alta en grasa (AG)	Dieta alta en grasa + 200mg/kg pc/d Resveratrol (AGR)
Caseína	19.87	19.87	24.14	24.14
Cistina	0.14	0.14	0.17	0.17
Aceite de soya	5.16	5.16	5.75	5.75
Manteca	----	----	17.72	17.72
Vitaminas	1.89	1.89	2.99	2.99
Colina	0.19	0.19	0.23	0.23
Minerales	4.73	4.73	5.75	5.75
Celulosa	2.84	2.84	3.44	3.44
Dextrina	16.59	16.59	29.46	29.46
Sacarosa	16	16	10.35	10.35
Almidón	32.59	32.59	0	0
Resveratrol	----	+ 200 mg/kg pc/d	----	+ 200 mg/kg pc/d
<b>TOTAL</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

### 7.6 Prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal

Se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa oral dos semanas previas a la eutanasia de los animales. Seis ratones de cada tratamiento dietario se colocaron en ayuno durante la noche previa (7 h). La concentración de glucosa en sangre se determinó antes de administrarse la carga de glucosa y después de 15, 30, 45, 60, 90, 120 y 150 minutos de la carga. La glucosa se administró vía intragástrica a una dosis de 2 mg/kg pc con una solución de glucosa al 30%.

La concentración de glucosa se determinó a partir de una pequeña incisión en la cola de los animales utilizando un glucómetro de tiras reactivas. El análisis comparativo se realizó a partir de la determinación del área bajo la curva de concentración de glucosa en sangre durante los 150 min de duración de la prueba.

### 7.7 Calorimetría indirecta

Una semana previa a la eutanasia de los animales, se llevó a cabo una prueba de calorimetría indirecta para la comparación del metabolismo energético entre los diferentes tratamientos dietarios. Se utilizó un calorímetro de circuito abierto computadorizado. Éste sistema utiliza un sensor de zirconia para monitorizar el volumen de oxígeno y un sensor de infrarrojo para el volumen de dióxido de

carbono dentro de cámaras respiratorias (20 x 10 x 12.5 cm) dentro de las cuales se colocan los animales de manera individual para ser evaluados. Los sensores del equipo se calibraron con un tanque de gas con composición conocida. Posterior a la calibración, el equipo determinó el volumen de oxígeno y de dióxido de carbono consumido/producido a partir de la diferencia entre el volumen que entra en la cámara y el volumen que sale de la misma. El equipo determinó el volumen de oxígeno consumido ( $VO_2$ ) y el volumen de dióxido de carbono producido ( $VCO_2$ ) en intervalos de 22 min.

El cociente de intercambio respiratorio (RER) se calculó a partir de la relación entre la producción de dióxido de carbono ( $VCO_2$ ) y el consumo de oxígeno ( $VO_2$ ), y la producción de calor se calculó a partir de la fórmula:  $\text{Calor (kcal/h)} = [(3.815 + 1.232 \cdot \text{RER}) \cdot VO_2 \text{ (en litros)}]$ . Del valor de producción de calor en kcal/h, se obtuvo el valor de calor (kcal) por litro de  $O_2$  consumido, a partir del cual se realizó un análisis de la proporción entre la oxidación de sustratos (hidratos de carbono y lípidos) a partir de la tabla de Lusk [98].

Cinco animales de cada tratamiento dietario se colocaron en las cámaras respiratorias aproximadamente 48 h: 24 h como periodo de adaptación, 8 h para la evaluación del periodo de ayuno y 12 h para la evaluación del periodo de posprandio.

### **7.8 Determinación de parámetros bioquímicos en plasma**

Del plasma obtenido por la recolección de sangre al momento de la eutanasia se determinó la concentración de parámetros bioquímicos generales, marcadores de daño renal y actividad de enzimas hepáticas: glucosa, colesterol total, colesterol de baja densidad (LDL), colesterol de alta densidad (HDL), triglicéridos, actividad de transaminasas (AST y ALT), creatinina y albúmina.

Las determinaciones se obtuvieron por los métodos y estándares calibrados del analizador automático Cobas c111.

### **7.9 Determinación de parámetros hormonales en plasma**

Se determinó la concentración de insulina (ng/ml), leptina (ng/dml), adiponectina total (ng/ml), y adiponectina de alto peso molecular (ng/ml).

Los ensayos se realizaron utilizando kits comerciales de ELISA en las muestras de plasma sanguíneo recolectadas en la eutanasia.

### **7.10 Contenido de lípidos en tejido renal y hepático**

Los lípidos totales se extrajeron a partir de 30 mg de tejido renal o hepático de acuerdo al método de Folch et al [99].

A manera de descripción, las muestras se homogenizaron en 600  $\mu\text{L}$  de cloroformo:metanol (2:1) y permanecieron en reposo y oscuridad por 15 min. Se agregaron 150  $\mu\text{L}$  de NaCl en agua al 0.9%. Se centrifugaron a 3000 rpm (242 g) durante 10 min. La fase orgánica se evaporó hasta sequedad en nitrógeno gaseoso y el resto se resuspendió en 80  $\mu\text{L}$  de Triton X-100 en isopropanol (10% vol/vol).

Se tomó una alícuota de la muestra resuspendida, se utilizó una dilución 1:5 y se para determinó el contenido de triglicéridos y de colesterol a partir dos estuches enzimáticos comerciales: Triglyceride FS\* y Cholesterol FS\*. Para ambos ensayos se utilizó un estándar de 200 mg/dL de triglicéridos o de colesterol contenido en el estuche comercial. Los datos se expresaron en cantidad de lípidos por gramo de masa de riñón o de hígado original.

## **7.11 Análisis histológico**

### **7.11.1 Análisis morfométrico cuantitativo en tinciones histológicas (PAS y H&E) por cortes en microtomo (parafina)**

Los riñones se removieron rápidamente y se cortaron en forma longitudinal. Una mitad de cada riñón se inmergió 48 horas en una solución fría de paraformaldehído al 10% en amortiguador salino de fosfatos.

Posteriormente, las muestras de tejido se deshidrataron en etanol y xilol, y se embebieron en parafina. Se realizaron cortes longitudinales de 4  $\mu\text{m}$  de grosor y se realizaron las tinciones histológicas con hematoxilina/eosina (H&E) y ácido peryodico de Schiff (PAS).

Para el análisis morfométrico de citología renal se utilizó un microscopio óptico asistido por computadora. Las imágenes capturadas se realizaron a un objetivo de 40X a 600 dpi de resolución.

Para la determinación del parámetro de expansión mesangial e hiper celularidad se midió el área de la matriz mesangial de 10 glomérulos por muestra, considerando únicamente glomérulos cortados de polo a polo con la vasculatura completa visible, y se determinó el número de células presentes en cada sección. Para el análisis se graficó la relación entre el número de células por área mesangial en  $\mu\text{m}^2$ .

Para la determinación del porcentaje de vacuolas lipídicas por área tubular, se midió el área total de 25 túbulos proximales renales por cada muestra. Al área total de cada túbulo proximal se restó el área de la luz interna de cada túbulo, y se determinó el área de las vacuolas lipídicas presentes en cada uno. Para el análisis se graficó el porcentaje del área tubular ocupado por vacuolas lipídicas en cada túbulo.

### 7.11.2 Tinción de rojo oleoso por cortes en criostato

Un riñón se removió rápidamente y se cortó en forma longitudinal. Una mitad de cada riñón se embebió en solución para extracción de tejido y se sumergió en Nitrógeno líquido.

Con el tejido en congelación, se realizaron cortes longitudinales de 8 µm de grosor en cada muestra por medio un criotomo (a -20°C). Una vez realizados los cortes, se realizó la tinción de rojo oleoso contratada con Hematoxilina de Harris para la determinación de lípidos neutros en tejido renal.

Para el análisis morfométrico de citología renal se utilizó un microscopio óptico asistido por computadora. Las imágenes capturadas se realizaron a un objetivo de 40X a 600 dpi de resolución.

### 7.12 Microarreglo de expresión genética (UPR)

Se llevó a cabo un análisis de microarreglo para obtener el perfil de expresión global a partir de 10 mg de tejido renal de 3 ratones provenientes únicamente de los grupos no tratados con tunicamicina: Control (C), Control + Resveratrol (CR), Alta en grasa (AG) y Alta en grasa + Resveratrol (AGR). Las muestras de los ratones evaluados fueron analizadas en placas individuales. Los procedimientos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo a los establecidos por los protocolo de QIAGEN.

El RNA se extrajo a partir del tejido renal utilizando el estuche comercial RNeasy Fibrous Tissue. La concentración y pureza del RNA fueron determinadas utilizando el equipo espectrofotométrico NanoDrop ND-1000.

El cDNA se sintetizó por transcripción reversa a partir del RNA renal total con el kit de conversión RT<sup>2</sup> First Strand a partir de 1000 ng de RNA.

Para el análisis de la expresión diferencial de genes asociados con la activación de la respuesta a proteínas no plegadas (UPR), se utilizó RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Mouse Unfolded Protein Response en combinación con RT<sup>2</sup> SYBR Green qPCR Mastermix. Simultáneamente se obtuvo el ensayo de RT-PCR para la expresión de 84 genes relacionados con la ruta de señalización de la UPR, así como 5 genes constitutivos (Actb, B2m, Gapdh, Gusb y Hsp90ab1), un control de contaminación de DNA genómico (MGDC), tres controles de transcripción reversa (RTC) y tres controles positivos de la reacción de PCR (PPC), que permitieron realizar un control de calidad de los datos (**Tabla 3 Y Tabla 4**).

**Tabla 3.** Descripción de controles utilizados para el control de calidad del arreglo

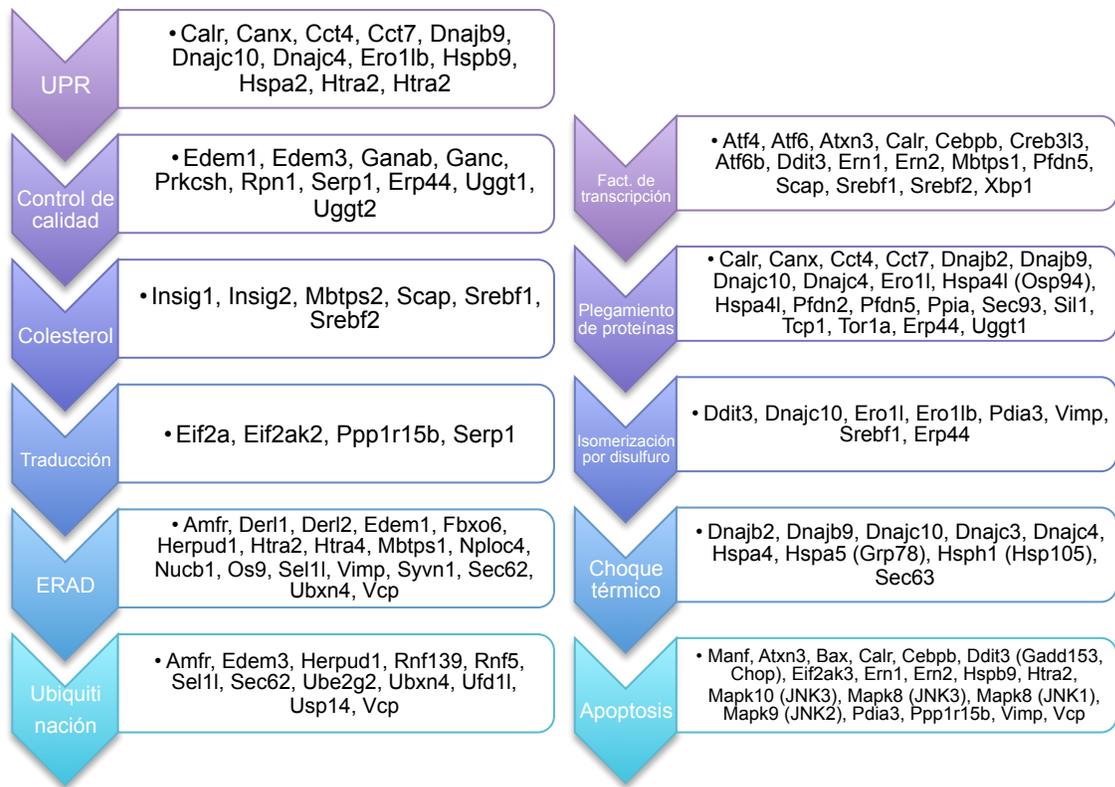
<b>Tipo de control</b>	<b>Descripción</b>
<b>MGDC</b>	<b>Contaminación de DNA genómico de ratón (Control negativo).</b> Región no codificante lejos de cualquier sitio que se transcriba. Indica contaminación con DNA genómico en la extracción.
<b>RTC</b>	<b>Controles de transcripción reversa.</b> mRNA artificial con poli-A no homólogo de mamíferos o bacterias precargado junto con sus primers en tres pozos. $\eta$ de la transcripción reversa. Reproducibilidad.
<b>PPC</b>	<b>Controles positivos de PCR.</b> DNA con otra secuencia artificial y primers diseñados para amplificar esta secuencia. El rango de CT de estos controles siempre debe estar en valores específicos.

*MGDC= por sus siglas en inglés Mouse genomic DNA contamination; RTC= por sus siglas en inglés Reverse transcription control; PPC= por sus siglas en inglés PCR positive controls.*

**Tabla 4** Resultados del control de calidad de datos

<b>Prueba realizada</b>	<b>Resultado</b>
1. Reproducibilidad del arreglo de PCR (PPC)	Muestras analizadas: C1 C2 C3 Todas las muestras pasaron
2. Eficiencia del tiempo real (RT)	Todas las muestras pasaron
3. Contaminación de DNA genómico	Todas las muestras pasaron

Los genes que se determinaron codifican para proteínas involucradas en la respuesta a proteínas no plegadas, incluyendo la ruta de control de calidad del plegamiento de proteínas en el retículo endoplásmico, la regulación del metabolismo de colesterol, la regulación de la traducción de proteínas, la degradación asociada al estrés de retículo endoplásmico (ERAD), la ubiquitinación de proteínas mal plegadas, los principales factores de transcripción que regulan la síntesis de proteínas, la vía general del plegamiento de proteínas, la vía de isomerización de proteínas por puentes disulfuro, las proteínas de choque térmico y la ruta de apoptosis. En la **FIGURA 7** se mencionan los genes cuya expresión se determinó en este ensayo. Las proteínas para las que codifica cada gen se encuentra en el apéndice.



**FIGURA 9.** Lista de genes clasificados de acuerdo a la ruta bioquímica asociada a la UPR.

El RT-PCR se realizó con un instrumento ABI PRISM 7000 Sequence Detection System después de agregar el cDNA de cada muestra en cada pozo de la placa. Las muestras fueron incubadas a 95°C por 10 minutos para desnaturalizarse, seguidas de 40 ciclos de PCR. Cada ciclo constó de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C.

Para la recolección y análisis de datos a partir de la plataforma del sistema se utilizó el software QuantStudio Flex Real-Time PCR System v1.3.

Los valores de  $C_T$  se exportaron a un documento de Microsoft Excel, que posteriormente se utilizó para la plataforma web de análisis de datos de Qiagen ([www.qiagen.com/geneglobe](http://www.qiagen.com/geneglobe)). El valor de límite mínimo de detección de  $C_T$  fue de 35. Los resultados de las muestras se clasificaron en la plataforma de análisis como controles o muestras experimentales para el análisis de datos (**Tabla 5**). La normalización de la expresión genética se llevó a cabo utilizando el promedio de la media aritmética del valor de expresión de los cinco genes constitutivos analizados (**Tabla 6**).

**Tabla 5.** Clasificación de muestras para análisis de expresión

Grupo Control (C)	Grupo 1 (CR)	Grupo 2 (AG)	Grupo 3 (AGR)
C1	CR1	AG1	AGR1
C2	CR2	AG2	AGR2
C3	CR3	AG3	AGR3

**Tabla 6.** Método de normalización de muestras por media aritmética de expresión en genes constitutivos evaluados

Grupo	Muestra	Actb	B2m	Gapdh	Gusb	Hsp90ab1	Media aritmética	Promedio de media aritmética
Control	<b>C1</b>	17.706	18.471	17.414	22.969	18.447	19.00	<b>20.24</b>
Control	<b>C2</b>	21.342	22.194	20.915	26.259	21.802	22.50	
Control	<b>C3</b>	18.001	18.969	17.686	22.983	18.424	19.21	
Grupo 1	<b>CR1</b>	22.733	23.229	22.066	27.063	22.816	23.58	<b>23.31</b>
Grupo 1	<b>CR2</b>	21.866	22.958	21.669	27.214	22.661	23.27	
Grupo 1	<b>CR3</b>	21.948	22.718	21.581	26.785	22.383	23.08	
Grupo 2	<b>AG1</b>	22.288	22.719	21.894	27.006	22.597	23.30	<b>23.56</b>
Grupo 2	<b>AG2</b>	22.245	22.869	21.792	26.867	22.446	23.24	
Grupo 2	<b>AG3</b>	23.206	23.857	22.734	27.557	23.37	24.14	
Grupo 3	<b>AGR1</b>	22.763	23.282	22.485	27.506	23.148	23.84	<b>23.85</b>
Grupo 3	<b>AGR2</b>	22.58	23.572	22.263	27.326	22.819	23.71	
Grupo 3	<b>AGR3</b>	23.092	23.358	22.726	27.402	23.428	24.00	

El análisis de datos en la plataforma calculó la razón de cambio en la expresión génica de acuerdo la fórmula:  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ . Los filtros de análisis en la razón de cambio incluyeron un aumento/una disminución mínima de 1.5 veces en la comparación de la expresión normalizada en cada gen del grupo experimental vs el grupo control y un valor de  $p < 0.05$ .

Así mismo, el reporte de análisis exportado de la plataforma web, arrojó el gráfico de scatter plot, volcano plot, clustergram y mapa de calor para cada uno de los grupos experimentales.

### 7.13 Determinación de expresión proteica de marcadores por Western blot

El tejido renal se homogenizó en amortiguador de lisis compuesto por IGEPAL CA-630 al 0.1%, desoxicolato de sodio al 0.5%, dodecil sulfato de sodio al 0.1%, fluoruro de sodio 1 mM, ortovanadato de sodio 3mM y tabletas comerciales de inhibidores de proteasas, todo disuelto en amortiguador salino de fosfatos. La proteína fue cuantificada con base en el método de Lowry con el ensayo de proteína DC. Se utilizaron 40 µg de proteína renal por muestra en cada ensayo. La electroforesis se realizó en geles prehechos de poliacrilamida con gradiente de concentración de 4 a 20% ó de concentración fija al 10% que se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno. Los blots se bloquearon durante 2h a temperatura ambiente con leche descremada al 5% en TBS-tween 0.1%. La

membranas ya bloqueadas se incubaron en leche descremada al 1% en TBS-tween 0.1% durante la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos: GRP78, CHOP, AMPK, p-AMPK,  $\beta$ -Actina, SREBP-1, SREBP-2 y PGC1- $\alpha$ .

Posteriormente, los blots fueron incubados con inmunoglobulina G conjugada con peroxidasa de rábano anti-conejo, -cabra o -ratón.

Los blots se revelaron por el método de quimioluminiscencia con el producto comercial “Immobilon Western Chemiluminiscent HRP substrate” y expuestos en el sistema electrónico de imagen ChemiDoc MP.

Para la normalización de datos las membranas se incubaron con anticuerpo anti- $\beta$  actina.

Cada proteína se evaluó por individual con cuatro animales por grupo experimental. La semicuantificación de las bandas se llevó a cabo utilizando el software de procesamiento digital de imágenes ImageJ 1.42p [100]. La expresión de cada proteína analizada fue normalizada con el valor correspondiente a su  $\beta$ -Actina.

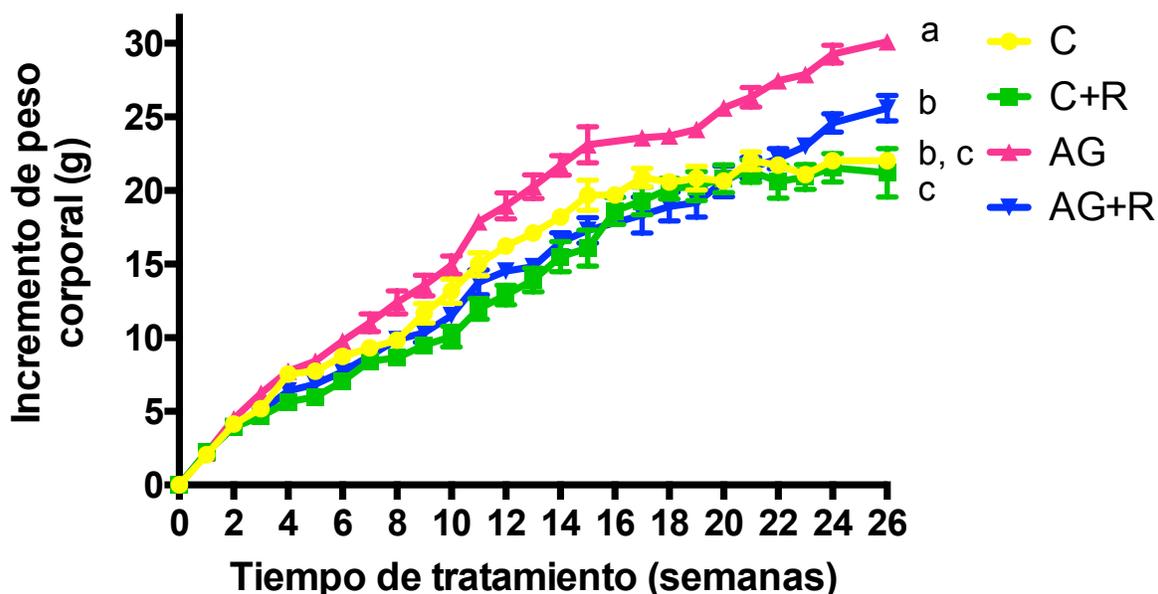
#### **7.14 Análisis estadístico**

Los valores se describieron como la media  $\pm$  S.E.M. como se indica en cada pie de figura o tabla. Los datos de los gráficos de peso corporal inicial y final, así como el área bajo la curva de la prueba de tolerancia a la glucosa oral, se evaluaron por un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Fisher LSD. Los datos de la prueba de calorimetría indirecta, parámetros bioquímicos, parámetros hormonales, expresión relativa de proteínas, contenido de lípidos en tejido renal y determinaciones histológicas se analizaron por medio de un ANOVA de dos vías seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Fisher LSD. En todos los casos las diferencias significativas entre grupos se indicaron con letras en cada figura, siendo “a” el de mayor valor ( $a>b>c>d$ ).  $P<0.05$  se consideró como diferente en todas las pruebas (GraphPad Prism 6.0, San Diego, CA, EUA).

## 8. RESULTADOS

### 8.1 LA SUPLEMENTACIÓN CON RESVERATROL REDUJO LA GANANCIA DE PESO CORPORAL EN UNA DIETA ALTA EN GRASA

Durante las 26 semanas de tratamiento dietario se registró y se graficó el peso semanal de los 10 animales correspondientes a cada uno de los cuatro tratamientos dietarios utilizados: C, CR, AG y AGR (**FIGURA 8**), con la finalidad de observar el efecto de la suplementación de resveratrol en la dieta sobre la ganancia de peso corporal.



**FIGURA 10.** Efecto de la suplementación dietaria con resveratrol sobre la ganancia de peso corporal en ratones macho C57BL/6 alimentados con una dieta control (AIN-93M) o una dieta alta en grasa (45% Kcal grasa saturada) durante 26 semanas.

n= 10 para cada grupo experimental. Diferentes letras representan diferencia significativa ( $a>b>c$ ). ANOVA Tukey  $p < 0.05$

**TABLA 7.** *Peso corporal inicial, peso corporal final, ganancia de peso corporal final y alimento consumido en los ratones alimentados con cada uno de los tratamientos dietarios: C, CR, AG y AGR.*

	Peso corporal inicial (g)	Peso corporal final (g)	Ganancia de peso corporal final (g)	Alimento consumido (g)	Alimento consumido (Kcal)
<b>Control (C)</b>	18.033 ± 0.287	38.52 ± 0.436 <sup>b,c</sup>	22.023 ± 0.305 <sup>b,c</sup>	3.111 ± 0.037 <sup>a</sup>	11.345 ± 0.127
<b>Control + Resveratrol (CR)</b>	18.617 ± 0.557	37.332 ± 0.885 <sup>c</sup>	21.205 ± 1.008 <sup>c</sup>	3.054 ± 0.030 <sup>a</sup>	11.454 ± 0.107
<b>Alta en grasa (AG)</b>	18.091 ± 0.409	46.538 ± 1.179 <sup>a</sup>	30.099 ± 0.148 <sup>a</sup>	2.238 ± 0.027 <sup>b</sup>	11.001 ± 0.116
<b>Alta en grasa + Resveratrol (AGR)</b>	18.207 ± 0.376	41.486 ± 0.888 <sup>b</sup>	25.595 ± 0.493 <sup>b</sup>	2.243 ± 0.034 <sup>b</sup>	11.16 ± 0.143

n= 10 para cada grupo experimental. Diferentes letras representan diferencia significativa (a>b>c). ANOVA Tukey p < 0.05

En la **FIGURA 10** se observa que las curvas de ganancia de peso de los cuatro grupos muestran un comportamiento similar durante las primeras 19 semanas de tratamiento dietario, y a partir de la semana 20, el grupo alimentado con la dieta alta en grasa (AG) alcanzó una ganancia de peso mayor que continuó hasta el final del tratamiento respecto a los grupos (AGR) (-15.15%), (C)(-26.99%) y (CR) (-29.71%). Así mismo, el grupo (AGR) alcanzó una ganancia de peso corporal mayor respecto al grupo (CR) (-14.56%); sin embargo, ninguno de los dos grupos presentó diferencia significativa respecto al grupo control (C).

Por lo tanto, el grupo alimentado con la dieta alta en grasa (AG) incrementó de forma significativa la ganancia de peso corporal. Sin embargo, la suplementación con resveratrol redujo la ganancia de peso corporal en los animales alimentados con una dieta alta en grasa (AGR) de forma significativa respecto al grupo (AG). Y ambos grupos suplementados con resveratrol (CR) y (AGR) presentaron un comportamiento similar al del grupo control (C).

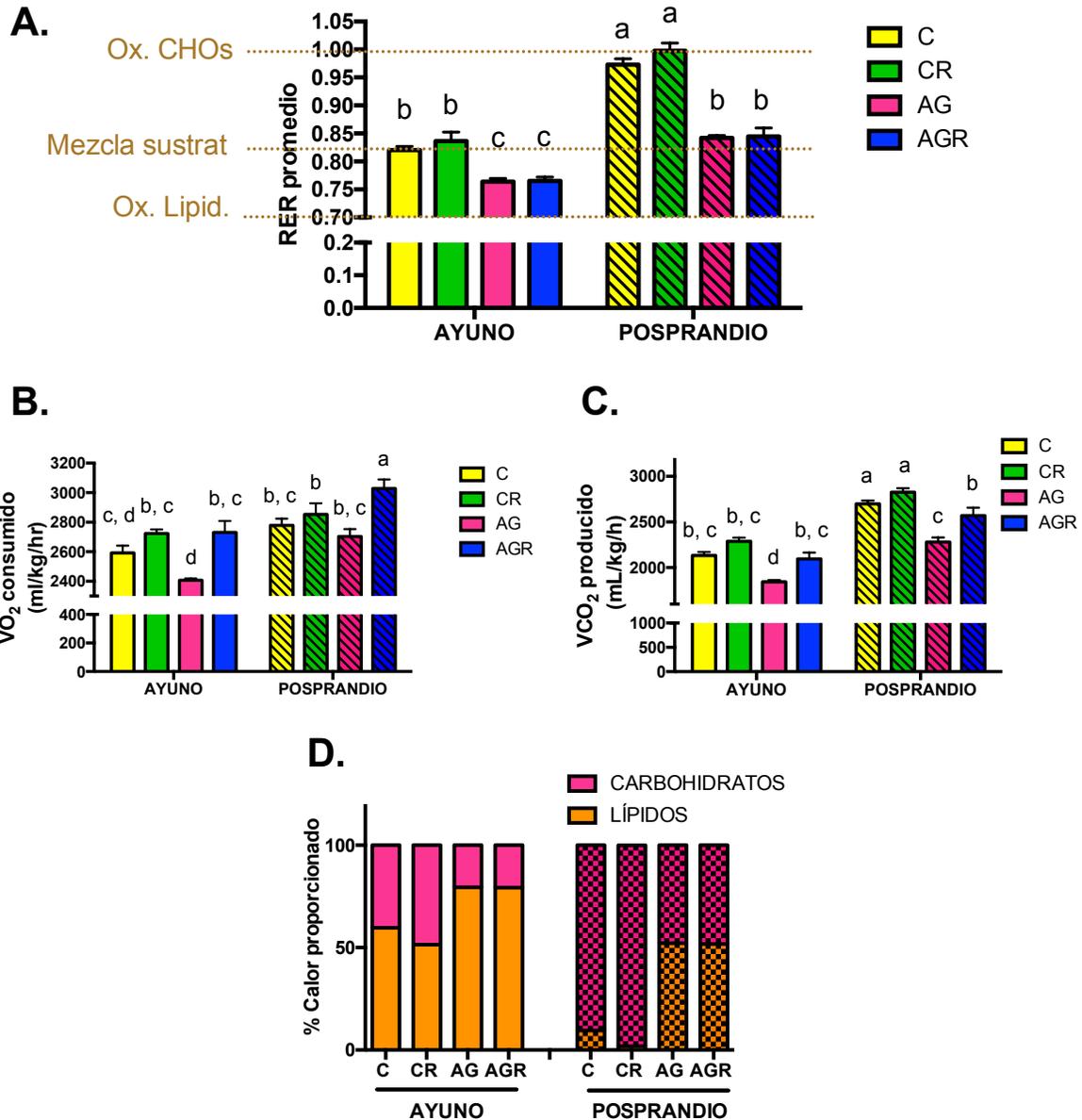
Por otro lado, de acuerdo a los valores descritos en la **TABLA 7**, se muestra que el peso inicial de los animales de cada uno de los grupos no presentó diferencia significativa entre sí y que las diferencias en el incremento de peso corporal no se deben a variaciones en el consumo calórico en alguno de los grupos, ya que ninguno de los grupos presenta diferencia significativa entre sí.

Por lo tanto, la suplementación con resveratrol no modificó el consumo de alimento ni en la dieta control (CR) ni en la dieta (AGR), por lo que la reducción en el peso corporal no se debió a modificaciones en la ingesta de alimento.

## 8.2 EL RESVERATROL INCREMENTÓ LA VELOCIDAD METABÓLICA OXIDATIVA DE LÍPIDOS EN UNA DIETA ALTA EN GRASA

Después de observar que el resveratrol redujo la ganancia de peso corporal en una dieta alta en grasa, se decidió determinar si el resveratrol inducía algún efecto en la proporción de sustratos oxidados y en la velocidad metabólica oxidativa, y por ello indujo una menor ganancia de peso corporal. Con esa finalidad, en la semana 27 de tratamiento dietario, se evaluó el gasto calórico por medio de calorimetría indirecta en un grupo de ratones de cada uno de los tratamientos dietarios, cuyos resultados se muestran a continuación (**FIGURA 11**).

La calorimetría indirecta es una técnica no invasiva que permite estimar el tipo sustrato que se está utilizando, la velocidad metabólica oxidativa y el metabolismo energético *in vivo* de un organismo. Estas determinaciones se obtienen a partir de mediciones de intercambio gaseoso: el volumen de oxígeno consumido, el volumen de dióxido de carbono producido y la liberación de calor específica para la naturaleza del sustrato energético que está siendo oxidado [101]. La relación entre estas mediciones de intercambio gaseoso proporciona información única acerca de la medida de intercambio respiratorio, que está determinado por el metabolismo energético de la oxidación de cierta combinación de sustratos, principalmente carbohidratos y lípidos, cuya proporción aproximada puede obtenerse a partir de fórmulas ya establecidas [102,103].



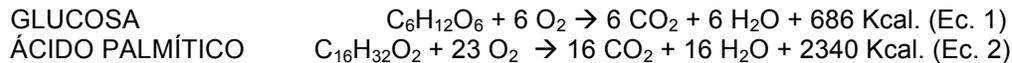
**FIGURA 11.** Efecto de la suplementación con resveratrol en ratones C57BL/6 alimentados con una dieta control (AIN-93M) o una dieta alta en grasa (45% Kcal grasa saturada) por 27 semanas en la proporción de sustratos utilizados y la velocidad metabólica oxidativa en un periodo de ayuno (8 h) y un periodo de posprandio (12 h) **A.** Gráfico comparativo del coeficiente respiratorio para cada uno de los tratamientos dietarios **B.** Gráfico comparativo del promedio de volumen de oxígeno consumido por cada tratamiento dietario **C.** Gráfico comparativo del promedio de volumen de dióxido de carbono producido por cada tratamiento dietario **D.** Gráfico representativo del porcentaje de calor proporcionado a partir de hidratos de carbono y lípidos para cada uno de los tratamientos dietarios.

n= 6 para cada grupo experimental. Diferentes letras representan diferencia significativa (a>b>c>d). ANOVA Tukey p < 0.05

La obtención de energía en los organismos vivos se da por la oxidación de nutrimentos, siguiendo la siguiente ecuación general del metabolismo oxidativo:



El calor producido depende del coeficiente térmico de oxígeno determinado para cada sustrato; así mismo, el volumen de oxígeno y el volumen de dióxido de carbono van de acuerdo a las ecuaciones químicas planteadas para cada sustrato [104]. Por ejemplo:



El coeficiente respiratorio (RER: Respiratory Exchange ratio, por sus siglas en inglés), es la relación que existe entre el dióxido de carbono producido y el oxígeno consumido ( $\text{VCO}_2/\text{VO}_2$ ), y de acuerdo a las ecuaciones presentadas en la parte superior se puede observar que éste valor es característico del sustrato metabolizado, ya que la cantidad de oxígeno consumido y de dióxido de carbono producido son características del sustrato. En el caso de la glucosa, el valor del RER es 1 (6  $\text{CO}_2/6 \text{O}_2$ ) (Ec. 1); mientras que, en el caso del ácido palmítico y en general de los ácidos grasos, éste valor disminuye a valores cercanos a 0.70 (16  $\text{CO}_2/23 \text{O}_2$ ) (Ec. 2) [102,104].

De acuerdo con lo mencionado en el párrafo anterior, en la **FIGURA 11A** se observó que los grupos alimentados con las dietas control (C) y (CR) oxidaron una mezcla de carbohidratos y lípidos durante el ayuno (RER= 0.83); mientras que, durante el posprandio, oxidaron esencialmente carbohidratos (RER= 1). A diferencia de los grupos alimentados con la dieta alta en grasa (AG) y (AGR), que oxidaron una mezcla de sustratos compuesta esencialmente por lípidos durante el ayuno (RER= 0.75); y durante el periodo de posprandio, continuaron oxidando una mezcla de sustratos (RER= 0.84), dentro de la cual siguió encontrándose una proporción considerable de lípidos aunque incluyó una mayor proporción de carbohidratos en relación al ayuno.

Consistentemente, en la **FIGURA 11D** se observó que en la gráfica de proporción de sustratos oxidados en cada tratamiento dietario, los grupos alimentados con la dieta control, (C) y (CR), oxidaron entre 50-60% de carbohidratos y entre 40-50% de lípidos durante el ayuno; mientras que los grupos alimentados con la dieta alta en grasa (AG) y (AGR) oxidaron aproximadamente 20% de carbohidratos y 80% de lípidos. Por otro lado, durante el posprandio, los grupos (C) y (CR) oxidaron entre 90-98% de carbohidratos y entre el 2-10% de lípidos; mientras que, los grupos (AG) y (AGR) oxidaron 50% de carbohidratos y 50% de lípidos.

De acuerdo con la gráfica de proporción de sustratos oxidados los grupos de animales alimentados con la dieta control (C) y (CR) siguieron un comportamiento

muy similar, tanto en ayuno como en posprandio. Utilizaron preferencialmente carbohidratos durante el periodo de posprandio mientras que, en el periodo de ayuno el coeficiente respiratorio de los ratones disminuyó debido a la oxidación combinada de una mezcla de sustratos. A diferencia de los grupos de animales que fueron alimentados con las dietas con grasa adecuada, los grupos alimentados con las dietas altas en grasa (AG) y (AGR), utilizaron la oxidación de ácidos grasos preferencialmente tanto en el periodo de ayuno como en el periodo de posprandio.

Por lo tanto, los ratones que consumieron las dietas altas en grasa presentaron inflexibilidad metabólica, es decir, que perdieron la capacidad de alternar los sustratos metabólicos (carbohidratos y lípidos) en función de las circunstancias energéticas de la célula (ayuno y posprandio). Así mismo, se observó que la suplementación dietaria con resveratrol no modificó la proporción de sustratos oxidados durante el ayuno y el posprandio en ninguna de las dos dietas utilizadas: control y alta en grasa.

Ahora, en la **FIGURA 11B**, se observó que en los grupos (AG) y (AGR) hubo un incremento significativo en el volumen de oxígeno consumido durante el periodo de posprandio respecto al periodo de ayuno; así mismo, en los grupos (C) y (CR) se observó la tendencia hacia un incremento en el volumen de oxígeno consumido en el periodo de ayuno respecto al periodo de posprandio en éstos dos grupos, a pesar de no ser significativa. Adicionalmente se observó que los grupos de ratones con mayor consumo de oxígeno significativo en ambos periodos (ayuno y posprandio), fueron los grupos de animales (AGR) y (CR) con respecto a los grupos dietarios (C) y (AG). Así mismo, se observó que el grupo (AG) presentó un consumo menor de oxígeno respecto a los demás grupos (AGR, CR y C) tanto en el periodo de ayuno como en el periodo de posprandio.

En la **FIGURA 11C** muestra que el grupo (AG) presentó una producción de dióxido de carbono menor significativa respecto a los grupos (CR), (C) y (AGR), tanto en el periodo de ayuno como en el periodo de posprandio. Así mismo, se observó que en los tratamientos dietarios (C),(CR) y (AG) hubo una producción mayor significativa de dióxido de carbono durante el periodo de posprandio respecto al periodo de ayuno, y se mantuvo la misma tendencia entre los grupos que en el periodo de ayuno, excepto por el grupo (AGR). El grupo (AGR) no presentó diferencia significativa respecto a los grupos (C) y (CR) durante el periodo de ayuno, sin embargo, durante el periodo de posprandio produjo un volumen de dióxido de carbono significativamente menor al producido por los grupos (C) y (CR), y no presentó diferencia significativa entre el volumen de dióxido de carbono producido durante el periodo de posprandio respecto al que produjo en el periodo de ayuno.

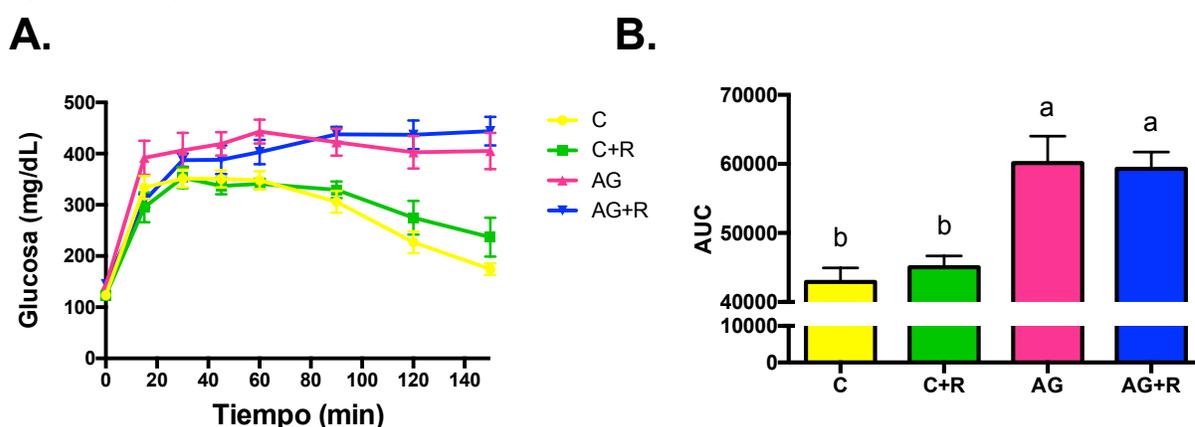
Por lo tanto, el consumo de una dieta alta en grasa (AG) durante 26 semanas en ratones C57BL/6 disminuyó la velocidad metabólica oxidativa, comparativamente con los demás tratamientos dietarios (C, CR, AGR) durante el mismo tiempo. Sin embargo la suplementación con resveratrol incrementó de forma significativa la

velocidad metabólica oxidativa del grupo de ratones alimentado con la dieta alta en grasa (AGR) con respecto a los otros tres tratamientos dietarios (C, CR, AG) tanto en ayuno como en posprandio, y presentó una tendencia a incrementar la velocidad oxidativa del grupo alimentado con la dieta (CR) respecto al grupo (C).

### 8.3 LA SUPLEMENTACIÓN CON RESVERATROL EN UNA DIETA ALTA EN GRASA NO MODIFICÓ LA TOLERANCIA A LA GLUCOSA

Se sabe que las alteraciones en el metabolismo de glucosa, como la intolerancia a la glucosa, están asociadas con el desarrollo de diversas enfermedades metabólicas inducidas por la obesidad, dentro de las que se encuentra la enfermedad renal [47], y se sabe que la obesidad induce estas alteraciones metabólicas.

Al observar los efectos de la suplementación dietaria con resveratrol en ratones C57BL/6 con respecto a la velocidad metabólica oxidativa y la ganancia de peso corporal, se decidió evaluar si el resveratrol tuvo algún efecto en la tolerancia a la glucosa, después de 26 semanas de tratamiento dietario, para lo cual se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa vía intraperitoneal de 150 min (8 puntos), cuyos datos y análisis comparativo se muestran a continuación (**FIGURA 12**).



**FIGURA 12.** Efecto de la suplementación con resveratrol en la prueba de tolerancia a la glucosa vía intraperitoneal en ratones C57BL/6 alimentados con una dieta control (AIN-93M) o una dieta alta en grasa (45% Kcal grasa saturada) durante 26 semanas. **A.** Curva de concentración de glucosa en sangre a los tiempos 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 y 150min después de la inyección intraperitoneal de glucosa (2 mg/kg pc). **B.** Gráfico de barras para el análisis comparativo del área bajo la curva (AUC) de cada uno de los tratamientos dietarios durante la prueba de tolerancia a la glucosa vía intraperitoneal

n= 5 para cada grupo experimental. Diferentes letras representan diferencia significativa (a>b). ANOVA Tukey p < 0.05

En la **FIGURA 12A** se observa que un comportamiento similar en la curva de valores de concentración de glucosa en sangre entre el grupo (CR) y (C), y entre el grupo (AGR) y (AG). Consistentemente con el comportamiento observado en la

FIGURA 10A, en la **FIGURA 12B** se observa que los grupos (AG) y (AGR) presentaron los valores mayores en el área bajo la curva de glucosa, y no presentaron diferencia significativa entre sí en el área bajo la curva, pero presentaron un incremento significativo respecto al valor de los grupos (C) y (CR); que, a su vez no presentaron diferencia significativa entre ellos.

La concentración de glucosa en sangre de los grupos (CR) y (C) en la **FIGURA 12A**, incrementó en durante los minutos 15, 30, 45 y 60 después de la inyección intraperitoneal de la carga de glucosa; mientras que durante los minutos 90, 120 y 150 se observó un descenso en la concentración de glucosa hasta llegar a valores cercanos a la concentración de glucosa basal, y se encontró en el rango de valores normoglucémicos para esta cepa de animales (172-372 mg/dL) [105]. Sin embargo, en la concentración de glucosa en sangre de los grupos (HF) y (HFR) se observó un incremento en durante los minutos 15, 30, 45 y 60 que, a diferencia de los grupos (CR) y (C), persistió elevada hasta el minuto 150, presentando valores considerados como hiperglucémicos de acuerdo al rango normal descrito [105].

Por lo tanto, los grupos (AG) y (AGR), describieron un comportamiento de intolerancia a la glucosa por efecto de la alimentación con una dieta alta en grasa; a diferencia de los grupos (C) y (CR), que presentaron un comportamiento normal. Por otro lado, la suplementación con resveratrol, no indujo ningún beneficio metabólico respecto a la tolerancia a la glucosa en comparación con los grupos no suplementados en ninguna de las dos dietas utilizadas: control (CR) y alta en grasa (AGR).

#### **8.4 LA SUPLEMENTACIÓN CON RESVERATROL MODIFICÓ VARIOS PARÁMETROS A NIVEL SISTÉMICO ANTE LA ADMINISTRACIÓN DE TUNICAMICINA**

##### **A) PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN SUERO**

Se evaluaron diversos parámetros bioquímicos en suero para analizar el efecto de la suplementación con resveratrol en una dieta control y alta en grasa ratones C57BL/6 a nivel sistémico en el metabolismo de la glucosa, el metabolismo de lípidos, la función hepática y la función renal, , cuyos datos se presentan en la **TABLA 8**. La determinación de estos parámetros se llevó a cabo a las 28 semanas de tratamiento dietario, y posteriores a la administración de una dosis única de tunicamicina para inducir el estrés del RE de forma farmacológica.

**TABLA 8.** Efecto de la suplementación con resveratrol en valores de parámetros bioquímicos séricos de ratones C57BL/6 alimentados con una dieta control (AIN-93M) o una dieta alta en grasa (45% Kcal grasa saturada) por 28 semanas e inyectados 8 horas previas a la eutanasia con una dosis única de tunicamicina (Tun)

Col.= Colesterol; TG= triglicéridos; ALT= Alanina aminotransferasa; AST= Aspartato aminotransferasa. n= 5 para cada grupo experimental. Diferentes

Parámetro/ Tratamiento	Control (C)	Control + Tun (C+T)	Control + Rsv (CR)	Control + Rsv + Tun (CR+T)	Alta en grasa (AG)	Alta en grasa + Tun (AG+T)	Alta en grasa + Rsv (AGR)	Alta en grasa + Rsv + Tun (AGR+T)
Glucosa (mg/dL)	248.68 ± 9.58 <sup>b</sup>	178.6 ± 8.6 <sup>c</sup>	228.7 ± 12.9 <sup>b,c</sup>	198.2 ± 5.85 <sup>b,c</sup>	288.98 ± 13.8 <sup>a</sup>	239.76 ± 8.78 <sup>b</sup>	268.4 ± 10.7 <sup>a,b</sup>	256.4 ± 12.9 <sup>a,b</sup>
Col. total (mg/dL)	189.8 ± 11.1 <sup>a,b</sup>	122.51 ± 4.71 <sup>c</sup>	160.6 ± 14.1 <sup>b,c</sup>	125.4 ± 18.9 <sup>b,c</sup>	217.16 ± 4.03 <sup>a</sup>	180.4 ± 24.8 <sup>b,c</sup>	173.8 ± 5.7 <sup>b,c</sup>	153.4 ± 5.9 <sup>b,c</sup>
Col. LDL (mg/dL)	46.81 ± 3.85 <sup>a,b</sup>	19.44 ± 2.29 <sup>c</sup>	29.77 ± 3.95 <sup>b,c</sup>	25.11 ± 3 <sup>b,c</sup>	55.44 ± 6.99 <sup>a</sup>	45.62 ± 13.4 <sup>b,c</sup>	37.88 ± 3.27 <sup>b,c</sup>	31.85 ± 5.70 <sup>b,c</sup>
Col. HDL (mg/dL)	183.53 ± 8.30 <sup>a</sup>	105.67 ± 3.54 <sup>c</sup>	170.14 ± 11 <sup>a,b</sup>	100.83 ± 10.2 <sup>c</sup>	187.53 ± 5.18 <sup>a</sup>	157.59 ± 15.4 <sup>b</sup>	160.92 ± 6.7 <sup>a,b</sup>	144.37 ± 4.86 <sup>b</sup>
TG (mg/dL)	53.19 ± 5.21 <sup>b,c</sup>	29.07 ± 3.48 <sup>c</sup>	44.27 ± 5.59 <sup>b,c</sup>	67.18 ± 7.10 <sup>a</sup>	55.88 ± 8.38 <sup>b</sup>	28.90 ± 2.05 <sup>c</sup>	52.53 ± 8.23 <sup>b</sup>	70.29 ± 5.55 <sup>a</sup>
ALT (U/L)	114.7 ± 11.84 <sup>b</sup>	150.97 ± 16.6 <sup>b</sup>	102.92 ± 18.4 <sup>b</sup>	124.30 ± 37.1 <sup>b</sup>	190.5 ± 40.6 <sup>a,b</sup>	366 ± 112.4 <sup>a</sup>	52.66 ± 3.76 <sup>b</sup>	218.9 ± 76.9 <sup>a,b</sup>
AST (U/L)	119.8 ± 11.02 <sup>b</sup>	206.3 ± 14.4 <sup>a,b</sup>	132.7 ± 23.19 <sup>b</sup>	248.2 ± 91.2 <sup>a,b</sup>	160.9 ± 30.6 <sup>a,b</sup>	349.7 ± 101.3 <sup>a</sup>	103.6 ± 14.2 <sup>b</sup>	275.1 ± 76.8 <sup>a,b</sup>
Creatinina (mg/dL)	0.55 ± 0.17 <sup>a,b</sup>	0.86 ± 0.06 <sup>a,b</sup>	0.57 ± 0.13 <sup>a,b</sup>	0.84 ± 0.14 <sup>a,b</sup>	0.77 ± 0.27 <sup>a,b</sup>	1.01 ± 0.15 <sup>a</sup>	0.46 ± 0.21 <sup>a,b</sup>	0.85 ± 0.18 <sup>b</sup>
Albumina (g/L)	21.73 ± 2.17	19.38 ± 3.54	22.30 ± 3.83	21.31 ± 4.05	21.95 ± 1.07	17.35 ± 1.29	22.58 ± 1.89	21.52 ± 1.57

## **LA ADMINISTRACIÓN DE TUNICAMICINA DISMINUYE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA SÉRICA Y LA SUPLEMENTACIÓN CON RESVERATROL PREVINO ESTA MODIFICACIÓN EN LA DIETA CONTROL Y EN LA DIETA ALTA EN GRASA**

La concentración elevada de glucosa en sangre, es un indicador de alguna alteración en el metabolismo de carbohidratos, y es un predictor del desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 que se presenta frecuentemente en la obesidad [106]. La concentración de glucosa sérica se determinó con la finalidad de observar y comparar si el consumo de una dieta alta en grasa y/o la administración de tunicamicina modificaron el metabolismo de glucosa, y si la suplementación con resveratrol protegió positivamente de estas alteraciones. Así mismo, el estudio del metabolismo de la glucosa es importante en nuestro modelo de estudio ya que, como se mencionó previamente, se ha demostrado que las alteraciones en el metabolismo de glucosa tiene un papel importante en la acumulación anormal de lípidos en tejidos periféricos [47].

De acuerdo con los datos mostrados en la **TABLA 8**, se observó que entre los grupos en los que no se administró tunicamicina, el grupo (AG) presentó un incremento en la concentración de glucosa significativo con respecto a los grupos (C) y (CR), más no con respecto al grupo (AGR); a su vez, el grupo (AGR) no presentó diferencia estadística respecto a los grupos (AG), (C) y (CR); y finalmente, los grupos (C) y (CR) no presentaron diferencia estadística entre sí. Todos los valores de estos cuatro grupos se encontraron dentro del rango normal de glucosa en suero (172-372 mg/dL) [105].

Por lo tanto, el grupo alimentado con la dieta alta en grasa (AG) presentó el valor más alto de glucosa sérica, aunque se encontró en el rango normal. Por otro lado, la suplementación con resveratrol presentó una tendencia a disminuir la concentración sérica de glucosa en los dos tipos de dieta respecto a los grupos no suplementados, tanto control (CR) como alta en grasa (AGR), a pesar de no ser significativa.

Adicionalmente, en los grupos administrados con tunicamicina, se observó que el grupo (AGR+T) presentó una concentración de glucosa mayor respecto al grupo (C+T), pero no presentó diferencia respecto a los grupos (CR+T) y (AG+T); a su vez, el grupo (AG+T) presentó un incremento significativo respecto al grupo (C+T), pero no presentó diferencia estadística con el grupo (CR+T); y finalmente, los grupos (CR+T) y (C+T), no presentaron diferencia estadística entre sí. Todos los valores se encontraron en el rango normal de valores para esta cepa (172-372 mg/dL) [105]. Los grupos (C+T) y (AG+T) presentaron una reducción significativa en la concentración de glucosa respecto a los grupos (C) y (AG); mientras que los grupos (CR+T) y (AGR+T) no presentaron diferencia significativa respecto a los grupos (CR) y (AGR) respectivamente.

La administración de tunicamicina indujo una reducción significativa de la concentración de glucosa en los grupos no suplementados con resveratrol (C+T y AG+T). Sin embargo, la suplementación con resveratrol previno el decremento ocasionado por la administración de tunicamicina, tanto en el grupo alimentado con la dieta control (CR+T) como en el grupo alimentado con la dieta alta en grasa (AGR+T).

## **LA ADMINISTRACIÓN DE TUNICAMICINA DISMINUYÓ LA CONCENTRACIÓN DE LÍPIDOS SÉRICOS Y LA SUPLEMENTACIÓN CON RESVERATROL PREVINO ESTA ALTERACIÓN EN LA DIETA CONTROL Y EN LA DIETA ALTA EN GRASA**

Se ha demostrado que la alteración del metabolismo de lípidos a nivel sistémico induce un desbalance en la lipogénesis y la lipólisis que contribuye en la acumulación anormal de lípidos en tejidos parenquimatosos, como el hígado y el riñón [47]. El perfil de lípidos en suero se determinó con la finalidad de observar si el consumo de una dieta alta en grasa y/o la administración de tunicamicina provocaron alteraciones en el metabolismo de lípidos a nivel sistémico, y si la suplementación con resveratrol previno estas alteraciones en el perfil lipídico. Por esa razón se midió la concentración de triglicéridos, colesterol total, colesterol LDL (lipoproteínas de baja densidad) y colesterol HDL (lipoproteínas de alta densidad) en el suero de los ratones alimentados con los diferentes tratamientos dietarios.

### **A) COLESTEROL TOTAL Y COLESTEROL LDL**

De acuerdo con los datos mostrados en la **TABLA 8**, se muestra que entre los grupos en los que no se administró tunicamicina, el grupo (AG) presentó un incremento significativo en la concentración de colesterol total y colesterol LDL respecto a los grupos (CR) y (AGR) pero no respecto al grupo (C). Por otro lado, el grupo (C) no presentó diferencia significativa respecto a los grupos (CR) y (AGR), mismos que tampoco presentaron diferencia significativa entre sí. Todos los valores de colesterol total se encontraron dentro del rango normal descrito para esta cepa, excepto por la concentración del grupo (AG) (69-192 mg/dL) [105]; el rango normal de colesterol LDL en esta cepa no ha sido caracterizado en su totalidad.

Por lo tanto, el grupo alimentado con la dieta alta en grasa (AG) presentó el valor más alto de colesterol total y LDL, y presentó una concentración de colesterol total mayor al rango normal publicado. Por otro lado, la suplementación con resveratrol disminuyó la concentración sérica, tanto de colesterol total como LDL, respecto a los grupos no suplementados (C y AG) en los dos tipos de dieta, tanto control como alta en grasa (CR y AGR), aunque sólo fue significativo entre los grupos de la dieta alta en grasa (AGR vs AG). Así mismo, la suplementación de resveratrol mantuvo la concentración de colesterol total dentro del rango normal en el grupo alimentado con la dieta alta en grasa (AGR) a diferencia del grupo no suplementado (AG).

En los grupos que fueron administrados con tunicamicina, el grupo (AG+T) presentó la mayor concentración de colesterol total y LDL, seguido por el grupo (AGR+T), el grupo (CR+T) y el grupo (C+T), sin presentar diferencia significativa entre ninguno de los grupos. Los valores de colesterol total de todos los grupos se encontraron dentro del rango normal publicado para esta cepa [105]. Los grupos (C+T) y (AG+T) presentaron una disminución significativa, tanto en la concentración de colesterol total como de LDL, respecto a los grupos (C) y (AG); a diferencia de los grupos (CR+T) y (AGR+T) que no presentaron diferencia significativa respecto a los grupos (CR) y (AGR).

La administración de tunicamicina indujo una reducción significativa en la concentración de colesterol total y LDL en los grupos no suplementados con resveratrol (C+T y AG+T). Este resultado sugiere que el resveratrol induce un efecto restaurador en la homeostasis del metabolismo de colesterol total y LDL a nivel sistémico, tanto en una dieta control (CR) como en una dieta alta en grasa (AGR), ante la administración con tunicamicina.

## **B) COLESTEROL HDL**

Por otro lado, respecto a la concentración sérica de colesterol HDL, se observó que entre los grupos no administrados con tunicamicina, el grupo (AG) presentó la mayor concentración, seguido por el grupo (C), el grupo (CR) y finalmente el grupo (AGR), entre los cuales no hubo diferencia significativa. El rango normal de colesterol HDL para esta cepa no ha sido caracterizado en su totalidad.

Por lo tanto, ni el consumo de la dieta alta en grasa ni la suplementación con resveratrol modificaron la concentración de colesterol HDL sérico.

Adicionalmente, respecto a los animales que recibieron la administración con tunicamicina, se observó que el grupo (AG+T) presentó un incremento significativo en la concentración de colesterol HDL respecto a los grupos (C+T) y (CR+T), más no con el grupo (AGR+T); a su vez, el grupo (AGR+T) también presentó un incremento significativo respecto a los grupos (C+T) y (CR+T); mientras que los grupos (C+T) y (CR+T) no presentaron diferencia significativa entre sí. Por otro lado, los grupos (C+T), (CR+T) y (AG+T) presentaron una disminución significativa respecto a los grupos (C), (CR) y (AG); mientras que el grupo (AGR+T) no presentó una diferencia significativa respecto al grupo (AGR).

La administración de tunicamicina redujo de forma significativa la concentración de colesterol HDL en los grupos no suplementados con resveratrol (C+T y AG+T). Sin embargo, la suplementación de resveratrol indujo un efecto regulador no modificó la concentración de colesterol HDL ante la administración de en los animales alimentados con una dieta alta en grasa (AGR).

## A) TRIGLICÉRIDOS

En los grupos dietarios de ratones que no fueron tratados con tunicamicina, el grupo (AG) presentó la mayor concentración, seguido por los grupos (AGR), (C) y (CR), entre los cuales no hubo diferencia significativa. Todos los grupos presentaron valores normales de acuerdo al rango establecido (40-62 mg/dL) [107].

Por lo tanto, la dieta alta en grasa (AG) administrada a ratones C57BL/6 durante 28 semanas no indujo cambios significativos en la concentración sérica de triglicéridos. Por otro lado, la suplementación con resveratrol no modificó la concentración de triglicéridos séricos, ni en el grupo alimentado con la dieta control ni en el grupo alimentado con la dieta alta en grasa.

Por otro lado, en los animales a los cuales se les administró tunicamicina, se observó que el grupo (CR+T) presentó un incremento significativo respecto a los grupos (C+T) y (AG+T), más no con el grupo (AGR+T); a su vez el grupo (AGR+T) presentó diferencia significativa respecto a los grupos (C+T) y (AG+T), que no presentaron diferencia significativa entre sí. Los grupos (CR+T) y (AGR+T) presentaron valores dentro del rango normal descrito; a diferencia de los grupos (C+T) y (AG+T) que presentaron valores inferiores al rango normal descrito (40-62 mg/dL). Por otro lado, se observa que los grupos (C+T) y (AG+T) presentaron una disminución significativa respecto a los grupos (C) y (AG); a diferencia de los grupos (CR+T) y (AGR+T) que no presentaron diferencia significativa respecto a los grupos (CR) y (AGR).

La administración de tunicamicina disminuyó la concentración sérica de triglicéridos en los grupos no suplementados con resveratrol (C+T) y (AG+T). Mientras que, la suplementación de resveratrol la concentración de triglicéridos séricos ante la administración de tunicamicina, tanto en los animales alimentados con la dieta alta en grasa (AGR+T) como los alimentados con la dieta control (CR+T), y la concentración de este parámetro se mantuvo dentro del rango normal de valores para estos grupos, a diferencia de los grupos no suplementados con resveratrol (C+T) y (AG+T).

## **CON LA ADMINISTRACIÓN DE TUNICAMICINA, LOS PARÁMETROS DE FUNCIÓN HEPÁTICA SE MANTUVIERON EN CONCENTRACIONES NORMALES EN LOS GRUPOS SUPLEMENTADOS CON RESVERATROL**

La elevación de las enzimas aminotransferasas hepáticas se determinaron, por un lado, para observar si la suplementación con resveratrol generaba hepatotoxicidad como efecto secundario, y por otro lado, como parámetro comparativo para correlacionar las condiciones hepáticas con las condiciones renales que se presentaron en nuestro modelo experimental, y ver si el resveratrol mostraba algún efecto benéfico en ello. Esto es debido a que la elevación de las transaminasas hepáticas indican que hay inflamación o lesión en las células hepáticas, y por lo tanto, la concentración de ALT y AST se eleva tanto en los casos de hepatotoxicidad como durante el establecimiento de esteatosis hepática asociada a obesidad.

En los resultados obtenidos de la concentración sérica de enzimas aminotransferasas hepáticas ALT y AST, entre los grupos no administrados con tunicamicina, el grupo que presentó las mayores concentraciones fue el grupo (AG), seguido por el grupo (C), (CR), y finalmente el grupo (AGR), entre los cuales no hubo diferencia significativa. Todos los grupos presentaron valores dentro de los rangos normales descritos (ALT= 20-129 U/L; AST= 46-342 U/L) excepto por la concentración de ALT del grupo (AG), que presentó valores por arriba del rango determinado.

El consumo de una dieta alta en grasa (AG) indujo una elevación en la concentración sérica de tanto de ALT como de AST, y presentó niveles fuera del rango normal descrito en el caso de las enzimas ALT aunque el incremento no fue significativo. Por otro lado, la suplementación resveratrol presentó una tendencia a disminuir los niveles en enzimas ALT en el grupo alimentado con la dieta alta en grasa (AGR) respecto al grupo no suplementado (AG), aunque la disminución no fue significativa.

Adicionalmente, respecto a los grupos tratados con tunicamicina, se observó que el grupo (AG+T) presentó el valor más elevado en la concentración de ALT, seguido por los grupos (AGR+T), (C+T) y (CR+T). Los grupos (C+T), (AG+T) y (AGR+T) se encontraron por arriba del rango normal establecido (20-120 U/L) [105], y ninguno de los grupos presentó diferencia significativa. Por otro lado, todos los grupos presentaron un incremento en la concentración respecto a los grupos sin tunicamicina, siendo esta más marcada entre el grupo (AG+T) respecto a (AG). Sin embargo, ningún incremento fue significativo.

La administración de tunicamicina incrementó la concentración de enzimas ALT en todos los grupos (C+T, CR+T, AG+T y AGR+T). Sin embargo, la suplementación resveratrol presentó una tendencia a disminuir los niveles de enzimas ALT ante la administración de tunicamicina en el grupo alimentado con la dieta alta en grasa (AGR+T) respecto al grupo no suplementado (AG+T), aunque la disminución no fue significativa.

En el caso de la concentración sérica de enzimas AST de los grupos tratados con tunicamicina, se observó que el grupo (AG+T) presentó el valor mayor, seguido por los grupos (AGR+T), (C+T) y (CR+T); ninguno de los grupos presentó diferencia significativa. Los grupos (C+T), (CR+T) y (AGR+T) presentaron valores dentro del rango normal descrito [105], mientras que el grupo (AG+T) presentó valores por arriba del rango normal. Por otro lado, todos los grupos presentaron una tendencia a incrementar ante el tratamiento con tunicamicina respecto a los grupos sin tunicamicina, sin embargo, ningún incremento fue significativo.

La administración de tunicamicina incrementó la concentración de enzimas AST en todos los grupos (C+T, CR+T, AG+T y AGR+T), y la suplementación con resveratrol incrementó en menor cantidad la concentración de enzimas AST séricas ante la inducción con tunicamicina respecto a los grupos sin tunicamicina en ambas dietas (CR+T y AGR+T), sin embargo, no indujo un cambio significativo respecto a los grupos no suplementados con resveratrol.

## **EL RESVERATROL MANTUVO LOS PARÁMETROS DE FUNCIÓN RENAL EN CONCENTRACIONES NORMALES ANTE LA ADMINISTRACIÓN DE TUNICAMICINA**

### **A) CREATININA**

La creatinina es un subproducto químico del metabolismo de creatina en músculo. Este metabolito se elimina por los riñones, y cuando la función renal es anormal, los niveles de creatinina se ven incrementados en sangre. Es por ello que se midió la concentración sérica de creatinina como un parámetro sistémico de función renal [108].

En los resultados obtenidos para la concentración de creatinina en suero entre los grupos no tratados con tunicamicina, se observó que el grupo (AG) presentó la mayor concentración de creatinina, seguido por los grupos (C), (CR) y (AGR); sin embargo, ninguno de los grupos presentó diferencia significativa. Los grupos (C), (CR) y (AGR) presentaron valores dentro del rango normal descrito; a diferencia del grupo (AG), que presentó valores mayores al rango normal publicado (0.2 a 0.56 mg/dL) [105].

El grupo alimentado con la dieta alta en grasa (AG) presentó el mayor valor de creatinina sérica respecto a los demás grupos (C, CR y AGR), aunque no presentó diferencia significativa, pero tuvo una concentración mayor al rango normal descrito. Sin embargo, la suplementación con resveratrol presentó una tendencia a disminuir la concentración de creatinina sérica en la dieta alta en grasa (AGR) respecto al grupo no suplementado (AG), sin embargo no indujo un cambio significativo.

Por otro lado, en la comparación entre los grupos administrados con tunicamicina, se observó que el grupo (AG+T) presentó la mayor concentración de creatinina sérica, seguido por los grupos (C+T), (CR+T) y (AGR+T), y sólo presentó diferencia significativa respecto al grupo (AGR+T); por su lado, los grupos (C+T), (CR+T) y (AGR+T), no presentaron diferencia significativa entre sí. Todos los grupos presentaron valores mayores al rango normal descrito [105]. Así mismo, todos los grupos administrados con tunicamicina presentaron una tendencia a incrementar los valores de creatinina sérica respecto a los grupos no tratados con tunicamicina, siendo el incremento menos marcado el que se presentó entre el grupo (AGR+T) respecto al grupo (AGR), sin embargo, este incremento no fue significativo en ninguno de los grupos.

La administración de tunicamicina presentó una tendencia a incrementar la concentración de sérica en todos los grupos (C+T, CR+T, AG+T y AGR+T). La suplementación con resveratrol disminuyó la concentración de creatinina sérica en el grupo alimentado con la dieta alta en grasa (AGR+T) respecto al grupo no suplementado (AG+T) ante la administración de tunicamicina.

## **B) ALBÚMINA**

La albúmina es una proteína sintetizada por el hígado, que se encuentra circulante en suero. La hipoalbuminemia en sangre es una de las consecuencias de la disfunción renal, dado que los individuos que padecen nefropatías presentan proteinuria, y la principal proteína excretada en este tipo de pacientes es la albúmina [108]. Es por ello que se determinó la concentración de albúmina como un parámetro de función renal. Por otro lado, al ser una proteína sintetizada por el hígado, la otra posible causa de hipoalbuminemia es el daño hepático, por lo que también es un parámetro de función hepática [109].

En la concentración de albúmina sérica, se observó que los grupos (C), (CR) y (AGR) presentaron valores muy similares dentro del rango normal descrito; a diferencia del grupo (AG) que presentó una concentración ligeramente menor al rango normal publicado (22-42 g/L) [110]. Ningún grupo presentó diferencia significativa.

El grupo alimentado con la dieta alta en grasa (AG) presentó la menor concentración de albúmina sérica, mostrándose por debajo del rango normal descrito, aunque no presentó diferencia significativa respecto los demás grupos. La suplementación con resveratrol presentó una tendencia a incrementar la concentración de albúmina en el grupo alimentado con la dieta alta en grasa (AGR) respecto al grupo no suplementado (AG), y mantuvo la concentración dentro del rango normal, sin embargo, la diferencia no fue significativa.

Ahora, respecto a los grupos administrados con tunicamicina, se observa que el grupo (CR+T) presentó un valor muy similar al grupo (AGR+T) en la concentración de albúmina sérica, y ambos se mantuvieron dentro del rango normal descrito; sin embargo, los grupos (C+T) y (AG+T) presentaron valores ligeramente por debajo del rango normal de valores descritos, aunque ningún grupo presentó diferencia significativa. Por otro lado, se observa que los grupos (C+T) y (AG+T) presentaron una tendencia a disminuir la concentración de albúmina sérica respecto a los grupos (C) y (AG), aunque no fue significativa; a diferencia de los grupos (CR+T) y (AGR+T) mantuvieron concentraciones muy similares respecto a los grupos (CR) y (AGR).

La administración de tunicamicina presentó una tendencia a disminuir la concentración de albúmina de los grupos no suplementados (C+T y AG+T). Mientras que, en la suplementación con resveratrol, tanto en una dieta control (CR+T) como en una dieta alta grasa (AGR+T), la concentración de albúmina se mantuvo en valores muy similares y dentro del rango normal descrito a pesar de la administración de tunicamicina.

## **B) PARÁMETROS HORMONALES EN SUERO**

Para evaluar el efecto del resveratrol en el metabolismo a nivel sistémico también se evaluaron diversos parámetros hormonales en suero por medio de ELISA, cuyos datos se presentan en la **TABLA 9**. La determinación de estos parámetros se llevó a cabo al finalizar las 28 semanas de tratamiento dietario, 8 horas después de la administración con una dosis única de tunicamicina para inducir el estrés del RE de forma farmacológica.

**TABLA 9.** Efecto de la suplementación con resveratrol en parámetros hormonales séricos de ratones C57BL/6 alimentados con una dieta control (AIN-93M) o una dieta alta en grasa (45% Kcal grasa saturada) por 28 semanas, con y sin la administración de tunicamicina (Tun) 8 horas previas a la eutanasia

Adiponect.= Adiponectina; HMW= Alto peso molecular.

n= 5 para cada grupo experimental. Diferentes letras representan diferencia significativa (a>b>c>d). ANOVA Fisher's LSD p < 0.05

Parámetro/ Tratamiento	Control (C)	Control + Tun (C+T)	Control + Rsv (CR)	Control + Rsv + Tun (CR+T)	Alta en grasa (AG)	Alta en grasa + Tun (AG+T)	Alta en grasa + Rsv (AGR)	Alta en grasa + Rsv + Tun (AGR+T)
<b>Insulina (ng/mL)</b>	0.088 ± 0.02 <sup>d</sup>	0.10 ± 0.04 <sup>d</sup>	0.060 ± 0.04 <sup>d</sup>	0.202 ± 0.04 <sup>c,d</sup>	2.05 ± 0.158 <sup>a,b</sup>	2.737 ± 0.656 <sup>a</sup>	1.29 ± 0.09 <sup>c</sup>	1.638 ± 0.3 <sup>b,c</sup>
<b>Adiponect. total (µg/mL)</b>	27.41 ± 1.89 <sup>a,b</sup>	26.87 ± 2.1 <sup>c</sup>	22.58 ± 2.16 <sup>b,c</sup>	27.57 ± 1.11 <sup>b,c</sup>	23.99 ± 3.35 <sup>a</sup>	22.54 ± 2.38 <sup>b,c</sup>	24.45 ± 1.18 <sup>b,c</sup>	26.31 ± 0.9 <sup>b,c</sup>
<b>Adiponect. HMW (µg/mL)</b>	17.2 ± 1.49 <sup>a</sup>	17.58 ± 2.04 <sup>a</sup>	14.08 ± 1.52 <sup>b,c</sup>	17.83 ± 0.86 <sup>a,b</sup>	12.45 ± 1.67 <sup>c</sup>	11.71 ± 0.92 <sup>c</sup>	18.49 ± 1.59 <sup>a</sup>	18.25 ± 1.6 <sup>a,b</sup>
<b>%HMW/ Adiponect. total</b>	62.57 ± 2.37 <sup>b</sup>	64.9 ± 3.3 <sup>b</sup>	63.29 ± 6.11 <sup>b</sup>	65 ± 3.5 <sup>a,b</sup>	57.85 ± 3.85 <sup>b</sup>	53.25 ± 4.14 <sup>b</sup>	75.27 ± 4.34 <sup>a</sup>	76.36 ± 5.27 <sup>a</sup>
<b>Leptina (ng/mL)</b>	23.17 ± 1.4 <sup>c,d</sup>	30.5 ± 2.2 <sup>b,c</sup>	17.07 ± 2.23 <sup>d</sup>	34.74 ± 4.22 <sup>b,c</sup>	36.98 ± 5.29 <sup>b</sup>	56.77 ± 10.27 <sup>a</sup>	25.3 ± 2.54 <sup>b,c</sup>	37.79 ± 3.91 <sup>b</sup>

## LA ALIMENTACIÓN CON UNA DIETA ALTA EN GRASA INCREMENTÓ LA CONCENTRACIÓN DE INSULINA EN SUERO Y LA SUPLEMENTACIÓN CON RESVERATROL DISMINUYÓ ESTE INCREMENTO

Es muy común que la intolerancia a la glucosa se asocie con el desarrollo de resistencia a la insulina [111], y se ha demostrado que la resistencia a la insulina tiene un papel importante en el daño renal mediado por acumulación ectópica de lípidos [112]. Así mismo, se sabe que el estrés del RE es un importante mediador del desarrollo de resistencia a la insulina [113].

En la prueba de tolerancia a la glucosa se observó que los grupos (AG) y (AGR) presentaron intolerancia a la glucosa por el consumo de una dieta alta en grasa y que el resveratrol no presentó ningún efecto. Ahora, se midió la concentración de insulina con la finalidad de ver si el consumo de la dieta alta en grasa o la administración de tunicamicina provocaron hiperinsulinemia en ayuno (que se asocia con resistencia a la insulina) y si el resveratrol tuvo algún efecto sobre la concentración de insulina.

En los resultados presentados en la **TABLA 9** se observa que, entre los grupos no tratados con tunicamicina, los grupos (C) y (CR) presentaron valores muy similares en la concentración sérica de insulina, mientras que, los grupos (AG) y (AGR) también presentaron concentraciones cercanas entre sí. El grupo (AG) presentó el valor mayor, y presentó un incremento significativo en la concentración de insulina respecto a los grupos (AGR), (CR) y (C); y, a su vez, el grupo (AGR) presentó un incremento significativo respecto a los grupos (C) y (CR), que no presentaron diferencia significativa entre sí. El rango normal para este parámetro en ratones C57BL/6 no ha sido descrito aún, sin embargo, en los resultados obtenidos se observa que la concentración de los grupos (AG) y (AGR) fue entre 8 y 10 veces más alta que la de los grupos (C) y (CR).

Por lo tanto, el consumo de la dieta alta en grasa provocó un incremento significativo en la concentración sérica de insulina, tanto en el grupo (AG) como en el grupo (AGR). Sin embargo, la suplementación con resveratrol disminuyó de forma significativa la concentración de insulina sérica en el grupo alimentado con la dieta alta en grasa (AGR) respecto a la dieta no suplementada (AG).

Por otra parte, entre los resultados de los grupos administrados con tunicamicina, se observó que los grupos (C+T) y (CR+T) presentaron valores de concentración de insulina sérica similares; mientras que, los grupos (AG+T) y (AGR+T) también presentaron concentraciones similares entre sí, aunque los grupos (AG+T) y (AGR+T) presentaron concentraciones entre 10 y 20 veces más altas que los grupos (C+T) y (CR+T). Se presentó que el valor mayor de concentración fue del grupo (AG+T), que presentó un incremento significativo respecto a los grupos (AGR+T), (C+T) y (CR+T); a su vez, el grupo (AGR+T) presentó un incremento significativo respecto el grupo (C+T), más no respecto al grupo (CR+T); y, finalmente, los grupos (C+T) y (CR+T) no presentaron diferencia significativa entre sí. Por otro lado, todos los grupos tuvieron una tendencia a incrementar la concentración de insulina ante la administración de tunicamicina respecto a los grupos no administrados, siendo más marcada la diferencia entre el grupo (AG+T) respecto al grupo (AG), aunque ningún incremento fue significativo.

La administración de tunicamicina presentó una tendencia a incrementar la concentración de insulina de todos los grupos (C+T, CR+T, AG+T y AGR+T), aunque ninguna fue significativa. Por otro lado, la suplementación con resveratrol presentó un incremento significativamente menor en la concentración de insulina ante la administración de tunicamicina en el grupo alimentado con la dieta alta en grasa (AGR) respecto al grupo no suplementado (AG).

### **LA CONCENTRACIÓN DE LEPTINA INCREMENTÓ EN EL GRUPO DE ANIMALES ALIMENTADOS CON LA DIETA ALTA EN GRASA ANTE LA ADMINISTRACIÓN DE TUNICAMICINA Y LA SUPLEMENTACIÓN CON RESVERTROL PREVINO ESTE INCREMENTO**

La leptina es una hormonas secretada por el tejido adiposo, que juega un papel muy importante en la regulación de la ingesta de alimento y la sensación de saciedad [114]. Se ha demostrado que en la obesidad, la concentración de leptina se encuentra elevada por el desarrollo de un fenómeno denominado como “resistencia a la leptina”, que influye en el desarrollo y progreso de la obesidad [114]. Así mismo, se sabe que la hiperleptinemia está asociada con el desarrollo de diversas lesiones presentes en la enfermedad renal crónica [115]. El estrés del RE ha demostrado estar involucrado en el desarrollo de resistencia a la leptina [116].

En los resultados presentados en la **TABLA 9** se observa que, entre los grupos no tratados con tunicamicina, el grupo (AG) presentó el valor más alto, y presentó un incremento significativo en la concentración de leptina respecto a los grupos (C) y (CR), más no respecto al grupo (AGR); y, a su vez, el grupo (AGR) presentó un incremento significativo respecto al grupo (CR), más no respecto al grupo (C); y finalmente, los grupos (C) y (CR) no presentaron diferencia significativa entre sí.

La alimentación con una dieta alta en grasa (AG) provocó un incremento significativo en la concentración de leptina respecto al grupo control (C). Sin embargo, con la suplementación de resveratrol se previno el incremento en la concentración de leptina en el grupo alimentado con la dieta alta en grasa (AGR).

Ahora, entre los resultados de los grupos administrados con tunicamicina, se muestra que el grupo (AG+T) presentó un incremento significativo respecto a los grupos (C+T), (CR+T) y (AGR+T); a su vez, los grupos (C+T), (CR+T) y (AGR+T) no presentaron diferencia significativa entre sí. Por otro lado, los grupos (CR+T) y (AG+T) presentaron un incremento significativo respecto a los grupos (C) y (AG); a diferencia de los grupos (CR+T) y (AGR+T) que no presentaron diferencia significativa respecto a los grupos (CR) y (AGR).

La administración de tunicamicina incrementó significativamente la concentración de leptina en los grupos no suplementados (C+T y AG+T). Sin embargo, la suplementación con resveratrol previno el incremento de la concentración de leptina ante la administración de tunicamicina en el grupo alimentado con la dieta alta en grasa (AGR+T), a diferencia del grupo no suplementado (AG+T).

## **EL RESVERATROL INCREMENTÓ EL PORCENTAJE DE ADIPONECTINA HMW RESPECTO A LA CONCENTRACIÓN DE ADIPONECTINA DE TOTAL EN UNA DIETA ALTA EN GRASA**

La adiponectina es una hormona sintetizada por el tejido adiposo que tiene diversos efectos metabólicos benéficos, como el incremento en la sensibilidad a la insulina, la modulación de respuestas inflamatorias, etc. Se ha descrito que niveles bajos de adiponectina o una proporción disminuida de la isoforma de alto peso molecular están asociadas con el desarrollo de resistencia a la insulina y síndrome metabólico [117]. Así mismo, la hipoadiponectinemia se ha descrito como un factor importante en el desarrollo de la enfermedad crónica [118]. Y se ha demostrado también que el estrés del RE induce hipoadiponectinemia, por lo que es un posible mecanismo de esta alteración metabólica [119]. Por esta situación se consideró importante estudiar el efecto del resveratrol en la síntesis de adiponectina total y en la proporción de adiponectina de alto peso molecular.

### **A) ADIPONECTINA TOTAL**

En los resultados obtenidos en la concentración de adiponectina total en suero, tanto en los grupo tratados como no tratados con tunicamicina, se observa que todos los valores presentaron valores muy similares y ninguno de ellos presentó una diferencia significativa entre sí.

Por lo tanto, ni la alimentación con una dieta alta en grasa, ni la suplementación con resveratrol, ni la administración de tunicamicina indujeron algún efecto sobre la concentración de adiponectina total.

### **B) ADIPONECTINA DE ALTO PESO MOLECULAR (HMW)**

En los valores de adiponectina de alto peso molecular en suero, entre los grupos no tratados con tunicamicina, se observó que el grupo que presentó una mayor concentración fue el grupo (AGR), que presentó diferencia significativa respecto a los grupos (CR) y (AG), más no respecto al grupo (C); a su vez, el grupo (C) presentó diferencia significativa respecto a los grupos (CR) y (AG); y finalmente, los grupos (CR) y (AG) no presentaron diferencia significativa entre sí.

El consumo de una dieta alta en grasa (AG) provocó una reducción significativa de la concentración de adiponectina de alto peso molecular respecto al grupo control (C). Y, por el contrario, la suplementación con resveratrol incrementó de forma significativa la concentración de la misma en el grupo alimentado con la dieta alta en grasa (AGR) respecto al grupo no suplementado (AG).

Ahora, respecto a los grupos administrados con tunicamicina, se observó que el grupo con la concentración mayor de adiponectina de alto peso molecular fue el grupo (AGR+T), que presentó diferencia significativa respecto al grupo (AG+T), más no respecto a los grupos (C+T) y (CR+T); a su vez, los grupos (C+T) y (CR+T) presentaron diferencia significativa respecto al grupo (AG+T), más no entre sí. Por otro lado, se observó que el grupo (CR+T) presentó un incremento en la concentración de adiponectina HMW respecto al grupo (CR), a pesar de no ser significativa; mientras que los grupos (C+T), (AG+T) y (AGR+T) no modificaron la concentración de adiponectina respecto a los grupos (C), (AG) y (AGR).

La administración de tunicamicina no presentó efecto en la concentración de adiponectina HMW en suero.

### **C) RELACIÓN ADIPONECTINA HMW/TOTAL**

En los valores del porcentaje de adiponectina de alto peso molecular respecto de adiponectina total en suero, entre los grupos no tratados con tunicamicina, se observó que el grupo que presentó una mayor concentración fue el grupo (AGR), que presentó diferencias significativas respecto a los grupos (C), (CR) y (AG), que a su vez no presentaron diferencias significativas entre sí.

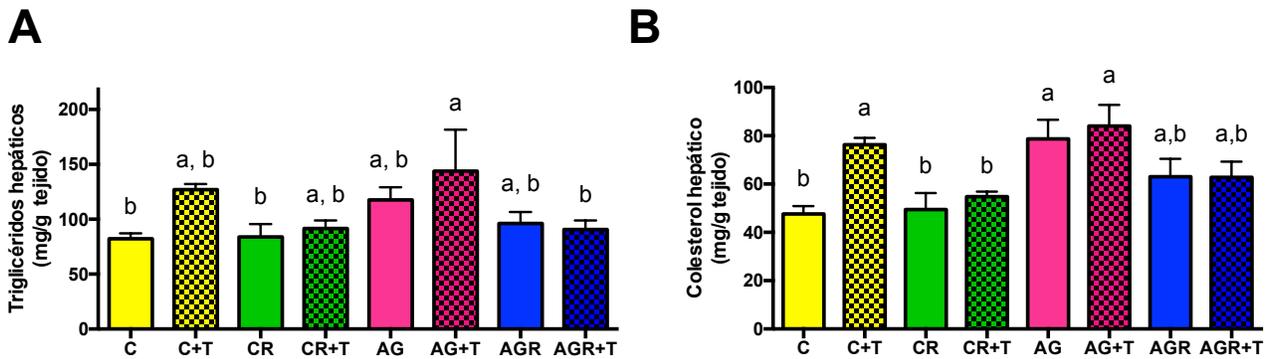
Por lo tanto, el consumo de una dieta alta en grasa (AG) presentó una tendencia a reducir el porcentaje de adiponectina de alto peso molecular respecto a la adiponectina total, aunque no tuvo diferencia significativa. Por otro lado, la suplementación de resveratrol indujo un incremento en el porcentaje de adiponectina de alto peso molecular en la dieta alta en grasa (AGR) respecto al grupo no suplementado (AG) y respecto al grupo control (C).

En los grupos administrados con tunicamicina se observó que el grupo con mayor porcentaje de adiponectina de alto peso molecular fue (AGR+T), que presentó diferencias significativas respecto a los grupos (C+T) y (AG+T), más no respecto al grupo (CR+T); a su vez, los grupos (C+T), (CR+T) y (AG+T) no presentaron diferencia significativa entre sí. Por otro lado, únicamente el grupo (AG+T) presentó una ligera disminución no significativa respecto al grupo (AG), los grupos (C+T), (CR+T) y (AGR+T) presentaron valores muy similares en el porcentaje de adiponectina HMW respecto a los grupos (C), (CR) y (AGR).

La administración de tunicamicina no indujo ningún cambio en el porcentaje de adiponectina HMW, y la suplementación con resveratrol no tuvo ningún efecto en ninguna de las dietas utilizadas ante la administración de tunicamicina.

### **8.5 LA DIETA ALTA EN GRASA Y LA TUNICAMICINA INCREMENTARON EL CONTENIDO DE COLESTEROL Y DE TRIGLICÉRIDOS EN TEJIDO HEPÁTICO, Y LA SUPLEMENTACIÓN CON RESVERATROL LO PREVINO**

Con la finalidad de validar nuestro modelo de obesidad inducida por dieta, se determinó el contenido de triglicéridos y colesterol en tejido hepático (**FIGURA13**) antes de comenzar con las determinaciones en tejido renal.



**FIGURA 13.** Efecto del resveratrol en el contenido de lípidos en el tejido hepático de ratones C57BL/6 alimentados durante 28 semanas con una dieta control (AIN-93M) o alta en grasa (45% Kcal), con y sin la administración de tunicamicina 8 horas previas a la eutanasia **A.** Contenido de triglicéridos en tejido hepático **B.** Contenido de colesterol en tejido hepático n= 5 muestras para cada grupo experimental. Diferentes letras representan diferencia significativa (a>b). ANOVA Fisher's LSD p < 0.05

En la **FIGURA 13A** se observó que, entre los grupos no administrados con tunicamicina, el mayor contenido de triglicéridos en tejido renal lo presentó el grupo (AG), aunque no hubo diferencia significativa entre ninguno de los grupos. Así mismo, en la **FIGURA 13B**, se observó que nuevamente el grupo (AG) presentó el mayor contenido de colesterol, el cual presentó un incremento significativo respecto a los grupos (C) y (CR); a su vez, los grupos (C), (CR) y (AGR) no presentaron diferencias significativas entre sí.

Por lo tanto, se observó que la dieta alta en grasa (AG) indujo un incremento tanto en la concentración de triglicéridos y de colesterol en tejido hepático respecto al grupo (C). Mientras que, el grupo alimentado con la dieta alta en grasa suplementado con resveratrol presentó un comportamiento similar al grupo alimentado con la dieta control (C), y presentó una disminución significativa en la concentración de colesterol a nivel hepático respecto al grupo (AG).

Ahora, en los grupos administrados con tunicamicina, se observó que el grupo que presentó el mayor contenido de triglicéridos a nivel hepático fue el grupo (AG+T), el cual presentó un incremento significativo respecto a los grupos (AGR+T); que a su vez, no presentó diferencias significativas respecto a los grupos (C+T) y (CR+T). Así mismo, se observó que los grupos (C+T) y (AG+T) presentaron una tendencia a incrementar el contenido de triglicéridos respecto a los grupos (C) y (AG), aunque no fue significativa; mientras que, los grupos (CR+T) y (AGR+T) no presentaron variación en el contenido de triglicéridos respecto a los grupos (CR) y (AGR).

Por otro lado, se observó que el grupo que presentó el mayor contenido de colesterol a nivel hepático fue el grupo (AG+T), el cual presentó un incremento significativo respecto a los grupos (CR+T); que a su vez, no presentó diferencias significativas respecto al grupo (AGR+T). Así mismo, se observó que los grupos (C+T) y (AG+T) presentaron una tendencia a incrementar el contenido de colesterol respecto a los grupos (C) y (AG), aunque no fue significativa; mientras que, los grupos (CR+T) y (AGR+T) no presentaron variación en el contenido de colesterol respecto a los grupos (CR) y (AGR).

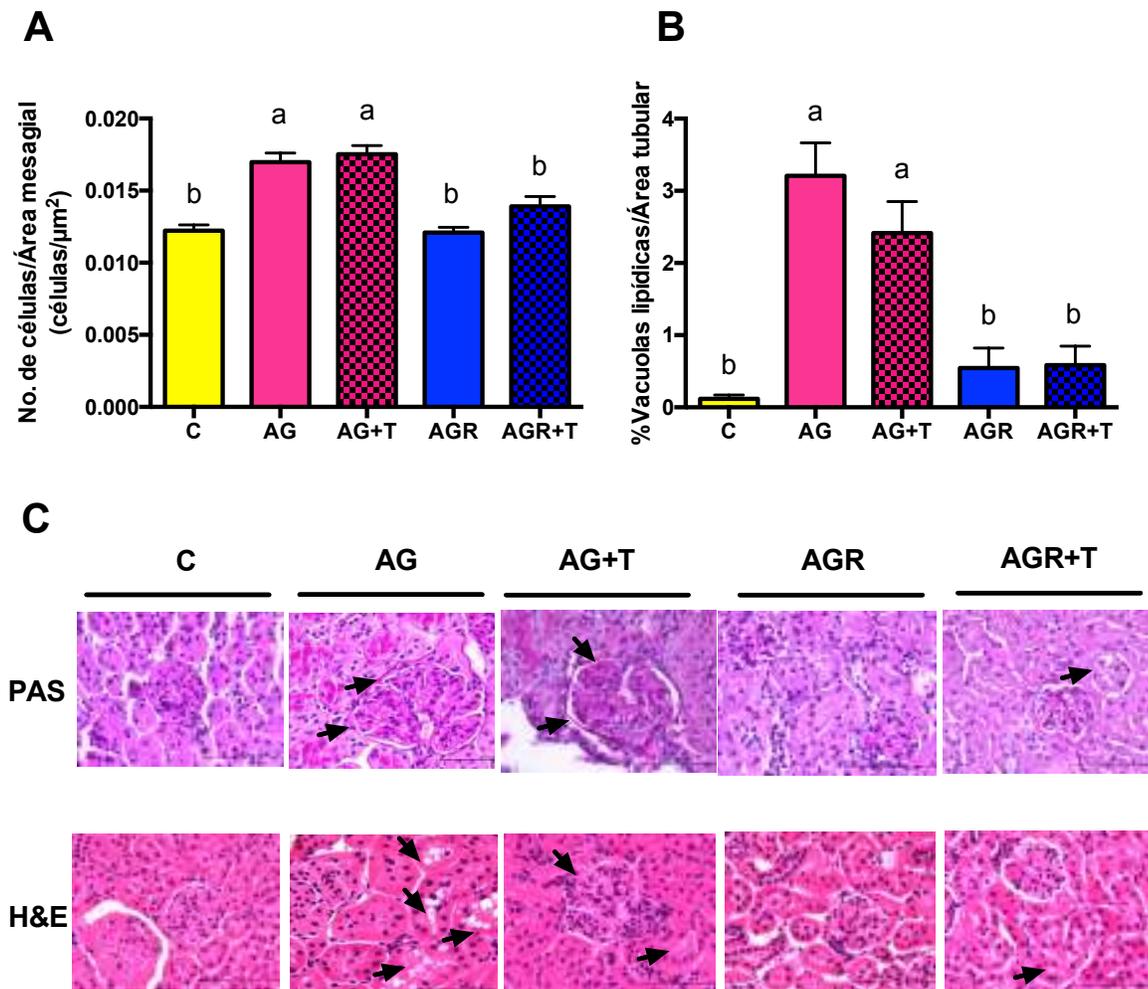
Por lo tanto, se presentó que la administración de tunicamicina indujo una tendencia a incrementar el contenido de triglicéridos y de colesterol a nivel hepático en los grupos no suplementados (C+T) y (AG+T), aunque no fue significativo. Mientras que, en los grupos suplementados con resveratrol, (CR+T) y (AGR+T), no se presentaron diferencias ni en el contenido de triglicéridos ni en el contenido de colesterol respecto a los grupos sin tunicamicina (CR) y (AGR).

#### **8.6 LOS GRUPOS ALIMENTADOS CON LA DIETA ALTA EN GRASA, CON Y SIN LA ADMINISTRACIÓN DE TUNICAMICINA, DESARROLLARON HIPERCELULARIDAD MESANGIAL EN GLOMÉRULOS RENALES Y VACUOLIZACIÓN LIPÍDICA EN TÚBULOS PROXIMALES Y LA SUPLEMENTACIÓN CON RESVERATROL PREVIENE EL DESARROLLO DE ESTAS LESIONES**

Después de observar que la suplementación con resveratrol a nivel sistémico indujo diversos efectos benéficos, se decidió comenzar a evaluar el efecto del resveratrol a nivel renal, a partir del análisis morfológico cuantitativo de marcadores de daño renal.

Para evaluar el efecto de resveratrol en el daño glomerular causado por el consumo de una dieta alta en grasa, se determinó el área de la matriz mesangial y la celularidad por área en 10 glomérulos al azar para cada una de las muestras, con el fin de determinar la celularidad mesangial, cuyo resultado se presenta en las **FIGURAS 14A y 14C**. La hiper celularidad mesangial es un tipo de glomerulonefritis mesangial proliferativa que está asociada con el desarrollo de síndrome nefrótico, y es un tipo de lesión glomerular, por ello se utilizó este parámetro como marcador de daño glomerular.

Así mismo, para evaluar de forma cuantitativa la acumulación lipídica en túbulos proximales se determinó el porcentaje del área ocupada por la acumulación de vacuolas lipídicas respecto al área total de los túbulos proximales en 25 túbulos proximales al azar para cada una de las muestras, cuyo resultado se muestra en las **FIGURAS 14B Y 14C**.



**FIGURA 14.** Efecto del resveratrol en el análisis morfométrico histológico del riñón de ratones C57BL/6 alimentados con una dieta control (AIN-93M), alta en grasa (45% Kcal) durante 28 semanas, con o sin la administración de tunicamicina 8 horas previas a la eutanasia **A.** Gráfico comparativo del análisis morfométrico para la determinación de celularidad mesangial **B.** Gráfico comparativo del análisis morfométrico para la determinación del porcentaje de ocupación de área por vacuolización lipídica en túbulos proximales **C.** Fotomicrografías respresentativas a una magnitud x40 de las tinciones H&E y PAS en tejido renal para la representación visual de los dos parámetros de daño renal evaluados: expansión mesangial y vacuolización lipídica en túbulos proximales n= 5 muestras para cada grupo experimental. 10 glomérulos y 25 túbulos proximales analizados por muestra. Diferentes letras representan diferencia significativa (a>b). ANOVA Fisher's LSD p < 0.05

En la **FIGURA 14A** se observó que entre los grupos no administrados con tunicamicina, el grupo (AG) presentó hiper celularidad mesangial respecto a los grupos (C) y (AGR); a su vez, los grupos (C) y (AGR) no presentaron diferencia significativa entre sí. Por otro lado, en las fotomicrografías presentadas en la **FIGURA 14C** se observó que en el grupo (AG) la pared glomerular se encontró más difusa e irregular y que la matriz mesangial se percibió más extendida y con proliferación celular. A diferencia del grupo (C) y (AGR), que presentaron glomérulos con paredes bien definidas y regulares, y con una menor cantidad de células mesangiales.

Por lo tanto, el consumo de una dieta alta en grasa (AG) indujo el desarrollo de hipercelularidad mesangial y presentó diversas lesiones glomerulares respecto al grupo alimentado con la dieta control (C); a diferencia del grupo que fue suplementado con resveratrol y alimentado con una dieta alta en grasa (AGR), que no presentó alteraciones glomerulares ni diferencia significativa en el valor de celularidad mesangial respecto al grupo alimentado con la dieta (C).

Entre los grupos administrados con tunicamicina, el grupo (AG+T) presentó hipercelularidad mesangial, y presentó un incremento significativo respecto al grupo (AGR+T), que a su vez, no presentó diferencia significativa respecto al grupo (C). En la comparación entre los grupos con y sin tunicamicina, no se observó una tendencia. Por otro lado, en las fotomicrografías presentadas se observó que en el grupo (AG+T) la pared glomerular se encontró aún más difusa e irregular que en el grupo (AG) y que la matriz mesangial se percibe aún más extendida. A diferencia del grupo (AGR+T), que presentaron glomérulos con una menor cantidad de células mesangiales, y con paredes más definidas y regulares respecto al grupo (AG+T), aunque ligeramente más difusas respecto al grupo (AGR).

La administración con tunicamicina no modificó de forma significativa el parámetro cuantitativo de celularidad mesangial ni en el grupo (AG+T) ni en el grupo (AGR+T), sin embargo, si indujo lesiones glomerulares más marcadas en el grupo (AG+T) respecto al grupo (AG). Por otro lado, el grupo (AGR+T) nuevamente no presentó diferencia significativa respecto al grupo alimentado con la dieta control (C), ni presentó lesiones glomerulares observables en las fotomicrografías.

En las **FIGURAS 14B** se observó que entre los grupos no administrados con tunicamicina, el grupo (AG) presentó un incremento significativo en el porcentaje de vacuolas lipídicas presentes en los túbulos proximales respecto a los grupos (C) y (AGR); y por su parte, los grupos (C) y (AGR) no presentaron diferencia significativa entre sí. Así mismo, en la **FIGURA 14C** se observó que en el grupo (AG) los túbulos proximales no presentan alteraciones estructurales, sin embargo, si se observa la acumulación de vacuolas lipídicas en los túbulos proximales que se encuentran alrededor del glomérulo; a diferencia del grupo (AGR) en el que prácticamente no se observa la presencia de vacuolas lipídicas, y del grupo control que presenta una morfología tubular normal y sin vacuolización lipídica.

Por lo tanto, el consumo de una dieta alta en grasa (AG) indujo un incremento en la acumulación de vacuolas lipídicas en túbulos proximales respecto al grupo alimentado con la dieta control (C); a diferencia del grupo que fue suplementado con resveratrol y alimentado con una dieta alta en grasa (AGR), que no presentó diferencia significativa respecto al grupo alimentado con la dieta (C).

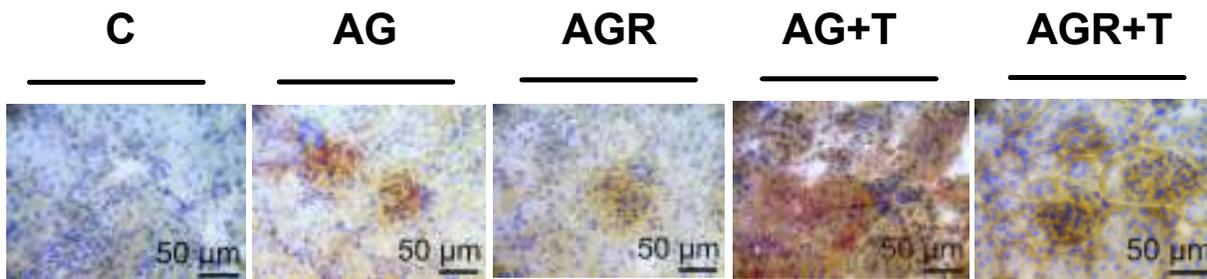
Entre los grupos administrados con tunicamicina, el grupo (AG+T) presentó el mayor porcentaje de vacuolización lipídica en túbulos proximales, y presentó un incremento significativo respecto al grupo (AGR+T), que a su vez, no presentó diferencia significativa respecto al grupo (C). Nuevamente, en la comparación entre los grupos con y si tunicamicina, no se observa una tendencia. Así mismo, en las foto micrografías, se observa que el grupo (AG+T) presenta un mayor depósito de vacuolas lipídicas que el grupo (AGR+T) y el grupo (C), aunque no muestra diferencia respecto al grupo (AG)

La administración con tunicamicina no modificó de forma significativa el porcentaje de vacuolización lipídica en el grupo (AG+T) respecto al grupo (AG). Por otra parte, el grupo suplementado con resveratrol (AGR+T) nuevamente no presentó diferencia significativa respecto al grupo alimentado con la dieta control (C) a pesar de la administración de tunicamicina, y prácticamente no presentó depósitos de vacuolas lipídicas en los túbulos proximales.

### 8.7 EL CONSUMO DE UNA DIETA ALTA EN GRASA Y LA ADMINISTRACIÓN DE TUNICAMICINA INDUJERON LA ACUMULACIÓN DE LÍPIDOS NEUTROS EN TEJIDO RENAL, Y LA SUPLEMENTACIÓN CON RESVERATROL PREVIÓ ESTA ALTERACIÓN

Después de observar que el resveratrol disminuyó de forma considerable el daño renal inducido por el consumo de una dieta alta en grasa y por la administración de tunicamicina, y que presentó una disminución significativa en la acumulación de vacuolas lipídicas en túbulos proximales, se decidió determinar el efecto del resveratrol en la acumulación de lípidos neutros a nivel renal.

Como se mencionó en los antecedentes, la acumulación ectópica de lípidos en el riñón es un importante mediador en el desarrollo de la enfermedad renal, y se ha demostrado que, tanto la obesidad [45] como el estrés del RE [16] inducen esta acumulación anormal de lípidos. Por lo tanto, para evaluar si el resveratrol tenía algún efecto en la acumulación y distribución de lípidos ectópicos neutros en tejido renal ante el consumo de una dieta alta en grasa, se llevó a cabo una tinción de rojo oleoso en cortes de riñón para los grupos alimentados con las dietas altas en grasa: (C), (AG), (AGR), (AG+T) y (AGR+T). Cuyas imágenes representativas se muestran a continuación en la **FIGURA 15**.



**FIGURA 15.** Fotomicrografías representativas a 40X de regiones glomerulares y tubulointersticiales en cortes transversales de riñón tratados con la tinción de rojo oleoso en ratones C57BL/6 alimentados con una dieta control (AIN-93M), alta en grasa (45% Kcal de grasa saturada) o alta en grasa con resveratrol durante 28 semanas ante la inducción farmacológica de estrés del RE a través de la administración de tunicamicina 8 horas previas a la eutanasia.

n= 5 para cada grupo experimental, 10 imágenes por muestra

En la **FIGURA 15** se observó que entre los grupos en los que no se administró tunicamicina, el grupo (AG) presentó la mayor acumulación de lípidos neutros, que se observaron en forma de gotas lipídicas con una tonalidad rojo-café. En este grupo los depósitos lipídicos se observan distribuidos preferencialmente al interior del glomérulo, y en menor frecuencia se observan algunas gotas dispersas en las regiones tubulointersticiales.

En el grupo (AGR) se observó que el depósito de lípidos neutros fue menor respecto al grupo (AG). En este grupo se presentaron gotas lipídicas distribuidas de forma muy dispersa en el área glomerular, y de forma aún más escasa en las regiones tubulointersticiales.

Y finalmente, en el grupo (C) no se presentó acumulación de lípidos ectópicos neutros, ni en el área glomerular ni en las regiones tubulointersticiales.

Por lo tanto, el consumo de una dieta alta en grasa (AG) provocó el depósito de gotas de lipídicas distribuidas de forma preferencial en el área glomerular y en menor grado en las regiones tubulointersticiales. Sin embargo, la suplementación con resveratrol redujo la acumulación de gotas lipídicas ectópicas en el tejido renal, tanto en el área glomerular como en las regiones tubulointersticiales en una dieta alta en grasa (AGR).

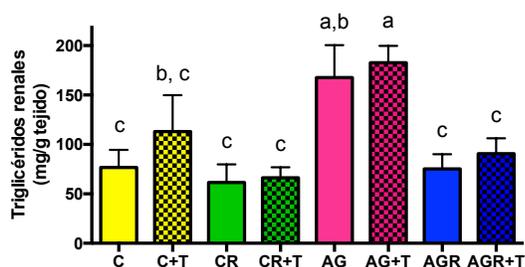
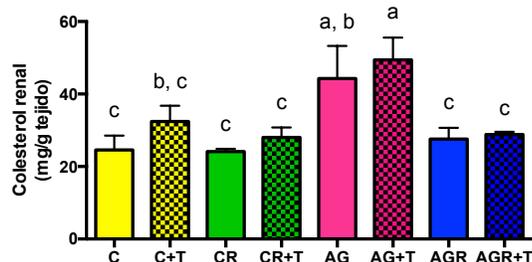
Por otro lado, en los grupos administrados con tunicamicina, se observó que el grupo con mayor acumulación de lípidos ectópicos neutros fue el grupo (AG+T), que presentó un alto contenido de depósitos lipídicos tanto al interior del glomérulo como en las regiones túbulo intersticiales. El grupo (AG+T) presentó una mayor acumulación de gotas lipídicas respecto al grupo (AG).

El grupo (AGR+T) presentó gotas lipídicas distribuidas, tanto en el área glomerular como en el área tubulointersticial, de forma muy dispersa, en cantidades mucho menores a las observadas en el grupo (AG+T), aunque con mayor frecuencia que la presencia de gotas lipídicas en el grupo (AGR).

Por lo tanto, la administración de tunicamicina incrementó la acumulación ectópica de depósitos lipídicos en tejido renal, distribuidos tanto en el área glomerular como en el área tubulointersticial, este incremento se observó de forma importante entre el grupo (AG+T) respecto a (AG). Mientras que, la suplementación con resveratrol inhibió la presencia de depósitos lipídicos en tejido renal de forma importante, tanto en el área glomerular como en el área túbulo intersticial, entre el grupo (AGR+T) respecto al grupo no suplementado (AG+T), y no presentó una acumulación lipídica muy importantes respecto al grupo (C).

#### **8.8 EL CONTENIDO DE LÍPIDOS EN TEJIDO RENAL INCREMENTÓ EN LOS GRUPOS QUE CONSUMIERON UNA DIETA ALTA EN GRASA Y QUE FUERON ADMINISTRADOS CON TUNICAMICINA, Y LA SUPLEMENTACIÓN CON RESVERATROL LO PREVINO**

Después de observar el efecto benéfico del resveratrol en los resultados obtenidos por el análisis histológico en la tinción de rojo oleoso y el análisis comparativo de vacuolización lipídica tubular, se decidió realizar una extracción de lípidos totales en riñón, con la finalidad de obtener una comparación cuantitativa del contenido de triglicéridos y colesterol en tejido renal entre todos los grupos que se trataron, con y sin tunicamicina. Esto es con la finalidad de caracterizar el tipo de lípidos acumulados en el tejido renal, y por lo tanto, poder proponer algún posible mecanismo de regulación del resveratrol en la ruta de síntesis de cada uno de ellos.

**A.****B.**

**FIGURA 16.** Efecto del resveratrol en el contenido de lípidos en el tejido renal de ratones C57BL/6 alimentados durante 28 semanas con una dieta control (AIN-93M) o alta en grasa (45% Kcal), con y sin la administración de tunicamicina 8 horas previas a la eutanasia. **A.** Contenido de triglicéridos en tejido renal **B.** Contenido de colesterol en tejido renal n= 5 muestras para cada grupo experimental. Diferentes letras representan diferencia significativa (a>b). ANOVA Fisher's LSD  $p < 0.05$

Tanto en la **FIGURA 16A** como en la **FIGURA 16B**, se observó que, entre los grupos no administrados con tunicamicina, el mayor contenido de triglicéridos y de colesterol en tejido renal lo presentó el grupo (AG), el cual presentó un incremento significativo respecto a los grupos (C), (CR) y (AGR); a su vez, los grupos (C), (CR) y (AGR) no presentaron diferencias significativas entre sí.

Por lo tanto, se observó que la dieta alta en grasa (AG) indujo un incremento significativo en la concentración de triglicéridos y de colesterol en tejido renal respecto al grupo (C). Mientras que, la suplementación con resveratrol no presentó diferencias en el contenido ni de triglicéridos ni de colesterol en nivel renal respecto al grupo alimentado con la dieta control (C), y presentó una disminución significativa en ambas concentraciones respecto al grupo (AG).

Ahora, en los grupos administrados con tunicamicina, se observó que el grupo que presentó el mayor contenido de triglicéridos y de colesterol a nivel renal fue el grupo (AG+T), el cual presentó un incremento significativo respecto a los grupos (C+T), (CR+T) y (AGR+T); a su vez, (C+T), (CR+T) y (AGR+T) no presentaron diferencias significativas entre sí. Así mismo, se observó que los grupos (C+T) y (AG+T) presentaron una tendencia a incrementar el contenido de triglicéridos y de colesterol respecto a los grupos (C) y (AG), aunque no fue significativa; mientras que, los grupos (CR+T) y (AGR+T) no presentaron variación ni en el contenido de triglicéridos ni de colesterol respecto a los grupos (CR) y (AGR).

Por lo tanto, se presentó que la administración de tunicamicina indujo una tendencia a incrementar el contenido de triglicéridos y de colesterol a nivel renal en los grupos no suplementados (C+T) y (AG+T), aunque no fue significativa. Mientras que, en los grupos suplementados con resveratrol, (CR+T) y (AGR+T), no se presentaron diferencias ni en el contenido de triglicéridos ni en el contenido de colesterol respecto a los grupos sin tunicamicina (CR) y (AGR).

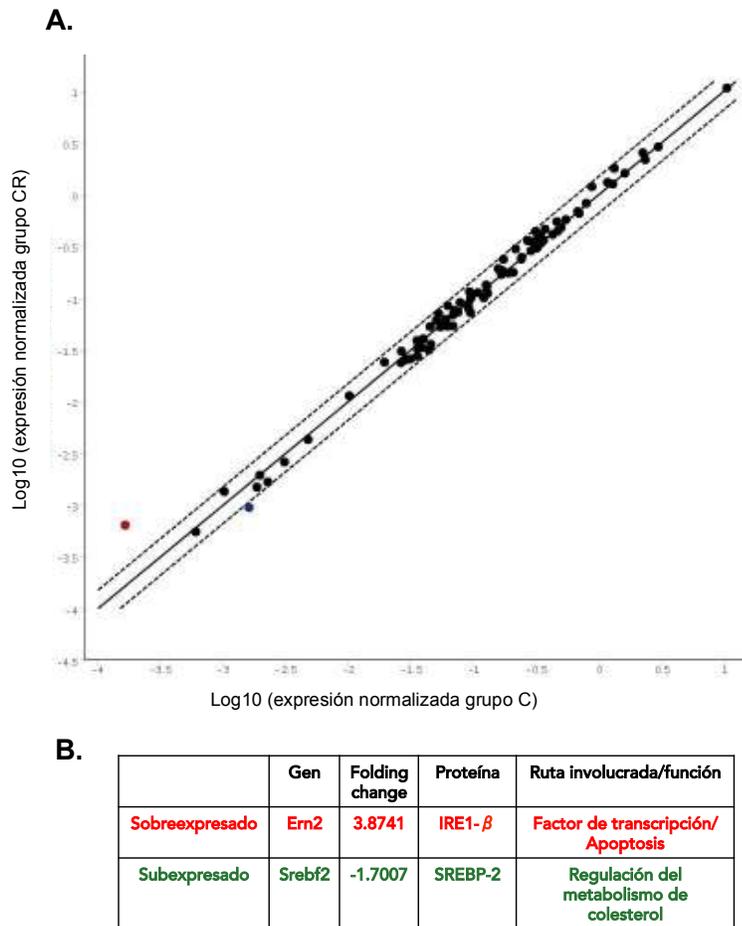
## **8.9 LA SUPLEMENTACIÓN CON RESVERATROL DISMINUYÓ LA EXPRESIÓN DEL mRNA DE Srebf2 EN RIÑÓN EN UNA DIETA CONTROL Y ALTA EN GRASA**

Una vez que se observó que el resveratrol indujo un efecto benéfico significativo en el metabolismo de lípidos a nivel renal por pruebas histológicas y en la extracción de lípidos en riñón, se decidió evaluar ahora el mecanismo molecular responsable del efecto del resveratrol a nivel renal en el metabolismo de lípidos por la inducción crónica del estrés del RE con una dieta alta en grasa, para lo cual se realizó un análisis de microarreglo a partir de mRNA extraído de riñón (corteza y médula) de los animales alimentados con las dietas (C), (CR), (AG) y (AGR), en donde se determinó la expresión de diversos genes involucrados en la respuesta a proteínas mal plegadas entre los grupos no administrados con tunicamicina, cuyos resultados se muestran en las **FIGURAS 17, 18, 19 y 20**.

### **GRÁFICOS DE DISPERSIÓN (SCATTER PLOTS) Y TABLAS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE CADA TRATAMIENTO DIETARIO RESPECTO AL CONTROL**

A continuación se presentan los gráficos de dispersión del perfil de expresión genética de cada uno de los tratamientos dietarios de los genes involucrados en la respuesta a proteínas mal plegadas respecto al perfil de expresión genética del grupo control.

## 1. CR vs C

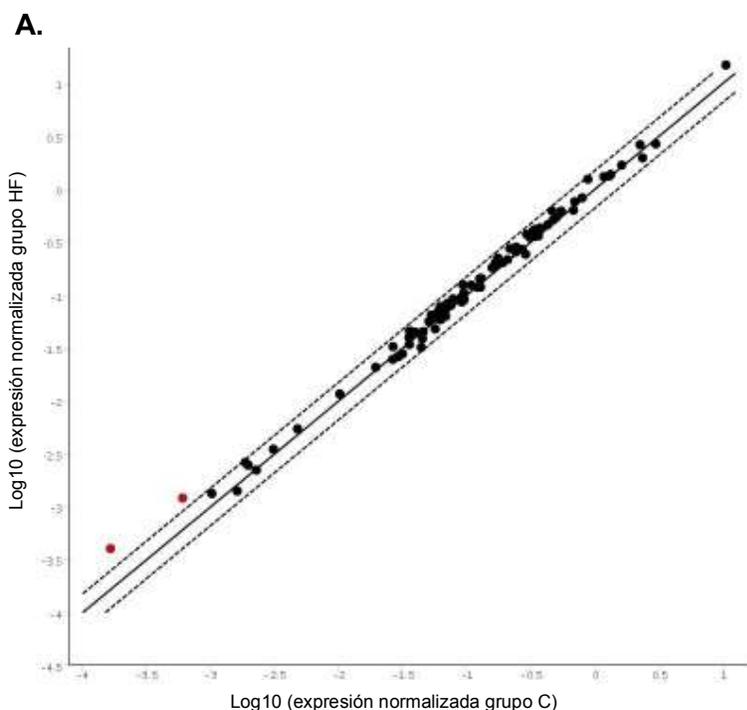


**FIGURA 17.** Perfil de expresión de genes involucrados en la respuesta a proteínas mal plegadas del grupo alimentado con la dieta control con Resveratrol (CR) respecto al grupo Control (C) en ratones C57BL/6 tratados por 28 semanas. **A.** Diagrama de dispersión de la expresión de los genes determinados del grupo (CR) respecto al grupo (C) **B.** Tabla de genes con expresión diferencial del perfil genético del grupo (CR) respecto al grupo (C) n= 3 para cada grupo experimental,  $p < 0.05$ . Proporción de razón de cambio (Fold change ratio) en Log10. Punto de corte (cut-off) en 1.5/-1.5 de razón de cambio (Fold Change) IRE1 $\beta$ = proteína reclutadora de inositol 1 $\beta$ ; SREBP-2= proteína de unión a los elementos reguladores de esteroides 2

En el gráfico A y la tabla B presentados en la **FIGURA 17** se muestra que el grupo (CR) expresó de forma significativa un gen a la alta y un gen a la baja sobre el punto de corte respecto al grupo (C). Por un lado, el gen Ern2, que codifica para la proteína IRE1 $\beta$  que actúa como factor de transcripción y está implicada en la vía de apoptosis, el cual presentó un valor de razón de cambio de 3.8747 en Log10 respecto al grupo (C).

Por otro lado, el gen Srebf2, que codifica para la proteína SREBP-2, que como se mencionó ampliamente en los antecedentes, es un regulador maestro de la síntesis de colesterol, el cual presentó un valor de razón de cambio de -1.7007 en Log10 respecto al grupo (C).

## 2. AG vs C



**B.**

	Gen	Folding change	Proteína	Ruta involucrada/ función
Sobreexpresado	Ern2	2.4301	IRE1- $\beta$	Factor de transcripción/ Apoptosis
Sobreexpresado	Creb3l3	1.9958	CREBH	Factor de transcripción

**FIGURA 18.** Perfil de expresión de genes involucrados en la respuesta a proteínas mal plegadas del grupo alimentado con la dieta alta en grasa (AG) respecto al grupo Control (C) en ratones C57BL/6 tratados durante 28 semanas. **A.** Diagrama de dispersión de la expresión de los genes determinados del grupo (AG) respecto al grupo (C) **B.** Tabla de genes con expresión diferencial del perfil genético del grupo (AG) respecto al grupo (C)

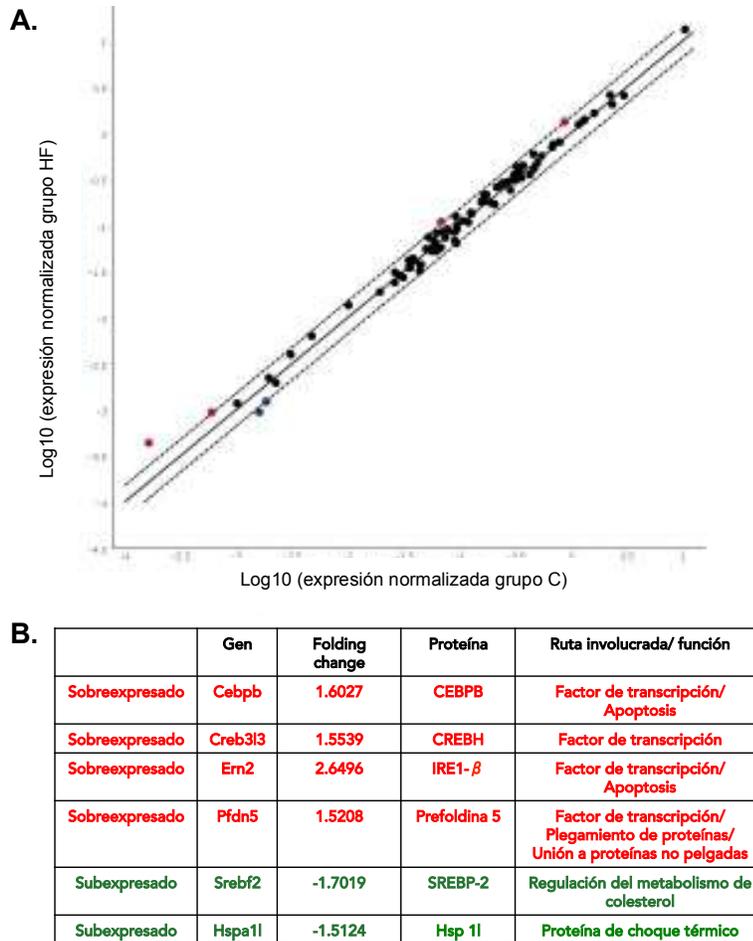
n= 3 para cada grupo experimental,  $p < 0.05$ . Proporción de razón de cambio (Fold change ratio) en Log10. Punto de corte (cut-off) en 1.5/-1.5 de razón de cambio (Fold Change)

IRE1 $\beta$ = proteína reclutadora de inositol 1 $\beta$ ; CREBH= Homólogo del elemento de respuesta de unión a cAMP

En el gráfico A y la tabla B presentados en la **FIGURA 18** se muestra que el grupo (AG) expresó de forma significativa dos genes a la alta sobre el punto de corte respecto al grupo (C). Por un lado, el gen Ern2, igual que el grupo (CR), el cual presentó un valor de razón de cambio de 2.4301 en Log10 respecto al grupo (C).

Por otro lado, el gen Creb3l3, que codifica para la proteína CREBH, que es un factor de transcripción, el cual presentó un valor de razón de cambio de 1.9958 en Log10 respecto al grupo (C).

### 3. AGR vs C



**FIGURA 19.** Perfil de expresión de genes involucrados en la respuesta a proteínas mal plegadas del grupo alimentado con la dieta alta en grasa con resveratrol (AGR) respecto al grupo Control (C) en ratones C57BL/6 tratados durante 28 semanas. **A.** Diagrama de dispersión de la expresión de los genes determinados del grupo (AGR) respecto al grupo (C) **B.** Tabla de genes con expresión diferencial del perfil genético del grupo (AGR) respecto al grupo (C)

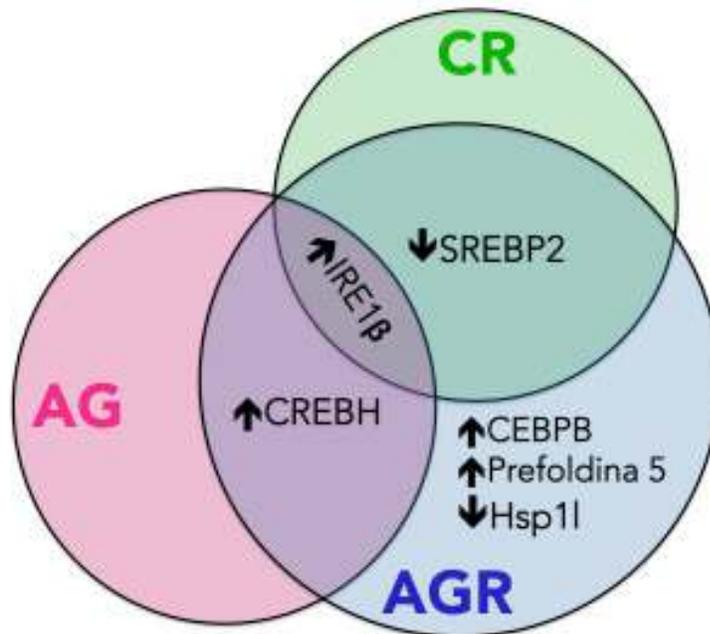
n= 3 para cada grupo experimental,  $p < 0.05$ . Proporción de razón de cambio (Fold change ratio) en Log10. Punto de corte (cut-off) en 1.5/-1.5 de razón de cambio (Fold Change)

IRE1 $\beta$ = proteína reclutadora de inositol 1 $\beta$ ; SREBP-2= proteína de unión a los elementos reguladores de esteroides 2; CREBH= Homólogo del elemento de respuesta de unión a cAMP; CEBPB= Acelerador de unión a la proteína CCAAT beta; Hsp 1l= proteína de choque térmico semejante al tipo 1.

En el gráfico A y la tabla B presentados en la **FIGURA 19** se muestra que el grupo (AGR) expresó de forma significativa cuatro genes a la alta y dos genes a la baja sobre el punto de corte respecto al grupo (C). Por un lado, el gen Cebpb, que codifica para la proteína CEBPB, que actúa como factor de transcripción y está implicado en la vía de apoptosis, el cual presentó un valor de razón de cambio de 1.6027 en Log10, o sea 40.06 veces más respecto al grupo (C). Así mismo se encontró el gen Creb3l3, igual que el grupo (AG), el cual presentó un valor de razón de cambio de 1.5539 en Log10, es decir, 35.8 veces más respecto al grupo (C). También se observó el gen Ern2, el igual que los grupos (CR) y (AG), el cual presentó un valor de razón de cambio de 2.6496 en Log10 respecto al grupo (C).

Finalmente, también se observó el gen Pfdn5, que codifica para la proteína Prefoldina 5, que actúa como factor de transcripción y está implicado en las vías de plegamiento de proteínas y de unión a proteínas mal plegadas, el cual presentó un valor de razón de cambio de 1.5208 en Log10 respecto al grupo (C).

Por otro lado, se encontró el gen Srebf2, que codifica para la proteína SREBP-2, igual que en el grupo (CR), el cual presentó un valor de razón de cambio de -1.7019 en Log10, es decir, que se expresó 50.34 veces menos respecto al grupo (C). Y también el gen Hspa11, que codifica para la proteína Hsp11 que es una proteína de choque térmico, el cual presentó un valor de razón de cambio de -1.5124 en Log10 respecto al grupo (C).



**FIGURA 20.** Diagrama de Venn ilustrativo acerca de las proteínas para las cuales codifican los genes del perfil de expresión diferencial de la respuesta a proteínas mal plegadas en los grupos (CR), (AG) y (AGR) respecto al grupo (C)

n= 3 para cada grupo experimental, p< 0.05. Proporción de razón de cambio (Fold change ratio) en Log10. Punto de corte (cut-off) en 1.5/-1.5 de razón de cambio (Fold Change)

*IRE1β*= proteína reclutadora de inositol 1β; *SREBP-2*= proteína de unión a los elementos reguladores de esteroides 2; *CREBH*= Homólogo del elemento de respuesta de unión a cAMP; *CEBPB*= Acelerador de unión a la proteína CCAAT beta; *Hsp 11*= proteína de choque térmico semejante al tipo 1; *SREBP-2*= proteína de unión a los elementos reguladores de esteroides 2.

En la **FIGURA 20** se muestra un diagrama de Venn a manera de resumen acerca de los resultados obtenidos en el perfil de expresión diferencial de los tres grupos de tratamiento dietario (CR, AG y AGR) respecto al grupo (C), en donde se observa que todos los grupos (CR, AG y AGR) expresaron a la alta el gen que codifica para la proteína IRE1β (Ern2); mientras que, los grupos (AG) y (AGR) expresaron a la alta al gen que codifica para la proteína CREBH (Creb3l3); y finalmente, los grupos (CR) y (AGR) expresaron a la baja al gen que codifica para la proteína SREBP-2 (Srebf2).

También se muestra que el grupo (AGR) expresó de forma diferencial única a la alta a los genes que codifican para las proteínas CEBPB (Cebpb) y Prefoldina 5 (Pfdn 5), y a la baja para el gen que codifica para la proteína Hsp11 (Hspa11).

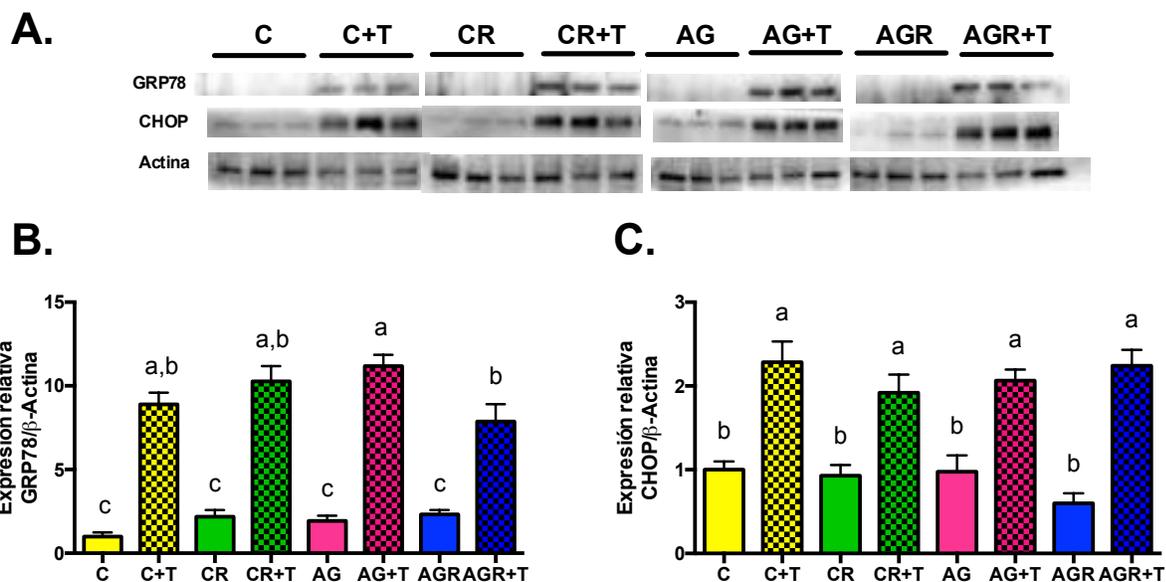
De acuerdo con esta figura, se muestra que la alimentación con una dieta alta en grasa incrementó la expresión del gen que codifica para la proteína CREBH (Creb3l3), con y sin la suplementación de resveratrol (AG y AGR) respecto al grupo control (C). Y que la suplementación con resveratrol disminuyó la expresión del gen que codifica para la proteína SREBP-2 (Srebf2), tanto en una dieta alta en grasa como en una dieta control (CR y AGR), respecto al grupo control (C).

#### **8.10 LA SUPLEMENTACIÓN CON RESVERATROL DISMINUYÓ LA EXPRESIÓN PROTEICA DE LOS MARCADORES DE ESTRÉS DEL RE Y DE SÍNTESIS DE LÍPIDOS E INCREMENTÓ LOS DE LA VÍA DEL EJE SIRT1/AMPK**

Después de evaluar el perfil genético a nivel renal, para completar el mecanismo molecular responsable de los efectos del resveratrol en el metabolismo de lípidos a nivel renal, se determinó ahora la expresión proteica por Western Blot de marcadores involucrados en la activación del estrés del RE, el metabolismo de lípidos y la vía de AMPK/SIRT1 a nivel renal.

#### **EL RESVERATROL DISMINUYÓ LA EXPRESIÓN DE GRP78, MARCADOR ASOCIADO CON EL ESTRÉS DEL RE, EN LOS ANIMALES ALIMENTADOS CON UNA DIETA ALTA EN GRASA Y ADMINISTRADOS CON TUNICAMICINA, PERO NO MODIFICÓ LA EXPRESIÓN DE CHOP**

Para evaluar el efecto del resveratrol en la expresión de proteínas asociadas con la activación del estrés del RE en el riñón, se midió la expresión por Western Blot de los marcadores GRP78 y CHOP, cuyos resultados se muestran a continuación en la **FIGURA 15**. Como se mencionó en los antecedentes, GRP78 regula la activación de las rutas de señalización de la UPR, que únicamente se activa con el estrés del RE y es por ello que se considera como un marcador de la activación de la UPR [58]. Por otro lado, CHOP es una de las proteínas efectoras río debajo de la activación de la UPR, es una proteína proapoptótica y en los casos de estrés del RE severo o crónico, tiende a expresarse para dirigir a la célula hacia la muerte celular [59].



**FIGURA 21.** Efecto del resveratrol en el análisis de expresión por Western Blot en riñón de los marcadores de estrés del RE ante la administración de tunicamicina en ratones C57BL/6 alimentados con una dieta control (AIN-93M) o una dieta alta en grasa (45% Kcal) después de 28 semanas de tratamiento dietario **A.** Expresión de GRP78, CHOP y  $\beta$ -Actina en riñón para cada uno de los tratamientos dietarios, con y sin la administración de tunicamicina. **B.** Expresión proteica relativa de GRP78 en riñón normalizada respecto a  $\beta$ -Actina para cada uno de los tratamientos dietarios, con y sin la administración de tunicamicina. **C.** Expresión proteica relativa de CHOP en riñón normalizada respecto a  $\beta$ -Actina para cada uno de los tratamientos dietarios, con y sin la administración de tunicamicina.

n= 3 para cada grupo experimental. Diferentes letras representan diferencia significativa (a>b>c). ANOVA Fisher's LSD  $p < 0.05$

GRP78= Proteína chaperona del retículo endoplásmico regulada por glucosa 78; CHOP= Proteína homóloga del potenciador de la proteína de unión CCAAT

A partir de los resultados presentados en la **FIGURAS 21A y 21B**, se presentó que entre los grupos no administrados con tunicamicina (C, CR, AG y AGR), no hubo ninguna diferencia significativa respecto a la expresión relativa de GRP78 en riñón, ya que todos presentaron valores muy similares.

Por lo tanto, ni el consumo de una dieta alta en grasa ni la suplementación con resveratrol tuvieron ningún efecto en la expresión relativa de GRP78 sin la administración de tunicamicina.

Sin embargo, en la comparación entre los grupos que fueron administrados con tunicamicina, se presentó que el grupo con mayor expresión relativa de GRP78 fue el grupo (AG+T) que presentó un incremento significativo respecto al grupo (AGR+T) más no respecto a los grupos (C+T) y (CR+T); a su vez, el grupo (AGR+T) tampoco presentó diferencia significativa respecto a los grupos (C+T) y (CR+T), que tampoco presentaron diferencia significativa entre ellos. Por otro lado, se observó que todos los grupos administrados con tunicamicina (C+T, CR+T, AG+T y AGR+T) presentaron un incremento en la expresión relativa de GRP78 respecto a los grupos no tratados (C, CR, AG y AGR), aunque el incremento fue significativamente menor entre los grupos (AGR+T) y (AGR).

Por lo tanto, la administración de tunicamicina incrementó de forma significativa la expresión relativa de GRP78 en todos los grupos (C+T, CR+T, AG+T y AGR+T). Sin embargo, la suplementación con resveratrol disminuyó de forma significativa la expresión relativa de GRP78 en una dieta alta en grasa (AGR+T) respecto a la no suplementada (AG+T) ante la administración de tunicamicina.

Por otra parte, a partir de los resultados observados en la **FIGURAS 21A y 21C** se observó que entre los grupos no administrados con tunicamicina, la expresión proteica relativa de CHOP no presentó diferencia significativa entre los cuatro grupos (C, CR, AG y AGR), sin embargo, se observó que la expresión relativa del grupo (AGR) presentó una tendencia a disminuir respecto a los grupos (C, CR y AG), que al compararse únicamente con los otros tres grupos no administrados con tunicamicina, resulta significativa.

Por lo tanto, el consumo de una dieta alta en grasa no presentó ningún efecto en la expresión relativa de CHOP. Sin embargo, la suplementación con resveratrol presentó una disminución en la expresión del grupo alimentado con la dieta alta en grasa (AGR) respecto a los otros tres tratamientos dietarios (C, CR y AG).

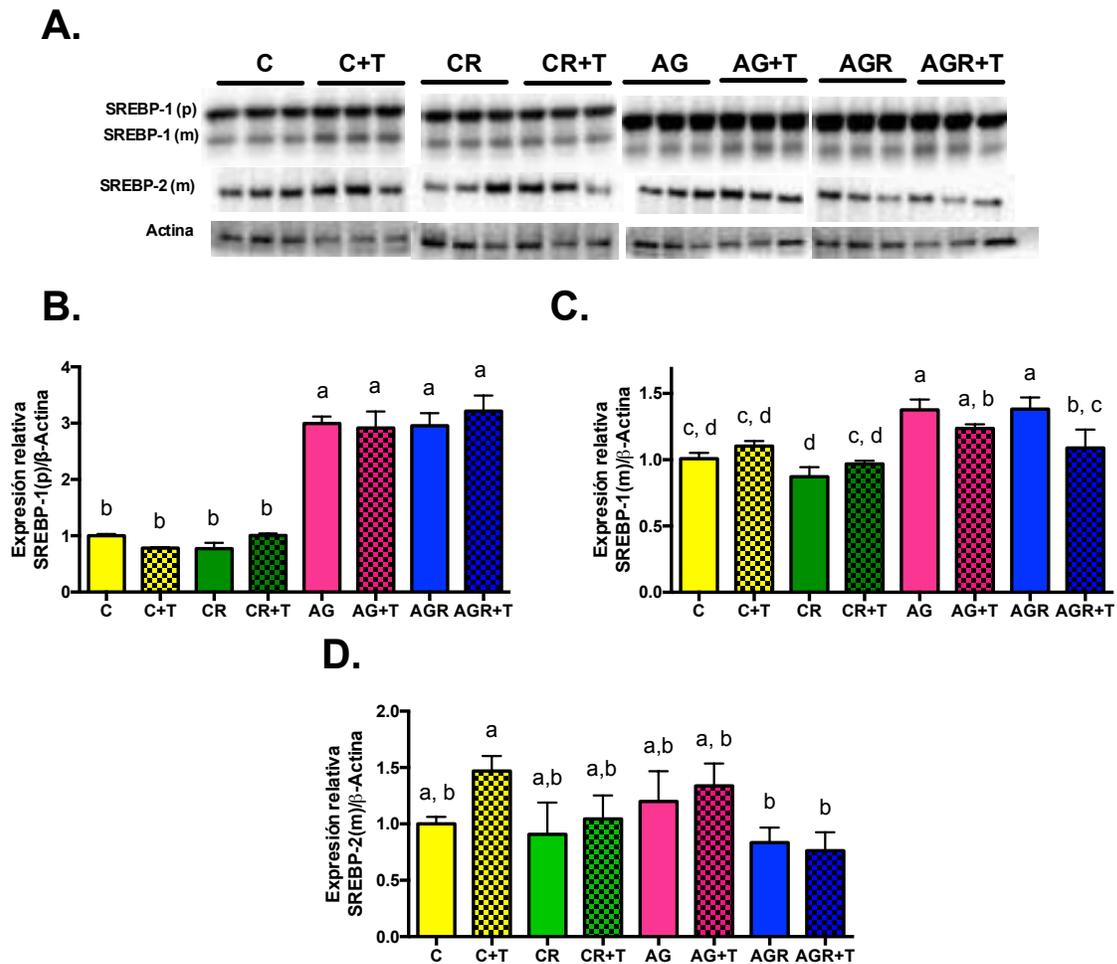
Con respecto a los grupos administrados con tunicamicina, se observó que todos los grupos (C+T, CR+T, AG+T y AGR+T) tuvieron una expresión relativa similar, y no presentaron diferencia significativa entre sí. Así mismo, se presentó que todos los grupos administrados con tunicamicina (C+T, CR+T, AG+T y AGR+T) tuvieron un incremento significativo respecto a los grupos no tratados con tunicamicina (C, CR, AG y AGR) en proporciones similares.

Por lo tanto, la expresión relativa de CHOP incrementó de forma significativa ante la administración de tunicamicina en todos los grupos (C+T, CR+T, AG+T y AGR+T), y la suplementación con resveratrol no tuvo ningún efecto en esta tendencia.

### **EL CONSUMO DE UNA DIETA ALTA EN GRASA INCREMENTÓ LA EXPRESIÓN PROTEICA DE MARCADORES DE LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS EN RIÑÓN: SREBP-1 Y SREBP-2, Y LA SUPLEMENTACIÓN CON RESVERATROL PREVINO EL INCREMENTO EN LA EXPRESIÓN DE SREBP-2, CON Y SIN TUNICAMICINA**

Para determinar el efecto del resveratrol en el metabolismo de lípidos a nivel renal, se determinó la expresión de marcadores asociados con la síntesis de triglicéridos (SREBP-1) y de colesterol (SREBP-2). Cuyos resultados se muestran a continuación en la **FIGURA 22**.

SREBP-1, como se mencionó en la introducción, es el factor de transcripción maestro de la síntesis de triglicéridos y ácidos grasos; y SREBP-2, es el regulador maestro de la síntesis de colesterol [120]. Ambos factores de transcripción son sintetizados como precursores inactivos: SREBP-1 (p) y SREBP-2 (p); es hasta después de ser procesados a partir de un corte proteolítico que se libera la forma activa de ambos factores factores de transcripción: SREBP-1 (m) y SREBP-2 (m) [120]. Es por ello que se determinó la expresión de SREBP-1 (p) y SREBP-1(m), así como SREBP-2 (m), para ver si la expresión de estos reguladores maestros correlaciona con los resultados observados en el análisis histológico de acumulación de lípidos y los datos obtenidos de la determinación del contenido de triglicéridos y colesterol en tejido renal.



**FIGURA 22.** Efecto del resveratrol en el análisis de expresión por Western Blot en riñón de los marcadores de síntesis de lípidos ante la administración de tunicamicina en ratones C57BL/6 alimentados con una dieta control (AIN-93M) o alta en grasa (45% Kcal) después de 28 semanas de tratamiento dietario **A.** Expresión de SREBP-1(p), SREBP-1 (m), SREBP-2 (m) y  $\beta$ -Actina en riñón para cada uno de los tratamientos dietarios, con y sin la administración de tunicamicina. **B.** Expresión proteica relativa de SREBP-1 (p) en riñón normalizada respecto a  $\beta$ -Actina para cada uno de los tratamientos dietarios, con y sin la administración de tunicamicina. **C.** Expresión proteica relativa de SREBP-1 (m) en riñón normalizada respecto a  $\beta$ -Actina para cada uno de los tratamientos dietarios, con y sin la administración de tunicamicina. **D.** Expresión proteica relativa de SREBP-2 (m) en riñón normalizada respecto a  $\beta$ -Actina para cada uno de los tratamientos dietarios, con y sin la administración de tunicamicina.

n= 3 para cada grupo experimental. Diferentes letras representan diferencia significativa ( $a > b > c$ ). ANOVA Fisher's LSD  $p < 0.05$

SREBP-1= Proteína de unión a los elementos reguladores de esteroides 1; SREBP-2= Proteína de unión a los elementos reguladores de esteroides 2.

A partir de los resultados de la **FIGURAS 22A y 22B** se observó que los grupos (C) y (CR) presentan valores de expresión relativa de SREBP-1 (p) muy similares; mientras que, por su parte, los grupos (AG) y (AGR) también presentan valores de expresión muy similares entre sí. Se presentó que entre los grupos no administrados con tunicamicina, el valor mayor en la expresión relativa de SREBP-1 (p) lo tuvo el grupo (AG), que presentó un incremento significativo respecto a los grupos (C) y (CR), más no respecto al grupo (AGR); a su vez, el grupo (AGR) presentó también un incremento significativo respecto a los grupos (C) y (CR), que no presentaron diferencia significativa entre sí.

Por lo tanto, el consumo de una dieta alta en grasa (AG y AGR) indujo un incremento significativo en la expresión del precursor del factor de transcripción maestro de la síntesis de triglicéridos SREBP-1; y el resveratrol no indujo ningún cambio.

En los grupos que fueron administrados con tunicamicina, se observó que los grupos (C+T) y (CR+T) presentaron valores de expresión muy similares para SREBP-1 (p); mientras que los grupos (AG+T) y (AGR+T) también presentaron valores de expresión muy cercanos. El grupo que presentó el mayor valor de expresión relativa de SREBP-1 (p) fue el grupo (AGR+T) que presentó un incremento significativo respecto a los grupos (C+T) y (CR+T), más no respecto al grupo (AG+T); por su lado, (AG+T) presentó también un incremento significativo respecto a los grupos (C+T) y (CR+T), que por su parte, no presentaron diferencia significativa entre sí. Ningún grupo administrado con tunicamicina (C+T, CR+T, AG+T y AGR+T) presentó variaciones significativas en la expresión de SREBP-1 (p) respecto a los grupos no administrados con tunicamicina (C, CR, AG, AGR).

Por lo tanto, la expresión proteica relativa del precursor del factor de transcripción maestro de la síntesis de triglicéridos SREBP-1 no se modificó ante la administración de tunicamicina en ninguno de los grupos, y el resveratrol no indujo ningún efecto en la expresión relativa de este precursor.

A partir de los resultados mostrados en la **FIGURAS 16A y 16C** se observó que entre los grupos no administrados con tunicamicina, el mayor valor en la expresión relativa de SREBP-1 (m) lo tuvo el grupo (AG) que presentó un incremento significativo respecto a los grupos (C) y (CR), más no respecto a (AGR); a su vez, el grupo (AGR) presentó un incremento significativo respecto a los grupos (C) y (CR), que por parte, no presentaron diferencia significativa entre sí.

Por lo tanto, el consumo de una dieta alta en grasa (AG y AGR) incrementó la expresión proteica relativa de la forma activa del factor de transcripción maestro de la síntesis de triglicéridos SREBP-1 (m), y la suplementación con resveratrol no indujo ningún cambio en la expresión relativa del mismo.

Por otro lado, entre los grupos administrados con tunicamicina, el valor mayor de la expresión relativa de SREBP-1 (m) se observó en el grupo (AG+T) que presentó un incremento significativo respecto a los grupos (C+T) y (CR+T), más no respecto a (AGR+T); y a su vez, los grupos (C+T), (CR+T) y (AGR+T) no presentaron diferencia significativa entre sí. Así mismo, los grupos (C+T), (CR+T) y (AG+T) no presentaron diferencias significativas en la expresión relativa de SREBP-1 (m) respecto a los grupos (C), (CR) y (AG) respectivamente; mientras que el grupo (AGR+T) presentó una disminución significativa en la expresión respecto al grupo (AGR).

Por lo tanto, la expresión proteica de la forma activa de SREBP-1 (m) no presentó diferencias significativas ante la administración de tunicamicina en los grupos (C+T, CR+T y AG+T). Sin embargo, la suplementación con resveratrol en el grupo alimentado con la dieta alta en grasa (AGR+T) presentó una disminución en la expresión relativa de SREBP-1 (m) ante la administración de tunicamicina respecto al grupo sin tunicamicina (AGR).

Ahora, en los resultados mostrados en la **FIGURAS 22A y 22D**, se puede observar que entre los grupos no tratados con tunicamicina, el grupo que presentó una mayor expresión relativa del factor de transcripción activo de síntesis de colesterol SREBP-2 (m) fue el grupo (AG), seguido por los grupos (C), (CR) y (AGR) respectivamente. Sin embargo, ninguno de los grupos presentó una diferencia significativa entre sí.

Por lo tanto, el consumo de una dieta alta en grasa (AG) incrementó la expresión relativa de la forma activa de SREBP-2 (m) respecto a los demás grupos (C, CR y AGR), sin embargo no fue significativa. Por otro lado, la suplementación con resveratrol presentó una ligera tendencia a reducir la expresión de SREBP-2 (m) en el grupo alimentado con la dieta alta en grasa (AGR) respecto al grupo no suplementado (AG), sin embargo no fue significativa.

Por otro lado, entre los grupos administrados con tunicamicina, se observó que el grupo (C+T) presentó una mayor expresión relativa de SREBP-2 (m), y presentó un incremento significativo respecto al grupo (AGR+T), más no respecto a los grupos (C+T) y (AG+T); a su vez, los grupos (C+T), (CR+T) y (AGR+T) no presentaron una diferencia significativa entre sí. Por otra parte, los grupos (C+T), (CR+T) y (AG+T) presentaron un incremento respecto a los grupos no administrados con tunicamicina (C), (CR) y (AG) respectivamente, sin ser significativo en ninguno de los casos; por su parte, el grupo (AGR+T) no presentó diferencia en la expresión relativa respecto al grupo (AGR).

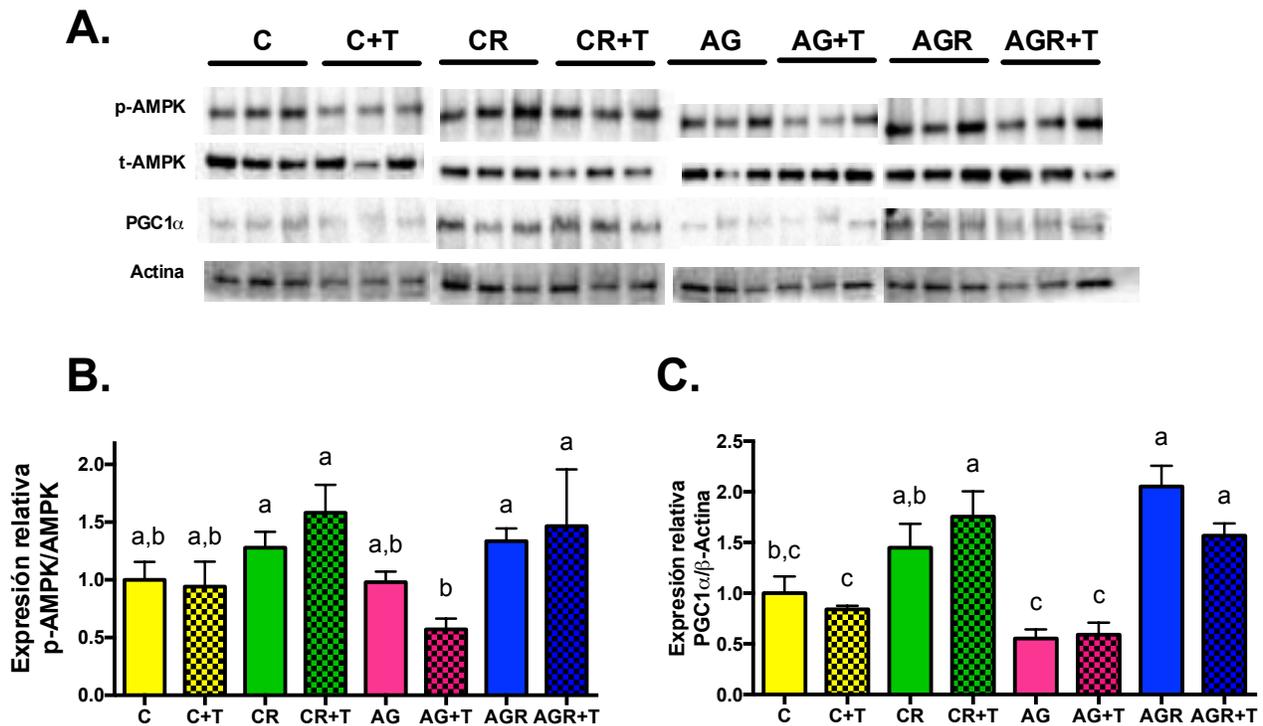
Por lo tanto, la administración con tunicamicina indujo un incremento en la expresión relativa de SREBP-2 (m) en los grupos (C+T), (CR+T) y (AG+T) respecto a los grupos sin tunicamicina, aunque no fue significativo. Por su parte, la suplementación con resveratrol disminuyó la expresión relativa de SREBP-2 (m) en la dieta alta en grasa (AGR+T) respecto a la dieta control (C+T) ante la administración de tunicamicina.

### **LA SUPLEMENTACIÓN CON RESVERATROL INCREMENTÓ LA EXPRESIÓN RELATIVA DE LOS MARCADORES INVOLUCRADOS EN LA RUTA DE AMPK/SIRT1: P-AMPK Y PGC1 $\alpha$ , TANTO EN UNA DIETA ALTA EN GRASA COMO EN UNA DIETA CONTROL**

Finalmente, para completar el perfil molecular del mecanismo del resveratrol en el metabolismo de lípidos a nivel renal, se decidió determinar el efecto del resveratrol en la activación de AMPK. AMPK, como se mencionó previamente, es un sensor energético central que se activa por fosforilación, y que ha demostrado ser el principal efector implicado en la regulación metabólica dirigida por el resveratrol [28].

Así mismo, como la expresión de SREBP-1 (m) por Western Blot, no correlacionó con la disminución en el contenido de triglicéridos en tejido renal inducido por el resveratrol, se decidió evaluar el efecto del resveratrol en la expresión de una de las proteínas efectoras río abajo de la vía de AMPK/SIRT1 activada por el resveratrol, el regulador maestro de la beta oxidación de ácidos grasos: PGC-1 $\alpha$ . PGC-1 $\alpha$  es un factor de transcripción que activa por desacetilación de la desacetilasa presente en la otra ruta involucrada con el resveratrol, la SIRT1, y se ha demostrado que su activación está asociada con la inducción de la beta oxidación de ácidos grasos [28].

Por lo tanto, se determinó la expresión por Western Blot de p-AMPK, AMPK total y PGC-1 $\alpha$  como marcadores de la vía AMPK/SIRT1, cuyos resultados y análisis se presentan a continuación en la **FIGURA 23**.



**FIGURA 23.** Efecto del resveratrol en el análisis de expresión por Western Blot en riñón de los marcadores de la vía de AMPK/SIRT1 ante la administración de tunicamicina en ratones C57BL/6 alimentados con una dieta control (AIN-93M) o una dieta alta en grasa (45% Kcal) después de 28 semanas de tratamiento dietario **A.** Expresión de p-AMPK, t-AMPK, PGC1 $\alpha$  y  $\beta$ -Actina en riñón para cada uno de los tratamientos dietarios, con y sin la administración de tunicamicina. **B.** Expresión proteica relativa de p-AMPK respecto a t-AMPK para cada uno de los tratamientos dietarios, con y sin la administración de tunicamicina. **C.** Expresión proteica relativa de PGC1 $\alpha$  en riñón normalizada respecto a  $\beta$ -Actina para cada uno de los tratamientos dietarios, con y sin la administración de tunicamicina.

n= 3 muestras individuales para cada grupo experimental. Diferentes letras representan diferencia significativa (a>b>c). ANOVA Fisher's LSD p < 0.05

t-AMPK= Proteína cinasa activada por el 5' adenosin monofosfato total; p-AMPK= Proteína cinasa activada por el 5' adenosin monofosfato fosforilada; PGC-1 $\alpha$ = Coactivador del proliferador de peroxisoma-receptor activado  $\gamma$ .

En las **FIGURAS 23A y 23B** se observó, que entre los grupos en los que no se administró tunicamicina, el grupo con mayor expresión relativa de p-AMPK fue (AGR), seguido por el grupo (CR) con un valor muy similar, y los grupos (C) y (AG) respectivamente. Ninguno de los grupos presentó diferencias significativas entre sí.

Por lo tanto, el consumo de una dieta alta en grasa (AG) no presentó ningún efecto en la expresión relativa de p-AMPK/t-AMPK. Por su parte, la suplementación con resveratrol presentó una tendencia a incrementar la expresión relativa de p-AMPK/t-AMPK, tanto en una dieta control (CR) como en una dieta alta en grasa (AGR) respecto a los grupos no suplementados (C) y (AG), aunque los incrementos no fueron significativos.

Entre los grupos administrados con tunicamicina, se observó que los grupos (CR+T) y (AGR+T) presentaron niveles de expresión relativa de p-AMPK/t-AMPK muy similares entre sí. Ambos grupos presentaron los mayores valores de expresión y presentaron un incremento significativo respecto al grupo (AG+T), más no respecto al grupo (C+T); a su vez, el grupo (C+T) no presentó diferencia significativa respecto al grupo (AG+T). Por otra parte, los grupos (CR+T) y (AGR+T) presentaron una tendencia a incrementar la expresión relativa de p-AMPK/t-AMPK respecto a los grupos (CR) y (AGR) respectivamente; mientras que, el grupo (C+T) no modificó su nivel de expresión respecto al grupo (C), y el grupo (AG+T) disminuyó su expresión respecto al grupo (AG). Sin embargo, ninguna de estas comparaciones fue significativa.

Por lo tanto, la administración de tunicamicina no modificó la expresión relativa de p-AMPK/t-AMPK en los grupos (C+T) y (AG+T). Sin embargo, la suplementación con resveratrol incrementó significativamente la expresión relativa de p-AMPK/t-AMPK, tanto en una dieta control (CR+T) como en una dieta alta en grasa (AGR+T), respecto al grupo alta en grasa en grasa no suplementado (AG+T); además ambos grupos (CR+T) y (AGR+T) presentaron una tendencia a incrementar la expresión relativa respecto a los grupos no administrados con tunicamicina, CR y AGR respectivamente, aunque no fue significativa.

En las **FIGURAS 23A y 23C** se observó, que entre los grupos en los que no se administró tunicamicina, el grupo con mayor expresión relativa de PGC1 $\alpha$  es (AGR), que presentó un incremento significativo respecto a los grupos (C) y (AG), más no respecto al grupo (CR); a su vez, el grupo (CR) presentó un incremento significativo respecto al grupo (AG), más no respecto al grupo (C); finalmente, el grupo (C) no presentó diferencia significativa respecto al grupo (AG).

Por lo tanto, el consumo de la dieta alta en grasa presentó una tendencia a disminuir la expresión relativa de PGC1 $\alpha$  respecto al grupo alimentado con la dieta control (C), sin embargo, no fue significativa. Por otro lado, la suplementación con resveratrol incrementó significativamente la expresión de PGC1 $\alpha$  tanto en una dieta control (CR) como en una dieta alta en grasa (AGR) respecto a las dietas no suplementadas (C) y (AG).

En los grupos administrados con tunicamicina, los grupos (CR+T) y (AGR+T) presentaron niveles de expresión relativa de PGC1 $\alpha$  muy similares; al igual que los grupos (AG+T) y (AGR+T) entre sí. El grupo con el mayor nivel de expresión fue (CR+T), que presentó una diferencia significativa respecto a los grupos (C+T) y (AG+T), más no de (AGR+T); a su vez, (AGR+T) presentó un incremento significativo respecto a (C+T) y (AG+T); y por su parte, (C+T) y (AG+T) no presentaron diferencia significativa entre sí. El grupo (CR+T) incrementó ligeramente su nivel de expresión relativa respecto al grupo (CR); mientras que los grupos (C+T), (AG+T) y (AGR+T) presentaron una tendencia a disminuir su expresión relativa respecto a los grupos (C), (AG) y (AGR), sin embargo, ninguna comparación fue significativa.

Por lo tanto, la administración de tunicamicina no indujo ningún efecto claro sobre la expresión relativa de PGC1 $\alpha$ . Sin embargo, la suplementación con resveratrol, incrementó de forma significativa la expresión de PGC1 $\alpha$  en una dieta control (CR+T) y alta en grasa (AGR+T) respecto a las dietas no suplementadas (C+T) y (AG+T), a pesar de la administración de tunicamicina.

## 9. DISCUSIÓN

La alteración de la homeostasis y el correcto funcionamiento del RE provoca la acumulación de proteínas mal plegadas, generando una condición denominada: estrés del RE [21,121]. Hay dos tipos de inductores del estrés del RE, los fisiológicos y los farmacológicos [122].

Los inductores fisiológicos provocan estrés del RE ligero/moderado. Se da por diversas condiciones fisiopatológicas que alteran la funcionalidad del RE [122]. Uno de ellos es la obesidad, en donde se presentan anomalías en el flujo intracelular de energía [17], la disminución de la disponibilidad de nutrientes [19], la concentración excesiva de lípidos circulantes [19], y la activación de rutas de señalización de estrés celular e inflamación [17,50]. Se ha propuesto que uno de los mecanismos de inducción del estrés del RE en la obesidad es la acumulación de colesterol libre y ácidos grasos saturados en la membrana del RE, lo que inhibe la actividad de la ATPasa de Calcio SERCA2, y provoca una pérdida de fluidez en la membrana, por lo que altera la concentración de Calcio y provoca la acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del RE [72–74], induciendo el estrés del RE.

Por otro lado, los inductores farmacológicos provocan estrés del RE y activan a la UPR de forma aguda, en el transcurso de pocas horas [122]. El mecanismo de inducción depende del fármaco. Uno de ellos es la tunicamicina, que es un inhibidor de la (UDP-N-acetilglucosamina)-dolicol fosfato-N-acetilglucosaminofosfotransferasa (UDP-GlcNAc:dolicol fosfato GlcNAc-1-P-transferasa) [122,123], y por lo tanto, bloquea el paso inicial de la biosíntesis de glucoproteínas en el RE, lo que provoca la acumulación de glucoproteínas no plegadas en el lumen e induce así el estrés del RE.

Ahora, el resveratrol es un compuesto bioactivo que se encuentra presente en diversos alimentos de la dieta humana [1], y que ha demostrado tener diversos efectos benéficos para la salud a través de la activación de diversas rutas de señalización metabólica [27] a través la activación de dos principales sensores metabólicos: la Sirtuina 1 (SIRT1) y la proteína cinasa dependiente de AMP (AMPK) [26,27], y de sus respectivos blancos.

En este proyecto se determinó el efecto de la suplementación crónica con resveratrol (200 mg/kg pc/d) en un modelo de obesidad inducida en ratones C57BL/6 alimentados con una dieta alta en grasa (45% Kcal de grasa saturada) durante 28 semanas, como un inductor de estrés del RE de forma fisiológica; así mismo, se observó el efecto de la administración de tunicamicina (1 g/kg pc) en este mismo modelo 8 horas previas a la eutanasia, como un insulto metabólico agudo al tratarse de un inductor de estrés del RE farmacológico.

A partir de los resultados obtenidos en este estudio se observaron diversos efectos benéficos inducidos por la suplementación crónica de resveratrol en el consumo de una dieta alta en grasa, tanto a nivel sistémico como a nivel renal y hepático, con y sin la administración de tunicamicina.

Para analizar el **efecto del resveratrol en el peso corporal** en los animales antes de administrarles tunicamicina, se presentó que en la **curva de ganancia de peso**, el grupo alimentado con la dieta alta en grasa presentó un efecto obesogénico; sin embargo, la suplementación con resveratrol en este mismo tipo de dieta indujo un mecanismo resistencia a la ganancia de peso corporal, y adoptó un comportamiento similar al del grupo alimentado con la dieta control. Mientras que la suplementación con resveratrol en el grupo alimentado con la dieta control no presentó diferencia en la ganancia de peso corporal respecto al grupo no suplementado.

Consistentemente con lo que se observó en nuestro modelo, en un estudio conducido por Lagouge y col. (2006) se analizó el efecto de la suplementación de una dieta alta en grasa con resveratrol en un modelo de obesidad inducido por dieta alta en grasa en ratones C57BL/6 que se suplementó con resveratrol a una dosis de 400 mg/kg/pc/d. La ganancia de peso corporal fue menor en el grupo alimentado con la dieta alta en grasa suplementada con resveratrol respecto al grupo no suplementado, pero no presentó diferencia significativa respecto al grupo control. En este estudio se encontró, que la diferencia en el peso de los animales alimentados con la dieta alta en grasa con resveratrol se debió a una menor acumulación de grasa corporal [82].

Contrario a esto, en un estudio donde utilizaron un modelo de obesidad en ratones C57BL/6NIA inducido por una dieta comercial con 60% de grasa suplementado con resveratrol a una dosis baja (5.2 ó 22.4 mg/kg pc/día), no se observaron cambios significativos en la ganancia de peso corporal del grupo alimentado con la dieta alta en grasa suplementada con resveratrol respecto al grupo alimentado con la dieta alta en grasa [124].

Al comparar estos diferentes estudios [82,124], se puede sugerir que el resveratrol produce un efecto metabólico benéfico sobre la ganancia de peso corporal en un modelo de obesidad inducido por dieta de manera dosis-dependiente, que coincide con los resultados encontrados por Chang y colaboradores, que proponen que el efecto del resveratrol en la ganancia de peso corporal en ratones obesos es dosis-dependiente [80]. En este estudio demostramos que el mecanismo de resistencia a la ganancia de peso corporal que indujo el resveratrol fue significativo a una dosis de 200 mg/kg pc/día en una dieta alta en grasa (45% Kcal grasa saturada) en ratones C57BL/6.

Por otro lado, se ha demostrado que el estado metabólico del individuo que recibe la suplementación con resveratrol influye en el efecto del mismo [125], por lo que se puede sugerir que de acuerdo a los resultados arrojados en nuestro estudio, el resveratrol no modifica la ganancia de peso corporal en un modelo sano con una dieta suplementada con resveratrol a una dosis de 200 mg/kg pc/día.

Ahora, en la **prueba de calorimetría indirecta** se presentó que los grupos alimentados con la dieta control, con y sin la suplementación de resveratrol, utilizaron preferencialmente carbohidratos durante el periodo de posprandio, por lo que su obtención de energía estaba dirigida esencialmente por la vía metabólica de la glucólisis [126], mientras que, al agotarse los carbohidratos disponibles en el periodo de ayuno, se activó la gluconeogénesis, para la biosíntesis de glucosa a partir de aminoácidos y ácidos grasos, por lo que el coeficiente respiratorio disminuyó debido a la oxidación combinada de la mezcla de sustratos, que era el comportamiento metabólico esperado.

A diferencia de los grupos alimentados con la dieta alta en grasa, con y sin la suplementación con resveratrol, que no siguieron el comportamiento metabólico normal, y utilizaron la oxidación de ácidos grasos como reacción metabólica principal tanto en el periodo de ayuno como en el periodo de posprandio, lo que sugirió el establecimiento de inflexibilidad metabólica a consecuencia del consumo de una dieta alta en grasa. Es decir, que no podían alternar la utilización de sustratos metabólicos dependiendo de las condiciones energéticas en las que se encontraba el organismo debido a que el exceso de nutrientes conllevó a la competición de sustratos que resultaron en “indecisión mitocondrial”, lo que provocó la falla en el intercambio de sustratos [127].

Por otra parte, respecto al consumo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono se observó que el grupo alimentado con la dieta alta en grasa suplementado con resveratrol, presentó un mayor consumo de oxígeno y una mayor producción de dióxido de carbono, tanto en ayuno como en posprandio, respecto al grupo no suplementado. Lo cual indicó que el resveratrol, en la dosis utilizada, incrementó la velocidad metabólica oxidativa del grupo alimentado con la dieta alta en grasa.

Así mismo, se observó que el grupo alimentado con la dieta alta en grasa no suplementado presentó el menor valor de consumo de oxígeno respecto al resto de los tratamientos dietarios. Lo que sugirió que el modelo de obesidad inducido por dieta disminuyó de forma significativa la velocidad metabólica oxidativa debido al desbalance metabólico que presentó este modelo.

Los resultados obtenidos en la calorimetría indirecta integrados, observaron que la suplementación con resveratrol no presentó ningún efecto en la proporción de sustratos oxidados entre los grupos suplementados respecto a los grupos no suplementados en ambas dietas. Sin embargo, los animales alimentados con una dieta alta en grasa y suplementados con resveratrol, incrementaron la velocidad metabólica oxidativa respecto al grupo alimentado no suplementado.

Por lo tanto, el grupo alimentado con la dieta alta en grasa suplementado con resveratrol, no mejoró la flexibilidad metabólica y oxidó la misma proporción de ácidos grasos que el grupo no suplementado, sin embargo, la velocidad de utilización de dicha proporción de sustratos fue significativamente mayor respecto al grupo no suplementado.

En la literatura se ha descrito un comportamiento muy similar en un modelo de inducción a obesidad a partir de una dieta alta en grasa suplementada con resveratrol a una dosis de 400 mg/kg pc/día en ratones C57BL/6, en donde se observó que el grupo alimentado con la dieta alta en grasa suplementada con resveratrol no presentó diferencias en el valor de RER pero sí en el volumen de oxígeno consumido, ya que Lagouge y colaboradores observaron que el resveratrol promueve la utilización de ácidos grasos como sustrato primario e incrementa la actividad oxidativa mitocondrial[82].

También se describió esta misma tendencia en la publicación de Wang y colaboradores en 2015, en donde se observó que la suplementación con resveratrol al 0.1% en una dieta alta en grasa con ratones CD1 presentó un fenómeno muy similar en donde el resveratrol indujo la expresión de biomarcadores de browning en tejido adiposo blanco, por lo que incrementó la velocidad metabólica oxidativa y la oxidación de ácidos grasos [83].

De manera que los resultados obtenidos en la prueba de calorimetría indirecta, resultan consistentes con los datos obtenidos en la curva de ganancia de peso corporal, en donde se observó que el grupo alimentado con la dieta alta suplementado con resveratrol presentó un menor incremento de peso respecto al grupo no suplementado, lo que atribuimos al incremento en la velocidad metabólica oxidativa que presentó el grupo alimentado con la dieta alta suplementado con resveratrol respecto al grupo no suplementado. Del mismo modo, los grupos alimentados con la dieta control, con y sin la suplementación de resveratrol, no presentaron diferencias en la ganancia de peso corporal entre sí, y tampoco en la velocidad metabólica oxidativa. Por lo que la velocidad metabólica oxidativa correlaciona negativamente con la ganancia de peso corporal.

Ahora, para evaluar el efecto del resveratrol en las alteraciones en el **metabolismo de glucosa** a nivel sistémico, se analizó la prueba de tolerancia a la glucosa, la concentración de insulina sérica y la concentración de glucosa sérica en ayuno.

Estas tres pruebas se eligieron de acuerdo con la descripción descrita por William Cefalu [128], en donde se describe la fisiopatología de la diabetes mellitus tipo 2 en modelos animales, y se menciona la historia natural del establecimiento de esta patología en modelos murinos de obesidad inducida por dieta, especialmente la cepa C57BL/6 que es más susceptible a la obesidad y la diabetes:

1. Por un lado, menciona que el primer paso en la historia natural del establecimiento de la diabetes es el desarrollo de la resistencia a la insulina, caracterizada por presentar niveles altos en la concentración de insulina para tratar de mantener la tolerancia a la glucosa normal, debido a que los islotes pancreáticos no alcanzan a compensar la ganancia de peso debido a la obesidad en un modelo alimentado con una dieta alta en grasa [128].
2. El segundo paso es la pérdida progresiva de la sensibilidad a la insulina, que conlleva a la intolerancia a la glucosa[128].
3. Y finalmente, el último paso consiste en la disfunción pancreática paulatina debida a una pérdida de la capacidad de secreción de insulina las células  $\beta$ -pancreáticas, que resulta en una deficiencia de insulina, lo que resulta en hiperglucemia en ayuno, y este paso final determina la manifestación clínica de diabetes mellitus tipo 2 [128].

Por un lado, en la determinación de la **concentración de insulina sérica** de los grupos no administrados con tunicamicina, se observó que los grupos alimentados con la dieta alta en grasa, con y sin la suplementación con resveratrol, presentaron hiperinsulinemia, con valores entre 21 y 34 veces más altos que los grupos alimentados con la dieta control. Lo cual sugiere que los dos grupos alimentados con la dieta alta en grasa presentaron resistencia a la insulina, aunque el grupo suplementado con resveratrol presentó niveles de insulina más bajos respecto al no suplementado. Mientras que los grupos alimentados con la dieta control, con y sin resveratrol, presentaron valores normales.

Por otro lado, para la evaluación de la **prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal** de los grupos no administrados con tunicamicina, se siguieron los dos criterios que utilizaron Andrikopoulos y colaboradores para determinar un comportamiento de intolerancia a la glucosa: 1) Presentaron valores hiperglucémicos después de 120 minutos de la carga de glucosa; 2) Presentaron valores significativamente mayores en el área bajo la curva de glucosa respecto al grupo alimentado con la dieta control [129]. Siguiendo estos criterios, se observó que, los grupos alimentados con la dieta alta en grasa, con y sin resveratrol, presentaron intolerancia a la glucosa y el resveratrol no modificó este comportamiento. Mientras que los grupos alimentados con la dieta control, con y sin resveratrol, presentaron un comportamiento normal.

Y finalmente, en la evaluación de la **concentración de glucosa sérica** de los grupos no administrados con tunicamicina, todos los grupos presentaron valores normoglucémicos de acuerdo a los valores normales descritos [130], sin embargo, el grupo alimentado con la dieta alta en grasa presentó una mayor concentración respecto a los grupos controles (con y sin resveratrol) y el grupo alta en grasa suplementado con resveratrol.

Integrando los resultados observados en estos tres parámetros para la evaluación del metabolismo de glucosa en los cuatro grupos no administrados con tunicamicina, se puede decir que ningún grupo cumplió con los criterios para determinar el establecimiento de diabetes mellitus tipo 2. Aunque, el grupo alimentado con la dieta alta en grasa desarrolló resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa, y presentó una concentración de glucosa sérica mayor, que posiblemente se encontró dentro del rango normal debido a que aún no comenzaba con la disfunción pancreática progresiva característica de la última etapa de progresión a diabetes, dado que las células  $\beta$  pancreáticas aún secretaban insulina. Sin embargo los resultados obtenidos sugieren que la concentración de insulina presente en este grupo, a pesar de presentar el valor más alto, estaba empezando a dejar de ser suficiente para compensar la concentración de glucosa sérica, y por ello la elevación en la concentración de glucosa.

Por otro lado, el grupo con la dieta alta en grasa con resveratrol presentó también intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina, aunque presentó una concentración menor de insulina respecto al grupo alta en grasa, y también niveles de glucosa sérica menores. Esto sugiere que a pesar de que estos animales presentaron intolerancia a la glucosa, requerían una menor secreción de insulina para compensar la concentración de glucosa sérica en valores normales, comparables con los de los grupos alimentados con la dieta control y control con resveratrol, lo que sugiere que el resveratrol incrementó la sensibilidad a la insulina, y por ello se encontraban en una fase de progresión de DM2 menos avanzada en relación al grupo alta en grasa no suplementado.

Consistentemente con los resultados obtenidos en los grupos no administrados con tunicamicina, Frendo-Cumbo y colaboradores encontraron también que en un modelo de inducción a obesidad con ratones C57BL/6 alimentados con una dieta alta en grasa (60% Kcal de grasa) y suplementados con resveratrol a una dosis de 100 mg/kg pc/d, que la suplementación con resveratrol no mejoró la intolerancia a la glucosa respecto al grupo no suplementado, y tampoco presentó efecto en la prueba de tolerancia a la insulina ni en la señalización de insulina en músculo y tejido adiposo [131].

Así mismo, Lagouge y colaboradores encontraron también que en un modelo de obesidad con ratones C57BL/6 con una dieta alta en grasa (45% Kcal grasa) y suplementados con resveratrol (400 mg/kg pc/d), la suplementación con resveratrol tampoco presentó resultados significativos en la tolerancia a la glucosa, sin embargo, al igual que en este estudio, el grupo suplementado con resveratrol disminuyó la concentración de glucosa sérica y los niveles de insulina en ayuno, por lo que también se observó que el resveratrol mejoró la sensibilidad a la insulina aunque no presentó cambios en la intolerancia a la glucosa [82]. De manera que los resultados obtenidos en los grupos no administrados con tunicamicina, respecto al efecto del resveratrol en el metabolismo de glucosa, resultan consistentes con lo que se ha descrito previamente en la literatura.

Un posible mecanismo para este fenómeno es el estrés del RE, ya que ha demostrado estar implicado en el desarrollo de la resistencia a la insulina durante la obesidad a través de diversos mecanismos que se explican a continuación [113].

En condiciones normales, en los tejidos sensibles a la insulina (hígado, tejido adiposo y músculo esquelético), la insulina se une a su receptor y lo activa, lo que provoca su autofosforilación. El receptor activado fosforila a su vez a los sustratos del receptor de insulina 1 y 2 (IRS1 e IRS2), lo que permite el reclutamiento y la activación de la cinasa del fosfatidilinositol 3 (PI3K), que induce la activación subsecuente de la proteína cinasa B (PKB), las proteínas cinasas C (PKCs) y mTOR, que activan diversas rutas de señalización involucradas en las acciones anabólicas de la insulina [113]. Las alteraciones en la señalización de insulina pueden ocurrir a partir de dos formas: 1) A partir de la fosforilación de residuos de serina en lugar de residuos de tirosina en IRS1 e IRS2 por medio de alguna proteína cinasa, como JNK. 2) A partir de la acumulación de diacilglicerol o ceramidas, que inhiben directamente a PKB [113].

En diversos estudios se ha demostrado que el estrés del RE inducido durante la obesidad puede promover directamente la resistencia a la insulina en hígado a partir de la activación de IRE1, que fosforila y activa a JNK e IKK, y éstas fosforilan a IRS1, bloqueando la cascada de señalización de insulina. Así mismo, se ha demostrado que la resistencia a la insulina en un modelo de obesidad puede presentarse de forma secundaria a la presencia de esteatosis hepática, que conlleva a la acumulación de ceramidas y que activa a las cinasas PP2A y PKC $\zeta$ , que resultan en la inhibición de PKB [113].

Por otro lado, también se ha descrito que el estrés del RE tiene una participación directa en la señalización de insulina en tejido adiposo, aunque se ha demostrado que no es a través de la ruta de IRE1/JNK, sino a través del incremento en la lipólisis por medio de la disminución en la expresión de la proteína perilipina A, aunque el mecanismo exacto aún no ha sido descrito [113].

Y por otra parte, también se sabe que en el caso del músculo, la causa principal de la resistencia a la insulina es la lipotoxicidad por la acumulación ectópica de ácidos grasos, principalmente las ceramidas, que como se mencionó, inhiben a PKB. Así mismo se ha descrito que el estrés del RE inducido en la obesidad activa a la ruta de IRE1/JNK, al igual que en hígado, lo que provoca la fosforilación de IRS1 [113].

De acuerdo con esto, se puede sugerir que uno de los mecanismos a través del cual el grupo alimentado con la dieta alta en grasa pudo presentar resistencia a la insulina pudo ser debido a la inducción crónica del estrés del RE en nuestro modelo de obesidad, y que quizá el resveratrol pudo haber mostrado algún efecto inhibitorio en la activación del estrés RE, y por ello haber incrementado la sensibilidad a la insulina, y presentó una fase de progresión de DM2 menos avanzada en relación al grupo alta en grasa no suplementado.

La tunicamicina, por otra parte, es un inductor farmacológico agudo del estrés del RE, que también ha demostrado estar asociado con la inducción de resistencia a la insulina en diversos modelos experimentales celulares, como en células de músculo C2C12 [132]. Sin embargo, no se ha descrito el mecanismo exacto en modelos *in vivo*.

En los resultados obtenidos en la determinación de la **concentración de insulina sérica** de los grupos administrados con tunicamicina, se presentó que los grupos alimentados con la dieta alta en grasa, con y sin resveratrol, presentaron hiperinsulinemia, mientras que los grupos alimentados con la dieta control, con y sin resveratrol, presentaron valores semejantes al grupo control incluso con la administración de tunicamicina. Todos los grupos presentaron una tendencia a incrementar la concentración de insulina sérica ante la administración de tunicamicina respecto a los grupos no administrados, sin embargo, se observó de forma más dramática en el grupo alimentado con la dieta alta en grasa (150% respecto al valor de insulina sérica en el grupo alta en grasa sin tunicamicina).

Tovar-Palacio y colaboradores observaron en un modelo de ratones C57BL/6 sanos administrados con un modelo de administración de tunicamicina i.p. (1  $\mu$ g/g pc) 8 h previas a la eutanasia, al igual que la forma empleada en nuestro trabajo, que la tunicamicina indujo un incremento en la concentración sérica de insulina respecto al grupo control, que no fue tan dramático como el que se observó en el grupo en el que la tunicamicina se administró 24 h previas a la eutanasia, pero que si fue significativo [16].

El comportamiento de los grupos administrados con tunicamicina en nuestro modelo no muestra un incremento significativo en la concentración sérica de insulina respecto a los grupos no tratados con tunicamicina. Sin embargo, es posible que en el grupo alta en grasa, el incremento en la concentración de insulina haya sido más notable que en el resto de los grupos debido a que, por el estado metabólico en el que se encontraba por un posible estrés del RE crónico, el insulto agudo con tunicamicina le hubiera provocado desbalance metabólico mayor respecto a los grupos suplementados con resveratrol y el grupo alimentado con la dieta control.

Por otro lado, en la **concentración sérica de glucosa** se observó que en los grupos tratados con tunicamicina no suplementados con resveratrol, tanto el grupo alimentado con la dieta control como el grupo alimentado con la dieta alta en grasa, disminuyeron los niveles de glucosa sérica respecto a los grupos no tratados con tunicamicina, aunque se encontraron dentro del rango normal. Mientras que los grupos suplementados con resveratrol, tanto el grupo alimentado con la dieta control como con la dieta alta en grasa, no modificaron los niveles de glucosa sérica incluso ante la administración de tunicamicina.

Este comportamiento podría sugerir que los grupos no suplementados con resveratrol presentaron una falla hepática aguda ante la administración con tunicamicina, que provocó el desarrollo de esteatosis hepática aguda; como se ha descrito previamente por Jo y colaboradores en ratones administrados con esta misma dosis de tunicamicina (1 µg/g pc) [133]. El planteamiento de este fenómeno correlaciona con los resultados encontrados en nuestro modelo en la tendencia observada en los valores de ALT y AST, así como el contenido de triglicéridos y colesterol entre los grupos no suplementados con resveratrol y administrados con tunicamicina, respecto a los grupos no administrados con tunicamicina, lo que sugiere que ambos grupos presentaron esteatosis hepática y por lo tanto, una falla hepática aguda. Así mismo, al ser el hígado el principal órgano regulador de la homeostasis en el metabolismo de glucosa, una falla hepática aguda provoca la acumulación de glucógeno hepático debido a la inflamación inducida y la inhibición de las enzimas involucradas en la ruta de glucogenólisis [134], lo cual provoca la disminución de la concentración de glucosa sérica [135], que podría asociarse con que no se modificara la concentración de insulina ante la administración de tunicamicina. Ya que en el modelo de Tovar-Palacio y colaboradores, en donde la concentración de insulina sí incrementó ante la administración de tunicamicina, la concentración de glucosa sérica no disminuyó el tiempo de la determinación, y esto podría justificar que la tunicamicina no hubiera incrementado la concentración de insulina [16].

Así mismo, se podría justificar que los grupos suplementados con resveratrol, tanto en el grupo alimentado con la dieta control como con alta en grasa, no modificaron la concentración de glucosa sérica ante la administración de tunicamicina debido a un efecto hepatoprotector del resveratrol ante el desarrollo de esteatosis hepática. Similar a lo que describieron previamente Pan y colaboradores, en donde presentaron que el resveratrol previno el desarrollo de esteatosis hepática en ratas Sprague Dawley ante el estrés del RE [136]. Lo cual correlaciona, no sólo con que no se hubiera modificado la concentración de glucosa sérica, sino también con los niveles de AST, ALT y el contenido de colesterol y triglicéridos en hígado, incluso ante la administración de tunicamicina.

Por otro lado, para evaluar el **metabolismo de lípidos a nivel sistémico**, se analizaron los parámetros de concentración de triglicéridos, colesterol total, colesterol LDL y colesterol HDL. La importancia de estos tres parámetros recae en la asociación de los mismos con diversas patologías asociadas a la obesidad.

Tanto los niveles elevados de triglicéridos en suero, como la concentración elevada de colesterol total y de baja densidad (LDL), y la concentración disminuida de colesterol de alta densidad (HDL), están altamente asociados con la presencia de obesidad visceral y resistencia a la insulina [137], dado que el incremento en la adiposidad como los niveles elevados de insulina conllevan a la elevación de ácidos grasos no esterificados, que impactan el metabolismo de lipoproteínas [137]. Además de que, tanto la hipertrigliceridemia como la hipercolesterolemia, están involucradas con el desarrollo de aterosclerosis, que se asocia al desarrollo de enfermedades cardiovasculares [138]; y tan sólo la presencia de hipercolesterolemia, ha demostrado estar asociada con el desarrollo de esteatosis hepática (hígado graso)[138], disfunción renal temprana [139] y el desarrollo de nefropatías en un modelo de diabetes [140], y también se sabe que la hipercolesterolemia induce al estrés del RE y activa a la UPR [141].

En los resultados obtenidos se observó que el grupo alimentado con la dieta alta en grasa no presentó hipertriglicéridemia, pero sí hipercolesterolemia, con niveles elevados tanto en la concentración de colesterol total como de colesterol LDL en suero, sin mostrar variaciones en la concentración de colesterol HDL. Esto es debido a que, según lo descrito en la literatura, los modelos de obesidad inducidos por una dieta alta en grasa saturada se utilizan para inducir hipercolesterolemia y aterosclerosis, mientras que para inducir hipertrigliceridemia se utilizan dietas altas en fructosa o sacarosa [142].

Por otro lado, se observó que el grupo alimentado con la dieta alta en grasa con resveratrol no presentó ni hipertrigliceridemia ni hipercolesterolemia, y presentó un comportamiento muy similar a los grupos alimentados con la dieta control. Lo cual correlaciona con que presentara una mayor sensibilidad a la insulina y menor ganancia de peso corporal respecto al grupo alta en grasa.

En la literatura se ha descrito este mismo comportamiento en un modelo de inducción a obesidad a partir de una dieta alta en grasa suplementada con resveratrol a una dosis de 400 mg/kg pc/día en ratones C57BL/6 descrito por Lagouge y colaboradores, en donde el resveratrol no tuvo ningún efecto respecto al grupo alta en grasa no suplementado.

Así mismo, Wang y colaboradores, describieron que en ratones C57BL/6 alimentados con una dieta alta en grasa (21.45% grasa) por 26 semanas, la suplementación con resveratrol (0.06%) redujo de forma significativa la concentración de colesterol total y LDL respecto al grupo con la dieta alta en grasa no suplementado.

De manera que los resultados obtenidos en este estudio respecto al efecto del resveratrol en el metabolismo de lípidos a nivel sistémico, resultan consistentes con lo que se ha descrito previamente en la literatura.

Ahora, en los grupos administrados con tunicamicina, se observó que los animales administrados con tunicamicina no suplementados con resveratrol, tanto el grupo alimentado con la dieta alta en grasa como el grupo alimentado con la dieta control, disminuyeron de forma importante la concentración sérica de triglicéridos, colesterol total, colesterol LDL y colesterol HDL respecto a los grupos no administrados con tunicamicina. Mientras que los grupos suplementados con resveratrol y administrados con tunicamicina no disminuyeron la concentración de estos cuatro parámetros respecto a los grupos sin tunicamicina. Mecanismo que nuevamente podría justificarse a partir de la inducción de esteatosis hepática a partir de la administración del fármaco.

Los hepatocitos en condiciones normales realizan diversas funciones metabólicas entre las que se encuentra la síntesis y ensamblaje de lipoproteínas, así como la síntesis de colesterol, y ambas se llevan a cabo principalmente en el RE. Por lo tanto, estas funciones de ven afectadas ante la inducción aguda del estrés del RE por tunicamicina, dado que éste induce el daño hepático, y esto provoca la disminución de la concentración de colesterol y triglicéridos séricos, e incrementa la concentración de colesterol y triglicéridos hepáticos [133,143]. Por lo que nuestros resultados sugieren que (al igual que en la disminución en la concentración de glucosa, la disminución en la concentración de triglicéridos, colesterol total, colesterol LDL y colesterol HDL) se debe a que los grupos no suplementados con resveratrol probablemente presentaron daño hepático por el desarrollo de esteatosis hepática derivada de la administración de tunicamicina, lo que correlaciona con el incremento en los niveles de AST, ALT y el contenido hepático de lípidos ante la administración de tunicamicina.

Todo ello resulta consistente con lo que observaron Jo y colaboradores en ratones inyectados con tunicamicina i.p. (1 µg/g pc) en donde observaron que la concentración sérica de triglicéridos disminuyó con el tiempo de administración de la tunicamicina a razón del incremento del contenido de triglicéridos intrahepáticos [133]. Al igual que Tovar-Palacio y colaboradores, que presentaron que en ratones C57BL/6 sanos inyectados con tunicamicina 8h previas a la eutanasia, la concentración tanto de triglicéridos como de colesterol séricos disminuyeron, a razón de que el contenido de lípidos hepáticos, tanto de triglicéridos como de colesterol, incrementó [16].

A diferencia de los grupos suplementados con resveratrol, cuyos niveles de triglicéridos y colesterol séricos sugieren un efecto hepatoprotector ante la administración de tunicamicina, que correlaciona con un incremento menor en los niveles de AST, ALT y el contenido de triglicéridos y colesterol hepáticos. Similar a lo descrito por Pan y colaboradores en ratas Sprague Dawley suplementadas con resveratrol (100 mg/kg pc/d) en un modelo de inducción del RE crónico [136].

Ahora, para evaluar la **regulación de adipocinas** en este modelo, se analizaron la concentración de leptina y la relación de adiponectina de alto peso molecular (HMW) respecto a la concentración total de adiponectina.

Se sabe que uno de los factores presentes en el desarrollo de obesidad es la presencia de inflamación de bajo grado, que está asociada con la expansión del tejido adiposo blanco por un incremento en el almacenamiento de grasa en el tejido adiposo [144], lo que provoca el desarrollo de hiperplasia, hipertrofia, inflamación y fibrosis [145]. Y estas condiciones inducen una alteración de la secreción de adipocinas [144], que son polipéptidos que actúan como reguladores metabólicos en diversos órganos y tejidos [146]. Esto genera un incremento en la síntesis de algunas adipocinas, como la leptina; y la disminución de los niveles de algunas otras, como la adiponectina [145,146]. Esta situación contribuye con el estado de inflamación del tejido adiposo y la alteración metabólica de los adipocitos [144].

La adiponectina es una adipocina antiinflamatoria. Los niveles altos de adiponectina, principalmente la isoforma de alto peso molecular, tienen un papel protector contra el establecimiento del síndrome metabólico, y ha mostrado restablecer la tolerancia a la glucosa, incrementar la utilización de glucosa y mejorar la sensibilidad a la insulina [145], además de acelerar el gasto calórico y la oxidación de ácidos grasos en músculo e hígado, lo que disminuye el contenido de triglicéridos en tejido [144]. Por el contrario, cuando la concentración de adiponectina disminuye, como sucede en la obesidad, la gluconeogénesis incrementa, la captación de glucosa disminuye y se favorece la implantación de hiperlipidemia, lo que favorece el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, resistencia a la insulina y diabetes mellitus tipo 2 [146].

Así mismo, se ha demostrado que la hipoadiponectinemia está asociada con hipoalbuminuria y disfunción endotelial en riñón, principalmente en podocitos, lo cual contribuye al desarrollo de falla renal crónica [147].

Por otro lado, la leptina induce la liberación de péptidos que regulan el consumo de alimento y generan la sensación de saciedad en el hipotálamo [146]. La leptina circulante es producida en proporción a la grasa almacenada con la finalidad de “informar” al sistema nervioso central acerca de la acumulación excesiva de grasa corporal, para reducir el consumo de alimento e incrementar el gasto energético [146]. Sin embargo, durante la obesidad se ha descrito el desarrollo de una condición denominada “resistencia a la leptina”, en la cual se da un transporte reducido de leptina a través de la membrana hematoencefálica y/o una reducción del receptor de leptina intracelular (ObRb), lo cual inhibe la correcta cascada de señalización de la leptina [145,146], y esto provoca un exceso de consumo de alimento y una disminución en el gasto energético [146]. Así mismo, la concentración elevada de leptina, está asociada con alteraciones en la sensibilidad y el desarrollo de resistencia a la insulina [145].

La leptina es filtrada en el riñón, por lo que en pacientes con falla renal crónica, la concentración de leptina se encuentra elevada [148]. Además, se ha observado que la leptina tiene consecuencias directas en la fisiopatología renal. Se sabe que estimula la proliferación celular y la síntesis de colágeno IV en el células endoteliales del glomérulo y que estimula la síntesis de colágeno tipo I en células mesangiales, lo cual esta asociado con la expansión de la matriz mesangial y el desarrollo de glomeruloesclerosis [147,148].

Los resultados obtenidos en este estudio presentaron que el grupo alimentado con la dieta alta en grasa presentó hiperleptinemia respecto a los demás grupos y la menor proporción de adiponectina de alto peso molecular respecto a la concentración de adiponectina total.

La hiperleptinemia es necesaria para el desarrollo de resistencia a la leptina [149], por lo que se sugiere que los animales alimentados con la dieta alta en grasa presentaron esta condición. Por otro lado, aunque no presentaron una disminución en los niveles de adiponectina total, si presentaron la menor proporción entre la isoforma de alto peso molecular (HMW) respecto a la total, que ha demostrado ser la isoforma más activa y la que está asociada con diversos beneficios metabólicos. Ambas condiciones correlacionan con que el hecho de que el grupo alimentado con la dieta alta en grasa presentara la mayor ganancia de peso corporal, y seguramente la mayor proporción de masa grasa, aunque no se determinó. Así mismo, correlacionan con la presencia de hiperinsulinemia, que sugiere el desarrollo de resistencia a la insulina y con la concentración elevada de colesterol total y LDL. Ambas condiciones han estado asociadas también con el desarrollo de daño renal, por lo que estas determinaciones sugirieron el desarrollo de daño renal en este grupo.

A diferencia del grupo alimentado con la dieta alta en grasa, los animales alimentados con esta misma dieta pero suplementados con resveratrol, no presentaron diferencias en la concentración de leptina de forma significativa respecto a los alimentados con la dieta control y presentaron la mayor proporción de la isoforma de adiponectina de alto peso molecular respecto a la total. Esto sugirió, por un lado, que la suplementación con resveratrol impidió el desarrollo de resistencia a la leptina, y que incrementó los niveles de la isoforma activa de la adiponectina, que se ha asociado con beneficios metabólicos. Estas condiciones correlacionan con que la suplementación con resveratrol en este grupo haya disminuido la concentración de insulina sérica, la ganancia de peso corporal, el incremento en la velocidad metabólica oxidativa de lípidos, así como la concentración en suero de colesterol HDL y LDL. Esto también sugirió, que posiblemente estas condiciones hayan correlacionado de forma negativa con el desarrollo de daño renal inducido por una dieta alta en grasa.

Consistentemente, Wang y colaboradores también observaron que el resveratrol disminuyó de forma significativa la concentración de leptina en ratones C57BL/6 alimentados con una dieta alta en grasa (21.45% de grasa) durante 26 semanas suplementados con resveratrol (0.06%) respecto al grupo no suplementado, y a ello atribuyen la reducción en la masa grasa del grupo tratado con resveratrol [150], aunque no proponen un mecanismo molecular a través del cual esto ocurre.

También se observó en células 3T3-L1 de adipocitos, que el tratamiento con resveratrol promovió la multimerización de la adiponectina a través de la regulación de la activación de la ruta de AMPK y de AKT/FOXO1, que pertenecen a la ruta de señalización de la insulina [151]. Así mismo, Ji y colaboradores observaron que la suplementación con resveratrol (no se menciona la dosis) en ratas Sprague Dawley que desarrollaron nefropatía diabética inducida farmacológicamente (estreptozotocina), incrementa la expresión del receptor de adiponectina AdipoR1 en el riñón a través de la activación de la ruta de FOXO1, lo que disminuyó marcadores de daño renal como la expresión de colágeno IV y fibronectina, y redujo significativamente la expansión mesangial [152].

De forma que los resultados obtenidos en este estudio respecto al efecto del resveratrol sobre los parámetros hormonales de leptina y adiponectina, resultan consistentes con lo que se ha observado en estudios similares.

Uno de los mecanismos asociados con el desarrollo tanto de resistencia a la leptina como de hipoadiponectinemia, es el estrés del RE, tanto crónico (como el inducido en la obesidad) como agudo (como el inducido por la tunicamicina).

Por un lado, respecto a la resistencia a la leptina, se ha descrito que en la obesidad, la hiperhomocisteinemia, que está presente frecuentemente en esta patología, es uno de los inductores del estrés del RE crónico, y esta asociación de factores provoca el desarrollo de resistencia a la leptina [116]; así mismo, se sabe que la obesidad induce el estrés del RE hipotalámico crónico por la alteración post-traducciona del precursor hormonal proopiomelanocortina (POMC), lo que provoca la resistencia a la leptina [153]. Mientras que, en la administración de tunicamicina, se ha descrito que el mecanismo de inducción de resistencia a la leptina es a través de la activación de la proteína fosfatasa de tirosina 1B [116].

De forma que también se podría sugerir que el grupo alimentado con la dieta alta en grasa presentó hiperleptinemia respecto a los demás grupos por una regulación río arriba de la activación del estrés del RE crónico inducido por nuestro modelo de obesidad.

En el caso de los grupos administrados con tunicamicina, se observó que todos los grupos presentaron una tendencia a presentar una mayor concentración de leptina ante la administración de tunicamicina respecto a los grupos no administrados, que fue significativa en el caso del grupo alta en grasa, más no en el caso del grupo alta en grasa suplementado con resveratrol. Este fenómeno podría sugerir que el insulto agudo con la tunicamicina promovió aún más la resistencia a la leptina en el grupo alimentado con la dieta en grasa debido al estado de desbalance metabólico previo, y el posible estrés del RE crónico en tejido adiposo, en el que se encontraban estos animales desde antes de la administración de tunicamicina.

No se encontró ningún estudio donde se trataran ratones alimentados con una dieta alta en grasa y posteriormente tunicamicina. Sin embargo, Ozcan y colaboradores observaron en ratones C57BL/6 sanos tratados con una bomba de infusión, que la tunicamicina (2  $\mu$ L) incrementó de forma significativa la concentración sérica de leptina [60]. Al igual que en el estudio de Tovar-Palacio y colaboradores, en donde la administración de tunicamicina (1  $\mu$ g/g pc) 8 h previas a la eutanasia en ratones sanos C57BL/6, donde el incremento en la concentración de Leptina por la administración de tunicamicina fue significativo, aunque fue más dramático en el grupo administrado 24 h previas a la eutanasia [16].

Mientras que la suplementación con resveratrol en el grupo alimentado con la dieta alta en grasa previno el establecimiento de la resistencia a la leptina incluso ante la administración de tunicamicina, que podría sugerir que el resveratrol inhibió la activación del estrés del RE crónico en el tejido adiposo y de esta forma previno el desarrollo de resistencia a la leptina.

Por otro lado, también se ha descrito que el estrés del RE que se induce en el tejido adiposo está asociado con la hipoadiponectinemia, tanto en la obesidad como en la administración de tunicamicina. Ya que se ha demostrado que en la obesidad, se genera un ambiente hipóxico en los adipocitos [154], y esto provoca una disminución en la expresión, tanto genética como proteica, así como la multimerización de la adiponectina [155]. Y que la inducción del estrés del RE por medio de tunicamicina (usando como marcadores a p-eIF2 $\alpha$ , CHOP y GADD34) en adipocitos, inhibe la expresión genética, la expresión proteica y la multimerización de adiponectina [119].

De acuerdo con eso, se podría sugerir que el grupo alta en grasa presentó el menor porcentaje de adiponectina multimerizada respecto al resto de los grupos debido a la regulación río arriba del estrés del RE crónico inducido en el tejido adiposo a consecuencia de la obesidad. Mientras que en el caso del grupo suplementado con resveratrol alimentado con la dieta alta en grasa, se podría sugerir que el resveratrol inhibió la activación del estrés del RE y por lo tanto, no sólo no modificó su concentración respecto al grupo sin tunicamicina, sino que siguió presentando el valor mayor respecto al resto de grupos.

Mientras que en los grupos administrados con tunicamicina, se observó que los grupos alimentados con la dieta control, con y sin resveratrol, no modificaron el porcentaje de multimerización o de síntesis de adiponectina respecto a los grupos sin tunicamicina, y que el grupo suplementado con resveratrol alimentado con la dieta alta en grasa siguió presentando el porcentaje más alto incluso con la administración de tunicamicina (25% más alto que el grupo no suplementado y administrado con tunicamicina). A diferencia del grupo alta en grasa, que presentó una tendencia a disminuir este porcentaje respecto al grupo sin tunicamicina.

Esta tendencia resulta consistente con los resultados observados por Torre-Villalvazo y colaboradores, en donde observó que en un estudio *in vitro* con adipocitos de ratones C57BL/6 tratados con pioglitazona (para estimular la producción de adipocinas) y tunicamicina (24 h previas a la eutanasia), la síntesis y la multimerización de adiponectina se redujeron ante el tratamiento con tunicamicina [156].

Esto podría sugerir, que al igual que en caso de la concentración de leptina sérica, el insulto agudo con la tunicamicina promovió aún más la hipoadiponectinemia en el grupo alimentado con la dieta en grasa debido al estado de desbalance metabólico previo, y el posible estrés del RE crónico en tejido adiposo, en el que se encontraban estos animales desde antes de la administración de tunicamicina. A diferencia de los grupos suplementados con resveratrol y el grupo control, que incluso a pesar de la administración con tunicamicina no modificaron la relación de adiponectina, posiblemente debido a que estos grupos presentaban un estado metabólico sano, y de acuerdo con lo descrito, quizá se hubieran requerido más horas para ver el efecto de la tunicamicina en estos grupos.

Así mismo, se puede sugerir que la suplementación con resveratrol en el grupo alimentado con la dieta alta en grasa previno el desarrollo de adiponectinemia incluso ante la administración de tunicamicina, que podría sugerir que el resveratrol inhibió la activación del estrés del RE crónico en el tejido adiposo y de esta forma previno la inhibición de la multimerización de adiponectina.

Después de evaluar el efecto del resveratrol y el comportamiento del modelo de inducción a obesidad por medio de una dieta alta en grasa a nivel sistémico, se realizó el **análisis de diversos parámetros en tejido renal**.

En los **parámetros bioquímicos séricos de función renal**, se presentó que el grupo alimentado con la dieta alta en grasa presentó el valor más alto de creatinina que se encontró fuera del rango normal descrito para esta cepa de ratones, a diferencia de los grupos alimentados con la dieta control, con y sin resveratrol, y el grupo que consumió la dieta alta en grasa pero fue suplementado con resveratrol, que presentaron valores dentro del rango normal. Lo que sugirió que el grupo alimentado con la dieta alta en grasa presentó lesiones renales que provocaron una baja depuración de este metabolito en orina en estos animales. Lo cual correlacionó con que este mismo grupo hubiera presentado hipoalbuminemia, que sugiere que estos animales pudieron haber presentado albuminuria asociada a daño glomerular, aunque dicho parámetro no se determinó.

Posteriormente, como los marcadores de función renal séricos sugirieron la presencia de **lesiones renales**, se determinaron de forma cuantitativa a partir del **análisis histológico**, en el que se determinó el número de células por área mesangial y el porcentaje del área en los túbulos proximales que estaba siendo ocupada por vacuolas lipídicas.

Por un lado, la hiper celularidad mesangial es un tipo de glomerulonefritis mesangial proliferativa es decir, un tipo de lesión que afecta la estructura y función de glomérulo caracterizada por la proliferación de células mesangiales, lo que provoca la expansión de la matriz mesangial extracelular [157,158]. Es por ello que se utilizó la determinación de hiper celularidad mesangial como un marcador de daño glomerular.

Por otro lado, la función principal de los túbulos proximales es la reabsorción de sodio a través de un proceso que requiere una gran cantidad de energía, que se obtiene principalmente a partir de la oxidación de ácidos grasos. Sin embargo, se ha demostrado que el consumo de una dieta alta en grasa provoca la acumulación de lípidos en túbulos proximales, lo cual se debe a la reducción en la actividad de AMPK en el riñón, lo que conlleva a la activación de ACC, una de las enzimas involucradas en la síntesis de lípidos, y a la disminución de las enzimas involucradas en la oxidación de ácidos grasos, y se ha demostrado que los túbulos proximales son las estructuras renales más susceptibles de acumular lípidos [159]. La importancia de este marcador recae en que, la acumulación de lípidos en túbulos proximales está asociada con la enfermedad renal crónica debido a que desencadena de forma progresiva el desarrollo de fibrosis tubulointersticial, que provoca falla renal [159]. Es por ello que se tomó este parámetro como un marcador de daño tubular, que además es muy informativo acerca de la acumulación de lípidos en tejido renal, que es el objetivo central de este proyecto.

En los resultados obtenidos, se presentó que el grupo alimentado con la dieta alta en grasa presentó hiper celularidad mesangial y expansión de la matriz extracelular en el glomérulo, acompañada de un engrosamiento en la membrana basal glomerular y presentó acumulación de vacuolas lipídicas e inflamación en los túbulos proximales. Esto hace referencia a que el consumo de la dieta alta en grasa provocó lesiones renales tanto glomerulares como tubulares, que posiblemente sean la causa de la elevación de los niveles de creatinina sérica en este grupo.

También se observó que el grupo alimentado con la dieta alta en grasa suplementado con resveratrol, a diferencia del grupo no suplementado, presentó celularidad mesangial normal, muy similar a la del grupo control; y prácticamente no presentó acumulación de vacuolas lipídicas en túbulos proximales. Esto sugiere que la suplementación con resveratrol presentó un efecto benéfico en las alteraciones renales fisiopatológicas que indujo la dieta alta en grasa, lo cual también correlaciona con que este grupo hubiera presentado valores normales de creatinina y un comportamiento similar al de los grupos controles, con y sin resveratrol.

Del mismo modo, se observó que tanto la celularidad mesangial como la vacuolización lipídica correlacionan de forma positiva con la ganancia de peso corporal, la concentración sérica de colesterol, insulina y leptina; y de forma negativa con la velocidad metabólica oxidativa y la relación de adiponectina HMW/Total. Por lo que sugiere que el daño renal está relacionado con la disminución de la velocidad metabólica oxidativa en este modelo por el establecimiento de la obesidad inducida por dieta, el desarrollo de hipercolesterolemia y la resistencia a la insulina y a la leptina que presentó este grupo; y que los beneficios observados por el resveratrol en estas lesiones posiblemente se deban al incremento en la velocidad metabólica oxidativa que presentó este grupo y que provocó que presentaran una menor ganancia de peso corporal, una mayor proporción de adiponectina HMW, y una menor concentración sérica tanto de colesterol como de leptina.

Consistentemente con los resultados mostrados en este estudio, Ji y colaboradores también observaron que la suplementación con resveratrol (no se menciona la dosis) en ratas Sprague Dawley que desarrollaron nefropatía diabética inducida farmacológicamente (estreptozotocina), presentó un menor volumen glomerular, un menor número de células mesangiales y una membrana basal glomerular menos engrosada, que atribuyen a una correlación positiva con el incremento en la expresión del receptor de adiponectina AdipoR1 y la multimerización de adiponectina en tejido adiposo [152]. Así mismo, Park y colaboradores, encontraron que en ratones db/db a una dosis de 20mg/kg pc/d disueltos en 0.5% de CMC, se observó una menor área de expansión mesangial, lo que atribuyen a un incremento en los receptores de adiponectina AdipoR1 y AdipoR2 que se debió a la activación de AMPK-SIRT1-PPAR $\alpha$  [160].

Así mismo, Zhou y colaboradores observaron que en ratones C57BL/6J suplementados con 400 mg/ kg pc/ d vía oral y alimentados una dieta alta en grasa (40% Kcal grasa), el resveratrol disminuyó la acumulación de lípidos en túbulos proximales, la acumulación de colágeno y la fibrosis asociadas a la nefropatía inducida por una dieta alta en grasa, y proponen que esto se debió al incremento en la expresión de PPAR $\alpha$  regulado por AMPK, que indujo la captación, utilización y catabolismo de ácidos grasos [161].

De manera que los resultados obtenidos en este estudio respecto al efecto del resveratrol sobre los marcadores determinados de daño renal, tanto glomerular como tubular, resultan consistentes con lo que se ha descrito previamente en la literatura en estudios similares.

Se sabe que el estrés del RE fisiológico crónico, como el de la obesidad, es un posible mecanismo asociado con el desarrollo de diversas patologías renales, como la nefropatía diabética, la fibrosis renal, nefropatía asociada a obesidad, entre otras; a través de la inducción de respuestas apoptóticas en el tejido renal por medio de la ruta de PERK-ATF4-CHOP [162]. Así como también se ha demostrado que la inducción aguda del estrés del RE por tunicamicina, induce daño renal agudo a través de la regulación de CHOP [163].

Esto podría sugerir que la presencia de marcadores de lesión renal, como la hiper celularidad mesangial y el incremento de lípidos acumulados en túbulos proximales que se observaron en el grupo alimentado con la dieta alta en grasa, podría deberse a la inducción crónica de estrés del RE en riñón en nuestro modelo de obesidad. Mientras que, en el caso del grupo suplementado y alimentado con la dieta alta en grasa se podría sugerir que el resveratrol inhibió la activación del estrés del RE y de esta forma previno la formación de lesiones renales a pesar de consumir la dieta alta en grasa.

Respecto a los grupos administrados con tunicamicina, se observó que todos los grupos presentaron una tendencia a incrementar en la concentración sérica de creatinina respecto a los grupos sin tunicamicina, que sólo fue significativa en el caso del grupo alimentado con la dieta alta en grasa. Lo que podría sugerir que el insulto agudo con la tunicamicina posiblemente provocó el desarrollo de daño renal agudo debido a la alteración metabólica en el riñón previa a la administración con tunicamicina.

Por otro lado, también se presentó que el grupo alta en grasa suplementado con tunicamicina presentó hiper celularidad mesangial y expansión de la matriz extracelular en el glomérulo, acompañada de un engrosamiento en la membrana basal glomerular y presentó acumulación de vacuolas lipídicas e inflamación en los túbulos proximales, de forma similar al grupo alta en grasa. Aunque en el grupo administrado con tunicamicina, se observó con mayor frecuencia la presencia de glomérulos alargados de forma anormal, que se describen con el nombre de glomerulomegalia, lo que sugiere que el insulto con tunicamicina presentó una tendencia a exacerbar las lesiones producidas por la nefropatía inducida por la dieta alta en grasa.

Lo cual coincide con lo que observaron Carlisle y colaboradores, en ratones C57BL/6 inyectados 3 días antes con tunicamicina i.p. (0.5 mg/ kg pc), donde se observó principalmente atrofia tubular y vacuolización en túbulos proximales [163]; y lo que observaron Cybulsky y colaboradores, en ratones CD tratados con tunicamicina, que presentaron también expansión de la matriz extracelular y glomeruloesclerosis [164]. Así como Tovar-Palacio y colaboradores, que observaron que la tunicamicina (1 µg/g pc) 8 h previas a la eutanasia indujo el desarrollo de expansión mesangial glomerular, la disminución del diámetro glomerular, disminución del espacio urinario, y alteraciones estructurales en los túbulos proximales así como vacuolización lipídica en los mismos [16].

Por lo que la inducción aguda del estrés del RE en el riñón por medio de la tunicamicina exacerbó las lesiones producidas por la nefropatía inducida por la dieta alta en grasa en el grupo no suplementado con resveratrol. Mientras que el grupo suplementado con resveratrol que también fue alimentado con la dieta alta en grasa y administrado con tunicamicina, a diferencia del grupo no suplementado, presentó celularidad mensangial normal y un porcentaje mínimo de acumulación de vacuolas lipídicas en túbulos proximales. Lo que sugiere que el resveratrol presentó un efecto renoprotector incluso ante la administración de tunicamicina, que podría deberse a la inhibición de la activación del estrés del RE en el riñón.

De forma similar a lo que observaron Kim y colaboradores, en donde observaron que la activación de AMPK (por medio de Metformina) suprimió la activación del estrés del RE inducido por tunicamicina (utilizando como marcadores a GRP78 y p-eIF2α) e inhibió el daño tubular, el desarrollo de fibrosis y la falla renal aguda en un modelo de células de riñón HK2 y en un modelo de ratón UO [35], análogo a lo que podría esperarse de un activador del AMPK como el resveratrol.

Se sabe que la acumulación de lípidos en tejido renal induce lipotoxicidad, y tiene un papel importante en el desarrollo de la enfermedad renal asociada a obesidad [159,165]. De acuerdo con lo descrito, hay ciertos tipos de células específicas en el riñón que se ven afectadas por la acumulación de lípidos: las células de túbulos proximales (como se mencionó en párrafos anteriores), los podocitos y las células mesangiales [159]. Para observar el efecto de resveratrol en la distribución de la acumulación de lípidos en nuestro modelo de obesidad inducido por una dieta alta en grasa se analizó la **tinción de rojo oleoso en tejido renal**.

En los resultados obtenidos de los grupos no tratados con tunicamicina, se observó que los animales alimentados con la dieta alta en grasa presentaron depósitos de lípidos neutros en tejido renal, tanto en glomérulos como en túbulos proximales, aunque se observó de forma más importante dentro del glomérulo. Lo que resulta consistente con lo que se observó en el análisis de vacuolización lipídica de túbulos proximales, y sugiere la existencia de una alteración del metabolismo de lípidos en el riñón. Por lo que coincide con lo que se ha descrito previamente, que demuestra que en ratones alimentados con una dieta alta en grasa, la acumulación de lípidos en tejido renal está asociada con el desarrollo de lesiones renales, entre las que se encuentran glomeruloesclerosis, fibrosis túbulointersticial y albuminuria [165].

Por otra parte, se observó que el grupo alimentado con la dieta alta en grasa pero suplementado con resveratrol, revirtió este comportamiento al controlar la acumulación de lípidos, tanto en túbulos proximales como en glomérulos. Que es consistente con lo que observaron Zhou y colaboradores, en ratones C57BL/6J suplementados con 400 mg/ kg pc/ d vía oral y alimentados una dieta alta en grasa (40% Kcal grasa) [161].

De forma que los resultados obtenidos en este estudio a nivel histológico de los grupos no tratados con tunicamicina observaron que la dieta alta en grasa indujo un incremento en el depósito de lípidos neutros en tejido renal, mientras que el resveratrol inhibió la acumulación de lípidos de en tejido renal.

Munusamy y colaboradores, propusieron que esta disfunción renal por medio de la acumulación de lípidos en tejido renal en un modelo de obesidad puede estar asociada con la activación del estrés del RE en el riñón a través de la concentración elevada de leptina que presentan estos grupos, y de la disminución en la concentración de ATP mediada por la disfunción mitocondrial que induce la obesidad [166]. Mientras que, Tovar-Palacio y colaboradores, también describieron que la inducción de estrés del RE agudo por medio de tunicamicina también induce la acumulación de lípidos en tejido renal.

De forma que la presencia de depósitos lipídicos en el riñón observada en los ratones alimentados con la dieta alta en grasa no tratados con tunicamicina podría deberse a la inducción crónica del estrés del RE en el riñón a consecuencia de la obesidad. Y la disminución de la acumulación de lípidos en tejido renal por el consumo de resveratrol en este mismo tipo de dieta podría estar mediada por la inhibición del estrés del RE.

Por otra parte, en los grupos tratados con tunicamicina, se observó que los animales alimentados con una dieta alta en grasa presentaron un mayor número de gotas lipídicas respecto al grupo sin tunicamicina, y presentaron una distribución uniforme tanto en glomérulos como en túbulos renales, mientras que el grupo alimentado con la dieta alta en grasa sin tunicamicina presentó depósitos lipídicos principalmente dentro del glomérulo.

Lo cual resulta consistente con lo observado por Tovar-Palacio y colaboradores en ratones C57BL/6 sanos que la administración de tunicamicina (1 µg/g pc) 8 h previas a la eutanasia, en donde se indujo el depósito de lípidos ectópicos, particularmente en túbulos renales, regulado por un incremento en la expresión de marcadores de estrés del RE (GRP78, ATF6 y CHOP) y de SREBP-1 [16]. Ya que el grupo alimentado con la dieta alta en grasa presentó depósitos lipídicos dentro de los glomérulos, seguramente a consecuencia de la dieta alta en grasa, y en los túbulos, a consecuencia de la administración de tunicamicina.

Mientras que el grupo alta en grasa suplementado con resveratrol, no presentó depósitos lipídicos, incluso con la administración de la tunicamicina, ni en los glomérulos ni en los túbulos renales. Lo que sugiere que el resveratrol presentó un efecto renoprotector ante la acumulación de lípidos en tejido renal, que pudo haber sido mediado por la inhibición del estrés del RE en riñón.

Para hacer la determinación y clasificación lipídica de forma cuantitativa, se determinó el **contenido de triglicéridos y de colesterol en tejido renal**.

En los resultados obtenidos en los grupos no administrados con tunicamicina, se observó que el grupo alimentado con la dieta alta en grasa presentó aproximadamente el doble de contenido lipídico en tejido renal, tanto de triglicéridos como de colesterol, respecto a los grupos alimentados con la dieta alta en grasa.

De forma similar a lo que observaron Jiang y colaboradores, en donde encontraron que en ratones C57BL/6J alimentados con una dieta alta en grasa (60% Kcal de grasa) incrementó el contenido tanto de triglicéridos como de colesterol en tejido renal, y lo atribuyeron en un incremento en la expresión de los dos reguladores de la síntesis de lípidos: SREBP-1 (triglicéridos) y SREBP-2 (colesterol) [167].

Sin embargo, el grupo alimentado con la dieta alta en grasa pero suplementado con resveratrol, no presentó diferencias en el contenido lipídico en tejido renal, ni de triglicéridos ni de colesterol, respecto al grupo control.

Lo cual resulta consistente con lo descrito por Zhou y colaboradores, en donde la suplementación con resveratrol (400 mg/ kg pc/ d) en el consumo de una dieta alta en grasa (40% Kcal. grasa) no presentó diferencias en el contenido de triglicéridos respecto al grupo control, a diferencia del grupo alta en grasa que presentó un incremento significativo respecto a ambos grupos [161].

No hay estudios similares en donde describan que el resveratrol disminuya el contenido de colesterol en el tejido renal de animales que consumieron una dieta alta en grasa, sin embargo, Zhu y colaboradores, observaron que la suplementación con resveratrol (70 mg/ kg pc/ d) en ratas Sprague Dawley alimentadas con una dieta alta en grasa disminuyó el contenido de colesterol hepático de forma significativa respecto al grupo no suplementado, y sugieren que este mecanismo podría deberse a la reducción en la actividad de la escualeno-monooxigenasa [168], que es regulada transcripcionalmente por SREBP-2, según observaron Nagai y colaboradores [169].

De manera que los resultados obtenidos en este estudio en los grupos no administrados con tunicamicina respecto al efecto del resveratrol sobre el contenido de triglicéridos y colesterol resultan consistentes con lo que se ha descrito previamente en estudios similares, y correlacionan con los resultados observados en este estudio, tanto con el porcentaje de vacuolas lipídicas en túbulos proximales como con la acumulación de depósitos lipídicos observados en la tinción de rojo oleoso.

Ahora, en los grupos administrados con tunicamicina se observó que los grupos no suplementados con resveratrol presentaron una tendencia a incrementar la concentración lipídica, tanto de colesterol como de triglicéridos ante la administración de tunicamicina.

Lo que resulta consistente con lo que observaron Tovar-Palacio y colaboradores en ratones C57BL/6 administrados con tunicamicina i.p. (1 µg/g pc), en donde observaron que en el grupo en el que se administró tunicamicina 8 h previas a la eutanasia, presentó un incremento en la concentración de triglicéridos en tejido renal; que en el grupo administrado con tunicamicina 24 h previas a la eutanasia se hizo dramático, que se sugirió estar mediada por la activación de CHOP y SREBP-1[16]. Así como el estudio desarrollado por Lhótak y colaboradores, en donde se sugirió que el ratones C57BL/6 administrados con tunicamicina (500 ng/g pc) 24 h previas a la eutanasia, el incremento en el contenido renal de colesterol estuvo mediado por la activación de CHOP y SREBP-2 [170].

A diferencia de los grupos suplementados con resveratrol, en donde el resveratrol presentó en nuestro modelo un efecto renoprotector ante la acumulación de lípidos y no modificó el contenido lipídico en tejido renal, ni en triglicéridos ni en colesterol, incluso ante la administración de tunicamicina. Lo cual correlacionó con los resultados observados en este grupo, tanto en el análisis histológico de la tinción de rojo oleoso como en el análisis morfológico de los marcadores de daño renal y los valores de los parámetros séricos de función renal.

Para proponer un mecanismo molecular para los hallazgos de nuestro modelo acerca del efecto protector del resveratrol en la acumulación de lípidos en tejido renal en los grupos no administrados con tunicamicina, se realizó un **microarreglo** que contenía **genes involucrados en la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR)**.

En los datos obtenidos el resultado más relevante para fines de este proyecto, fue la disminución de la expresión del mRNA de Srebf2 en los dos grupos suplementados con resveratrol, tanto el alimentado con la dieta control como el alimentado con la dieta alta en grasa, respecto al grupo control.

El mRNA de Srebf2 codifica para el precursor del factor de transcripción SREBP-2, que como se mencionó en los antecedentes, es el factor de transcripción maestro que regula la síntesis de colesterol [120].

No se encontró ningún estudio en riñón en donde se observe el efecto del resveratrol en la expresión genética de Srebf2. Sin embargo, a diferencia de lo que observamos en este estudio, Pan y colaboradores determinaron la expresión genética del mRNA de Srebf2 en hígado de ratas Sprague Dawley alimentadas con una dieta alta en grasa (45% Kcal grasa) suplementadas con resveratrol (100 mg/ kg pc/ d), y no observaron cambios significativos por el consumo de resveratrol [136]. Esta inconsistencia pudo deberse, a que la dosis utilizada en ese modelo fue menor a la utilizada en el nuestro o a que esa determinación se realizó en hígado y la de nuestro estudio se realizó en riñón.

El resultado encontrado en la disminución de la expresión del mRNA de Srebf2, tuvo una correlación biológica con los resultados del análisis histológico, donde se observó que el resveratrol disminuyó la acumulación de vacuolas lipídicas en túbulos proximales, el depósito de gotas lipídicas en tejido renal y la disminución del contenido de colesterol en riñón.

Por lo que se llevó a cabo la **determinación de la expresión proteica** tanto de los principales reguladores de la síntesis de lípidos, para correlacionar la expresión funcional de los mismos con el contenido de lípidos en tejido renal; como de los marcadores de estrés del RE, para ver si la expresión de los reguladores de la síntesis de lípidos mostraba asociación con la activación de la UPR; y los marcadores de la ruta de AMPK/SIRT1 para ver si la regulación del resveratrol era dependiente de alguna de estas dos rutas.

Por un lado, GRP78, como se mencionó en la introducción, es una chaperona del RE crítica en el control de calidad de proteínas que controla la activación los tres sensores de la UPR en el estrés del RE [171]. En condiciones de homeostasis, GRP78 se encuentra anclado a los tres sensores transmembranales; mientras que durante el estrés del RE se libera hacia el lumen de RE y se une a las proteínas mal plegadas permitiendo la activación de estas tres proteínas [58].

CHOP, por el otro lado, es un factor de transcripción que se activa río abajo de la activación de la UPR, que ha demostrado actuar como un regulador de la muerte celular programada ante estrés del RE severo o muy prolongado [172].

En nuestros resultados, se observó que los cuatro grupos, con y sin resveratrol, tanto los alimentados con la dieta control como los alimentados con la dieta alta en grasa, presentaron una expresión muy similar de los dos **marcadores de estrés del RE**: GRP78 y CHOP. Este fenómeno podría esperarse con un comportamiento diferente, ya que, asumiendo que la obesidad induce el estrés del RE, se podría suponer que se encontraría elevada la expresión de la chaperona GRP78 o la expresión de CHOP al tratarse de un estrés del RE crónico. Sin embargo, hay dos modelos que explican el comportamiento de este fenómeno.

1. Por un lado, Imrie y Sandler proponen un modelo de regulación de la UPR en el desarrollo de esteatosis hepática, que es muy similar a lo estamos planteando en este estudio acerca de la regulación de la UPR en la lipogénesis renal, en donde plantean a la UPR como un “continuum” que va de la homeostasis a la apoptosis, y que consiste en diversos tipos de UPR. Por ejemplo, la inducción aguda del estrés del RE por medio de fármacos induce la acumulación aguda y severa de proteínas mal plegadas en el RE, que induce la activación de las tres rutas de la UPR y la mayoría de sus genes blanco, sin embargo, representa solo uno de los tipos de UPR. En el caso de la obesidad, la inducción del estrés es persistente, porque se trata de un estímulo crónico y esto resulta en la activación de otro tipo de respuesta de la UPR. Por lo tanto, proponen que los efectos de la activación de la UPR son diferentes entre el estrés del RE agudo y crónico [173].

Imrie y Sandler proponen que la UPR funciona como un medidor de estrés para la ruta de secreción, que no actúa como una entidad sino como un continuo, donde la respuesta que se observa y las proteínas que se expresan dependen de los mediadores y los efectores que varían con la naturaleza y la duración del estrés [173]. Ellos proponen la agrupación de la UPR en 4 subclases de la siguiente forma:

1. Homeostática → Homeostasis → No hay estrés del RE
2. Adaptativa → Se activa con la finalidad de proteger a la célula → Activa ante estrés del RE agudo
3. Estresada → Esta es la que conlleva al desarrollo de esteatosis → Activa en estrés del RE agudo prolongado y al principio del establecimiento del estrés del RE crónico
4. Terminal → Conlleva a la activación de las rutas de apoptosis, o sea muerte celular → Se activa en el estrés del RE crónico activo por un tiempo prolongado.

Se ha demostrado que GRP78 (BIP) se sobreexpresa ante la activación del estrés del RE en el rango adaptativo. Mientras que la inducción de los genes del metabolismo lípidos se presenta durante el rango estresado; y la expresión de las proteínas involucradas con la apoptosis se expresan en el rango terminal [173].

2. Por otro lado, Gomez y Rutkowski estudiaron un modelo que simula de forma experimental la inducción crónica del estrés del retículo endoplásmico, y observaron que ante la exposición aguda o inicial del estrés del RE, las tres rutas de la UPR se activan, así como sus genes blanco, sin embargo, después de un tiempo, la sobreexpresión de GRP78 inicia un fenómeno de retroalimentación negativa de la ruta, que termina en la desactivación de los tres sensores de la UPR, provocando un fenómeno de adaptación en la célula. Y de acuerdo a lo que ellos proponen, este fenómeno es seguramente semejante a la exposición crónica de estrés del RE de bajo nivel que ocurre en la obesidad [174]. Lo cual no quiere decir que no haya estrés del RE en la obesidad, lo hay, pero la UPR se “resetea” como una forma de adaptación ante la exposición crónica de esta condición, y esto provoca que también la expresión de los marcadores de la activación de la UPR vuelvan a su nivel basal.

Estos dos planteamientos pueden sugerir que en los grupos no tratados con tunicamicina en nuestro modelo, el grupo alta en grasa puede encontrarse en la fase de la UPR-“estresada” de acuerdo al modelo que Imrie y Sandler proponen [173], en donde no se observan activos los marcadores de la UPR-adaptativa, como GRP78, ni los marcadores de la UPR-terminal, como CHOP, pero sí los genes implicados en la síntesis de lípidos en el riñón, como en el caso del modelo de esteatosis hepática que ellos plantean en su modelo.

A su vez, también es viable pensar que en nuestro modelo, pudo haber también sucedido el modelo planteado por Gomez y Rutkowski [174], en el que la obesidad de los animales en nuestro modelo indujo un estrés del RE crónico de bajo nivel que se reguló de forma negativa por retroalimentación y reseteó la señalización de la UPR como un mecanismo de adaptación, y por esta situación no se observaron cambios en la expresión ni de GRP78 ni de CHOP.

A diferencia de los resultados mostrados en los grupos administrados con tunicamicina, en donde se presentó que todos los grupos presentaron un incremento en la expresión de GRP78 que fue mayor en el grupo alimentado con la dieta alta en grasa, y menor en el grupo suplementado con resveratrol y alimentado con la dieta alta en grasa.

Lo cual resulta consistente con los resultados observados por Tovar-Palacio y colaboradores, en donde observaron que en ratones C57BL/6 administrados con tunicamicina 8 h previas a la eutanasia, la tunicamicina indujo la expresión de GRP78 al inducir el estrés del RE de forma aguda [16].

Y también con los resultados observados por Kim y colaboradores, en donde se observó en ratones C57BL76 inyectados con tunicamicina y metformina (como activador del AMPK) que la metformina disminuyó la expresión de GRP78 respecto al grupo administrado con tunicamicina [35], que sería similar a lo que se esperaría con el resveratrol como activador del AMPK.

Por lo que la tendencia observada en nuestros resultados resulta consistente con lo descrito en la literatura, en donde se observó que el insulto agudo con tunicamicina exacerbó la activación del estrés del RE en riñón en el grupo alimentado con la dieta alta en grasa; mientras que en el grupo suplementado con resveratrol y alimentado con la dieta alta en grasa, así como en los grupos controles, la tunicamicina activó la UPR pero en forma menos dramática, posiblemente debido al estado metabólico sano de estos grupos, a diferencia del desbalance metabólico previo del grupo alimentado con la dieta alta en grasa.

Por otro lado, en los resultados mostrados en la expresión de CHOP se presentó que todos los grupos presentaron un incremento similar ante la administración de tunicamicina, que no fue tan dramático como el que se observó en la expresión de GRP78.

Posiblemente no se observó ninguna tendencia entre los grupos debido a que CHOP es una proteína proapoptótica que se activa en durante la UPR-terminal, ante condiciones de estrés del RE crónico y severo [58,59]. Es posible que, debido al tiempo en el que se administró la tunicamicina, la condiciones de inducción de estrés del RE fue aguda, y quizá CHOP apenas comenzó a activarse, por lo que es posible que al momento de determinar su expresión aún no hubiera habido una regulación diferencial entre los grupos.

Ahora, en la expresión proteica en riñón de los **reguladores de síntesis de lípidos**, se presentó que los grupos alimentados con la dieta alta en grasa, con y sin resveratrol, presentaron niveles más altos de expresión, tanto en SREBP-1 (p) y SREBP-1 (m), respecto a los grupos alimentados con la dieta control, con y sin resveratrol.

SREBP-1 (p) se refiere al precursor inactivo de este factor de transcripción, y SREBP-1 (m) se refiere a la forma activa y cortada del regulador maestro de síntesis de triglicéridos, fosfolípidos, ácidos grasos saturados y ácidos grasos monoinsaturados [120]. Por lo tanto, se ha descrito que este factor de transcripción regula la expresión de las enzimas: Acetil CoA carboxilasa, ácido graso sintasa, elongasa de ácidos grasos de cadena larga, esterol CoA desaturasa y GPAT [175].

Por lo tanto, los resultados obtenidos en los ratones que no recibieron tunicamicina en nuestro modelo sugieren que la dieta alta en grasa, con y sin resveratrol, indujo la sobreexpresión del precursor inactivo y del factor de transcripción activo de SREBP-1, por lo que la síntesis de lípidos se encontraba incrementada, lo cual en el caso de la dieta alta en grasa no suplementada con resveratrol, correlaciona con el incremento en el contenido de triglicéridos, el depósito de lípidos neutros observado en el rojo oleoso y la presencia de vacuolas lipídicas en los túbulos proximales. A diferencia del grupo alta en grasa con resveratrol, en donde la expresión de SREBP-1, precursor y maduro, se encuentra incrementada de forma similar al grupo no suplementado, sin embargo, el contenido de triglicéridos, los lípidos neutros observados en el rojo oleoso y el porcentaje de vacuolas lipídicas en túbulos proximales, no correlacionan con el incremento en la expresión de este factor de transcripción, cuya expresión sugiere una síntesis de triglicéridos incrementada.

Consistentemente con los resultados que nosotros observamos, Jiang y colaboradores, encontraron que en ratones C57BL/6J alimentados con una dieta alta en grasa (60% Kcal grasa), incrementaron la acumulación de triglicéridos en tejido renal y presentaron glomeruloesclerosis de forma dependiente a la activación de SREBP-1 [167]. Lo que concuerda con lo que nosotros observamos en el grupo alimentado con la dieta alta en grasa.

Así mismo, respecto al grupo suplementado con resveratrol, Zhou y colaboradores, presentaron que en ratones C57BL/6J alimentados con una dieta alta en grasa (40% Kcal grasa) con resveratrol (400 mg/ kg pc/ d), la suplementación no modificó la expresión relativa del mRNA de SREBP-1, aunque no determinaron la expresión proteica, solo a nivel de transcrito [161].

De manera que los resultados obtenidos en este estudio en los grupos no administrados con tunicamicina respecto al efecto del resveratrol sobre la expresión de los reguladores de la síntesis de lípidos resultan consistentes con lo que se ha descrito previamente en estudios similares, y en el caso de los animales alimentados con la dieta alta en grasa no suplementada, correlaciona con el incremento en el contenido de triglicéridos, el depósito de lípidos neutros observado en el rojo oleoso y la presencia de vacuolas lipídicas en túbulos proximales. Mientras que en el caso de los animales alimentados con la dieta alta en grasa suplementada con resveratrol, no correlaciona.

Respecto a los grupos administrados con tunicamicina, se presentó que la administración de tunicamicina no modificó la expresión de SREBP-1 en ninguno de los grupos. Lo cual también correlaciona con que la diferencia entre el contenido de triglicéridos en tejido renal no hubiera sido significativa respecto al grupo no administrado con tunicamicina.

Lo anterior resulta consistente con lo que observaron Tovar-Palacio y colaboradores, en donde se observó que en ratones C57BL/6 administrados con tunicamicina (1 µg/g pc), la tunicamicina no modificó la expresión de SREBP-1 (m) cuando se administró 8 h previas a la eutanasia, pero sí en el grupo administrado 24 h previas a la eutanasia [16]. Lo que podría sugerir que el tiempo con el que se administró la tunicamicina no fue el necesario para incrementar la expresión de este regulador.

Por otra parte, aunque la expresión de SREBP-1(m) no se haya modificado con la administración de tunicamicina, el grupo alimentado con la dieta alta en grasa presentó una expresión incrementada de SREBP-1 (m) y un contenido de triglicéridos elevado respecto a los grupos alimentados con la dieta control por el hecho de haber consumido la dieta alta en grasa.

Sin embargo, al igual que en los grupos no administrados con tunicamicina, la expresión de SREBP-1 (m) en el grupo alimentado con la dieta alta en grasa suplementada con resveratrol administrado con tunicamicina no correlaciona con el contenido de triglicéridos en tejido renal, ya que la expresión incrementada de SREBP-1 (m) sugeriría una lipogénesis incrementada y por lo tanto, mayor contenido de triglicéridos en tejido renal, sin embargo, esto no se observó.

Por otra parte, SREBP-2 (m), como se mencionó en la introducción, se refiere a la forma activa del factor de transcripción maestro de la síntesis de colesterol [176]. Por lo tanto, SREBP-2 (m) regula la transcripción de las enzimas involucradas en la síntesis de colesterol: Acetoacetil CoA tiolasa, HMG CoA sintasa, HMG CoA reductasa, Mevalonato cinasa, fosfomevalonato cinasa, difosfo mevalonato descarboxilasa, geranylgeranyl difosfato sintasa, isopentenil-difosfato isomerasa, farnesil pirofosfato sintasa, escualeno sintasa, escualeno epoxidasa, lanosterol sintasa, cis-prenilo transferasa, lanosterol oxidasa y DHCR [175].

En el caso de la expresión de SREBP-2 (m) en los grupos no administrados con tunicamicina, se presentó que el grupo alimentado con la dieta alta en grasa presentó una tendencia a presentar una mayor expresión respecto al grupo suplementado con resveratrol, que presentó una expresión similar a los grupos controles, con y sin resveratrol. Tendencia que correlaciona con el contenido de colesterol en riñón, el depósito de lípidos neutros observado en el rojo oleoso en tejido renal y la presencia de vacuolas lipídicas en túbulos proximales.

Así mismo, nuestros resultados observados en el grupo alimentado con la dieta alta en grasa fueron consistentes con los mostrados por Jiang y colaboradores, en donde encontraron que los ratones C57BL/6J alimentados con una dieta alta en grasa (60% Kcal grasa), incrementaron la acumulación de colesterol en tejido renal debido al incremento en la expresión de SREBP-2 [167].

Hasta donde sabemos, no hay ningún estudio en donde hayan determinado la modulación de SREBP-2 a partir de consumo de resveratrol, ni en riñón ni en hígado, sin embargo, si hay estudios en hígado o células hepáticas en donde se ha demostrado que diversas moléculas que actúan como activadoras de AMPK inhiben la activación de SREBP-2 y el contenido de colesterol en tejido hepático. Uno de ellos es el estudio de Liu y colaboradores, utilizaron un modelo de células hepáticas L-02 y HepG2 tratadas con AICAR 0.5 mM (compuesto análogo del AMPK, estimulante de la actividad de AMPK) por 12 o 24h, en donde encontraron que la fosforilación de AMPK a partir del tratamiento con AICAR inhibió la expresión de SREBP-2 (m) y la expresión relativa del mRNA de sus genes blanco HMGCR y HMGCS [31]. Así mismo, Tang y colaboradores, utilizaron hepatocitos extraídos de ratones C57BL/6J alimentados con una dieta alta en grasa (60% Kcal grasa) o control, que se trataron con Irisina (una miocina liberada en el ejercicio que induce la activación del AMPK) 10nM por 24h y observaron que la fosforilación de AMPK indujo la inhibición de la expresión proteica del mRNA de SREBP-2, así como la expresión relativa del mRNA de sus genes blanco (HMGCR, HMGCS y LDLR) y el contenido de colesterol intracelular [177]. Y también Li y colaboradores observaron en un modelo a ratones C57BL/6J LDLR -/- alimentados con una dieta alta en grasa y alta en sacarosa suplementados con un polifenol S17834 (130 mg/kg pc/ d) (estimulador de la activación de AMPK), en donde observaron que la suplementación con S17834 estimuló la fosforilación de AMPK y esto inhibió el procesamiento proteolítico tanto de SREBP-1 como de SREBP-2, y por lo tanto redujo la expresión de sus blancos FAS y HMGCR y el contenido de lípidos hepáticos [30].

Por lo tanto, nosotros proponemos en este estudio, que en los grupos no administrados con tunicamicina, la suplementación con resveratrol en una dieta alta en grasa redujo la expresión de SREBP-2 a nivel de expresión proteica y de mRNA (como se observó en el microarreglo), y por lo tanto redujo el contenido de colesterol a nivel renal, lo cual correlacionó también con la disminución en el porcentaje de vacuolas lipídicas, el depósito de lípidos neutros observado en la tinción de rojo oleoso, la celularidad normal en glomérulo,

la disminución en los valores de creatinina y la disminución en la ganancia de peso corporal.

Por otro lado, en los grupos administrados con tunicamicina se presentó que los grupos alimentados con la dieta control, con y sin resveratrol, así como el grupo alimentado con la dieta alta en grasa, presentaron un ligero incremento en la expresión de SREBP-2 (m) ante la administración de tunicamicina, mientras que el grupo suplementado con resveratrol y alimentado con la dieta alta en grasa no presentó ninguna modificación en la expresión, además de haber mostrado un contenido de colesterol significativamente menor respecto al grupo alimentado con la dieta control y administrado con tunicamicina.

Lhótak y colaboradores presentaron que en ratones C57BL/6 tratados con tunicamicina 24 h previas a la eutanasia, la expresión de SREBP-2 (m) incrementó de forma significativa en riñón [170]. Lo que podría sugerir, que al igual que en el caso de SREBP-1 (m), no se observó un incremento significativo debido a que el tiempo con el que se administró la tunicamicina en nuestro modelo no fue el necesario para observar este cambio.

Finalmente, para concretar la descripción del mecanismo molecular implicado en el efecto de la suplementación con resveratrol en la acumulación de lípidos en tejido renal, se determinó la expresión de los **marcadores de la vía de AMPK/SIRT1** asociadas con el consumo de resveratrol: AMPK, p-AMPK y PGC1- $\alpha$ .

El resveratrol tiene como mecanismo de acción la activación de dos principales sensores metabólicos: AMPK y SIRT1 [28].

La SIRT1 es una desacetilasa que actúa de acuerdo al estado metabólico de la célula y se activa por la elevación de la concentración de NAD<sup>+</sup> [29], y uno de los blancos metabólicos de SIRT1 es la desacetilación de PGC1- $\alpha$  [28].

Por otro lado, el AMPK es un sensor energético que se activa por la relación de AMP/ATP, por lo que también releja el estado metabólico de la célula; disminuye la velocidad de las rutas que consumen energía, como la síntesis de lípidos y de proteínas, y activa las rutas que producen energía, como la oxidación de lípidos y la glucólisis [178].

En nuestro modelo experimental se observó que los grupos no tratados con tunicamicina suplementados con resveratrol, tanto con la dieta alta en grasa como con la dieta control, presentaron una tendencia a incrementar la expresión de p-AMPK/AMPK total respecto a los grupos no suplementados.

Consistentemente con lo que nosotros encontramos, Zhou y colaboradores describieron que en un modelo de ratones C57BL/6J alimentados con una dieta alta en grasa (60% Kcal. grasa) suplementado con resveratrol (400 mg/ kg pc/ d) hubo un incremento en la expresión relativa de p-AMPK/AMPK en riñón respecto al grupo alta en grasa no suplementado, y propusieron que la activación de AMPK por el resveratrol promovió el balance entre lipólisis y lipogénesis a través de la activación de la ruta secundaria de PPAR- $\alpha$ , lo cual previno la lipotoxicidad renal [161], aunque su modelo no incluía un grupo control suplementado con resveratrol para comparar con el nuestro.

Nuestros resultados sugieren que los grupos no tratados con tunicamicina suplementados con resveratrol activaron al AMPK, cuyo incremento correlaciona con la disminución en la expresión de SREBP-2, por lo que sugerimos que la activación de AMPK inhibió la

activación del regulador de síntesis de lípidos SREBP-2.

Así mismo, en los grupos administrados con tunicamicina, se presentó que los grupos tratados con resveratrol presentaron una tendencia a activar al AMPK, a diferencia del grupo alimentado con la dieta alta en grasa que disminuyó su activación, y del grupo control que no presentó ninguna modificación respecto al grupo no tratado con tunicamicina.

Tovar-Palacio y colaboradores observaron que la administración de tunicamicina 8h previas a la eutanasia en ratones C57BL/6 no modificó la activación de AMPK [16]. De forma similar a lo que se observó en el grupo control.

Por otro lado, Declèves y colaboradores observaron que el consumo de una dieta alta en grasa (60% Kcal grasa) en ratones C57BL/6 disminuye la fosforilación de AMPK, y que esta disminución tuvo que ver con el inicio del daño renal asociado a este modelo de obesidad [179]. Por lo que se podría sugerir que el insulto con tunicamicina exacerbó las alteraciones metabólicas renales en el grupo alta en grasa, lo que podría estar relacionado con la disminución de la expresión de p-AMPK.

Mientras que en los grupos suplementados con resveratrol, el resveratrol incluso potenció la activación de AMPK, posiblemente como un efecto renoprotector para prevenir el daño renal ante el insulto con tunicamicina.

Ahora, como en nuestro modelo la suplementación con resveratrol en el grupo alimentado con la dieta alta en grasa no modificó la expresión de SREBP-1 (m), ni el grupo administrado con tunicamicina ni en el grupo no administrado, se determinó la expresión de PGC1- $\alpha$ , que es un coactivador transcripcional activado por la SIRT1 que promueve la biogénesis mitocondrial y la expresión de las enzimas involucradas en la oxidación de lípidos [180], para determinar si el resveratrol disminuyó en el contenido de triglicéridos a partir de la oxidación de los mismos, dado que no presentó diferencias en el regulador de síntesis.

En nuestros resultados se observó que, entre los grupos no administrados con tunicamicina, el grupo control suplementado con resveratrol presentó una tendencia a incrementar la expresión de PGC1- $\alpha$  respecto al grupo no suplementado, y el grupo suplementado con resveratrol y alimentado con la dieta alta en grasa presentó un incremento significativo respecto al grupo no suplementado.

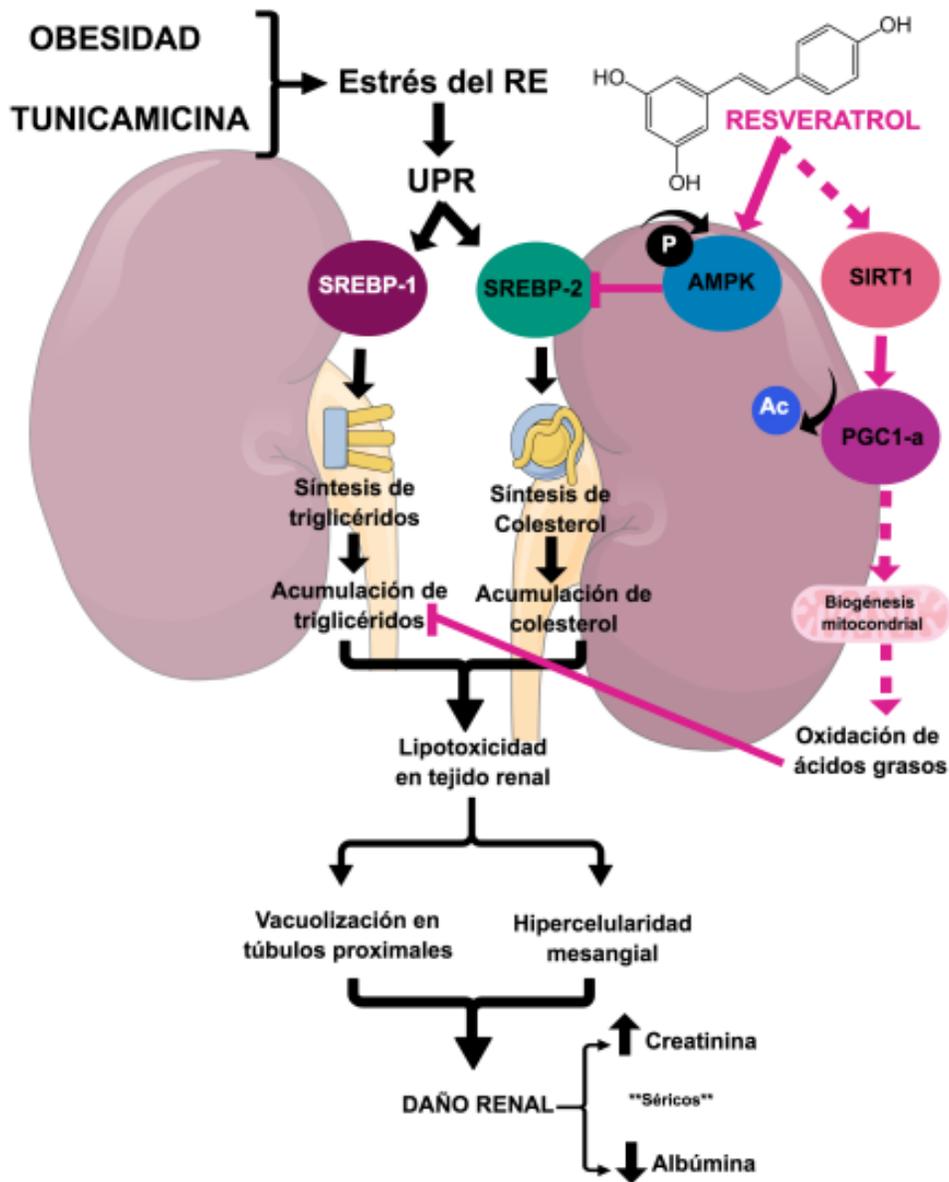
Hasta donde sabemos, nadie ha descrito la activación de PGC1- $\alpha$  en riñón a partir de la suplementación con resveratrol. Pero, Alberdi y colaboradores observaron que en ratas Sprague Dawley alimentadas con una dieta obesogénica (4.6 Kcal/g) y resveratrol (30 mg/kg pc/d), la suplementación indujo un incremento significativo en la desacetilación de PGC1- $\alpha$ , y por lo tanto en su activación, en hígado. Y sugieren que este mecanismo sucedió a partir de la desacetilación dirigida por la SIRT1. Así mismo, observaron que la suplementación con resveratrol indujo la fosforilación de AMPK, y proponen que la activación de AMPK/SIRT1 y PGC1- $\alpha$  previno la acumulación de lípidos en el hígado, por promover la oxidación de ácidos grasos [84].

Nosotros observamos que en nuestro modelo de estudio, el grupo suplementado con resveratrol alimentado con la dieta alta en grasa, no modificó la expresión de SREBP-1 (m), por lo que se esperaba que no hubiera modificado la síntesis de lípidos. Sin embargo, también observamos que disminuyó el contenido de triglicéridos en tejido renal respecto al grupo no suplementado, lo que sugiere que, al menos en parte, se debe a la activación de PGC1- $\alpha$ , que promueve la oxidación de ácidos grasos.

Por otro lado, en los grupos administrados con tunicamicina se observó la misma tendencia que en los grupos no administrados, aunque en el caso de los grupos con tunicamicina, los dos grupos suplementados con resveratrol presentaron un incremento significativo respecto a los grupos no suplementados. Lo cual sugiere que ambos grupos suplementados con resveratrol posiblemente presenten una mayor biogénesis mitocondrial y oxidación lipídica.

Este comportamiento correlacionó con que el grupo alta en grasa suplementado con resveratrol no hubiera mostrado una disminución en la expresión del regulador de la síntesis de triglicéridos, pero sí un contenido menor de triglicéridos en tejido renal, al igual que un porcentaje menor de vacuolización lipídica en túbulos proximales y un menor depósito de lípidos neutros en la tinción de rojo oleoso.

## ANÁLISIS INTEGRATIVO A MANERA DE RESUMEN

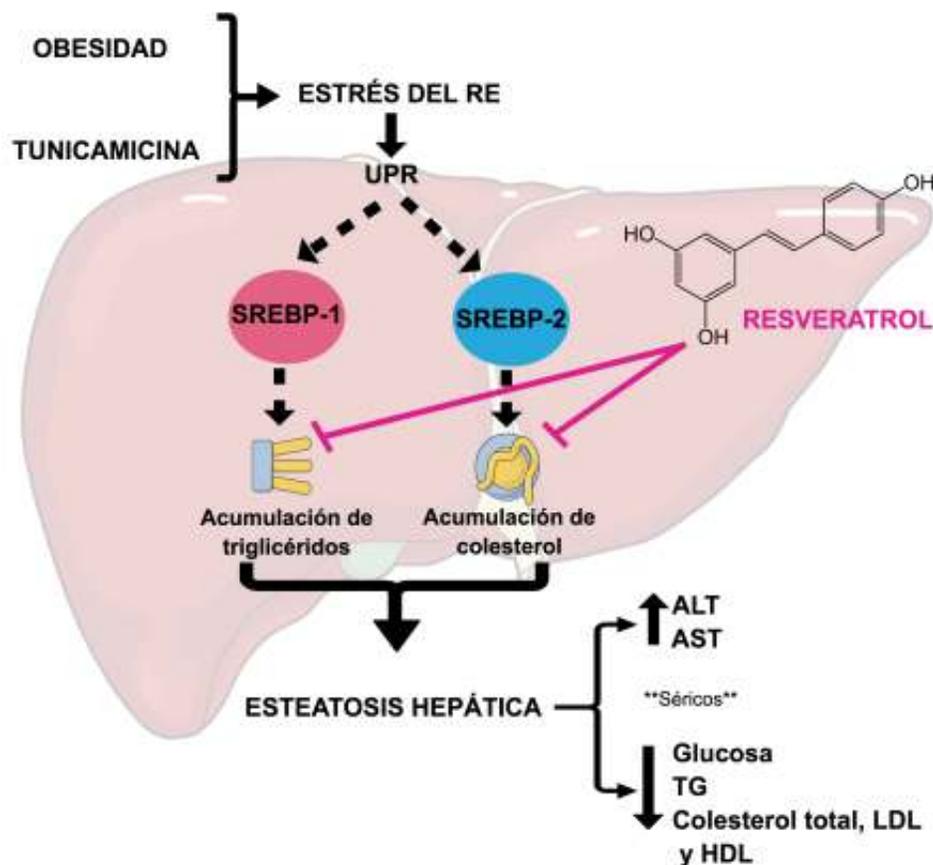


**FIGURA 24.** Esquema a manera de resumen de los hallazgos encontrados acerca del efecto del resveratrol en el metabolismo renal.

Como se muestra en la **FIGURA 24**, en este estudio hemos demostrado que, en ratones C57BL/6, la obesidad indujo el estrés del RE de forma fisiológica-crónica y que la tunicamicina indujo el estrés del RE de forma aguda-farmacológica en el riñón. En ambas condiciones, el estrés del RE provocó la activación de la UPR en diferentes grados, dependiendo del estímulo del que se trató. Una de las consecuencias de la activación de la UPR fue el incremento en la expresión de genes y proteínas asociadas con la síntesis de lípidos, como los reguladores maestros de la síntesis de triglicéridos y de colesterol: SREBP-1 y SREBP-2, lo que provocó la acumulación de lípidos ectópicos en el tejido renal, fenómeno conocido como lipogénesis renal. Esta acumulación de lípidos en el riñón tiene como consecuencia la lipotoxicidad de las células renales, que se vio reflejada en la aparición de vacuolas lipídicas en los túbulos proximales y el desarrollo de hipercelularidad

mesangial en los glomérulos, que son dos de los principales marcadores de daño renal, el cual provocó el incremento en la concentración de creatinina sérica y la disminución de albúmina sérica que también se observaron en estos animales.

Así mismo, en estudio demostramos que la suplementación con resveratrol a una dosis de 200 mg/kg pc/ d, tanto en los animales que presentaron obesidad como los animales tratados con tunicamicina, activó al sensor energético AMPK en el riñón, a partir de su fosforilación, lo cual disminuyó la expresión del regulador de la síntesis de colesterol SREBP-2. Por otro lado, la suplementación con resveratrol también indujo la expresión y activación de PGC1- $\alpha$ , un factor de transcripción maestro de la oxidación de ácidos grasos, lo que disminuyó la acumulación de triglicéridos en el riñón. Por lo que demostramos que el consumo de resveratrol en ratones C57BL/6 disminuyó la acumulación tanto de triglicéridos como de colesterol en el riñón, y por lo tanto el daño renal, lo cual se vio reflejado en una menor vacuolización lipídica en túbulos proximales y un menor desarrollo de hiper celularidad mesangial, así como niveles normales de concentración de creatinina y albúmina sérica.

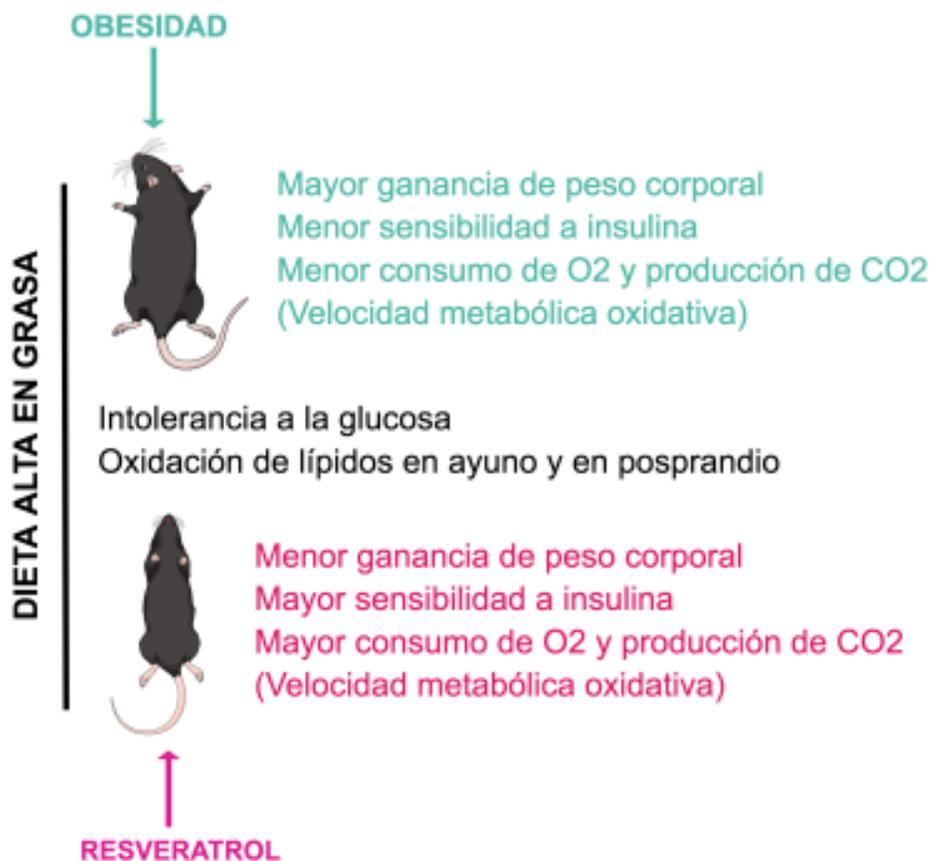


**FIGURA 25.** Esquema a manera de resumen de los hallazgos encontrados acerca del efecto del resveratrol en el metabolismo hepático

Como se muestra en la **FIGURA 25**, de manera similar a lo que se observó en el riñón, tanto en un modelo de obesidad inducida por dieta como en un modelo de inducción farmacológica de estrés del RE por medio de Tunicamicina, los ratones C57BL/6 tratados en este proyecto desarrollaron una mayor acumulación de lípidos en el hígado, tanto de triglicéridos como de colesterol, sugiriendo un modelo de esteatosis hepática, que se vió

reflejado en un incremento en la concentración de enzimas transaminasas ALT y AST, y que también correlacionó con la disminución de la concentración de glucosa, triglicéridos, colesterol (total, LDL y HDL) a consecuencia del daño hepático. Los resultados observados en el riñón, sugirieron que, aunque no se midió de forma directa, es posible que el incremento en la concentración lipídica en el hígado se haya debido al incremento en la expresión de los reguladores maestros de la síntesis de triglicéridos (SREBP-1) y de colesterol (SREBP-2), como consecuencia de la activación de la UPR por la inducción del estrés del RE, tanto de forma fisiológica-crónica en la obesidad como de forma farmacológica en el modelo de Tunicamicina.

Así mismo, de forma similar a los resultados que se observaron en el riñón, en los animales suplementados con resveratrol no se observó el incremento en la acumulación, tanto de triglicéridos como de colesterol, en el tejido hepático, lo cual sugirió que el resveratrol presentó un mecanismo similar al del riñón posiblemente a través de la activación del sensor energético AMPK y el factor de transcripción PGC1- $\alpha$ , aunque no se midió de forma directa. Lo cual resultó consistente con lo reportado en la literatura por diversos autores.



**FIGURA 26.** Diagrama a manera de resumen de los hallazgos encontrados acerca del efecto del resveratrol en una dieta alta en grasa a nivel sistémico

En la **FIGURA 26** se muestran los efectos metabólicos observados durante este proyecto en los ratones C57BL/6 que tuvieron un modelo de inducción a obesidad, en los que se observó

una mayor ganancia de peso, una menor sensibilidad a insulina y una velocidad metabólica oxidativa menor. Así como intolerancia a la glucosa e inflexibilidad metabólica.

Mientras que, en el caso de los ratones que tuvieron un modelo de inducción a obesidad pero fueron suplementados con resveratrol, presentaron una menor ganancia de peso corporal, una mayor sensibilidad a la insulina y una velocidad metabólica oxidativa mayor. Sin embargo, al igual que los ratones obesos no suplementados con resveratrol, presentaron intolerancia a la glucosa e inflexibilidad metabólica.

## 10. RESUMEN DE RESULTADOS

- El resveratrol suplementado a una dosis de 200 mg/kg pc/d redujo significativamente el incremento de peso corporal en ratones C57BL/6 alimentados con una dieta control y una dieta alta en grasa respecto a los grupos no suplementados con resveratrol.
- El resveratrol suplementado en una dosis de 200 mg/kg pc/d d en ratones C57BL/6 no indujo cambios ni en el valor del coeficiente respiratorio (RER) ni en la proporción de sustratos oxidados respecto a los grupos no suplementados con resveratrol, tanto en los animales alimentados con una dieta control como con una dieta alta en grasa, respecto a los animales no suplementados con resveratrol; sin embargo, incrementó de forma significativa el volumen de oxígeno consumido en ambas dietas suplementadas con resveratrol respecto a los no suplementados con resveratrol.
- El resveratrol suplementado en una dosis de 200 mg/kg pc/d d en ratones C57BL/6 no indujo ningún efecto en la prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal, tanto en los animales alimentados con una dieta control como con una dieta alta en grasa, respecto a los animales no suplementados con resveratrol.
- El resveratrol suplementado en una dosis de 200 mg/kg pc/d presentó una tendencia a reducir la concentración de glucosa en suero en ratones C57BL/6 alimentados con una dieta control y una dieta alta en grasa, sin embargo no presentó diferencia significativa; así mismo, mantuvo la concentración de glucosa dentro del rango normal ante la inducción farmacológica de estrés de retículo endoplásmico y no presentó diferencia significativa respecto a los grupos suplementados con resveratrol sin tunicamicina.
- El resveratrol suplementado en una dosis de 200 mg/kg pc/d redujo la concentración de colesterol total y LDL en ratones C57BL/6 alimentados con una dieta alta en grasa de forma significativa respecto al grupo no suplementado con resveratrol; así mismo, mantuvo la concentración de colesterol total y LDL dentro del rango normal ante la inducción farmacológica de estrés de retículo endoplásmico en las dietas suplementadas con resveratrol, tanto control como alta en grasa, sin presentar diferencia significativa respecto a los grupos suplementados con resveratrol sin tunicamicina.
- El resveratrol suplementado en una dosis de 200 mg/kg pc/d no presentó diferencia significativa en la concentración de colesterol HDL en ratones C57BL/6 suplementados alimentados con una dieta control y una dieta alta en grasa; y mantuvo la concentración de colesterol HDL en valores normales ante la inducción del estrés de retículo endoplásmico, sin presentar diferencia significativa respecto a los grupos suplementados con resveratrol sin tunicamicina en ambas dietas suplementadas.
- El resveratrol suplementado en una dosis de 200 mg/kg pc/d no redujo la concentración de triglicéridos de forma significativa en ratones C57BL/6 suplementados alimentados con una dieta control y una dieta alta en grasa; así mismo, mantuvo la concentración de triglicéridos en el rango normal en ambas dietas suplementadas a diferencia de las no suplementadas ante la inducción farmacológica de estrés de retículo endoplásmico, y ambos grupos presentaron un incremento significativo respecto a los grupos suplementados con Resveratrol sin tunicamicina.

- El resveratrol suplementado en una dosis de 200 mg/kg pc/d presentó una tendencia a mejorar el perfil hepático (transaminasas ALT y AST) y no presentó hepatotoxicidad en ratones C57BL/6 alimentados con una dieta control y una dieta alta en grasa, a pesar de no mostrar diferencia significativa; y mantuvo los valores de dichos parámetros en valores dentro del rango normal (AST) o cercanos al rango normal (ALT) ante la inducción farmacológica del estrés del retículo endoplásmico sin presentar diferencia significativa respecto a los grupos sin tunicamicina.
- El resveratrol suplementado en una dosis de 200 mg/kg pc/d presentó una tendencia a disminuir la concentración de creatinina en suero y aumentar la concentración de albúmina en suero hasta el rango normal de valores en ratones C57BL/6 alimentados con una dieta alta en grasa aunque no presentó diferencia significativa; y mantuvo la concentración de dichos parámetros en valores normales ante la inducción farmacológica de estrés de retículo endoplásmico en ambas dietas suplementadas con resveratrol aunque ningún grupo presentó diferencia significativa.
- Tanto el grupo alta en grasa como el grupo alta en grasa suplementado con resveratrol en una dosis de 200 mg/kg pc/d presentaron hiperinsulinemia; sin embargo, el resveratrol disminuyó de forma significativa la concentración de insulina sérica respecto al grupo no suplementado, incluso ante la administración de tunicamicina en ratones C57BL/6.
- La suplementación con resveratrol (200 mg/kg pc/d) en ratones C57BL/6 alimentados con una dieta alta en grasa incrementó de forma significativa el porcentaje de adiponectina de alto peso molecular (HMW)/adiponectina total respecto al grupo alimentado con la dieta control, control suplementada con resveratrol y alta en grasa, incluso ante la administración de tunicamicina.
- La suplementación con resveratrol (200 mg/kg pc/d) en ratones C57BL/6 alimentados con una dieta alta en grasa presentó una tendencia a disminuir la concentración de leptina respecto al grupo no suplementado, que se hizo significativa ante la administración con tunicamicina; sin embargo, no presentó diferencia significativa respecto al grupo alimentado con la dieta control.
- La suplementación con resveratrol (200 mg/kg pc/d) en ratones C57BL/6 alimentados con una dieta alta en grasa disminuyó significativamente la celularidad mesangial y el porcentaje de vacuolización lipídica en los túbulos proximales de riñón respecto al grupo no suplementado, mientras que no presentó diferencia significativa respecto al grupo control. Y presentó el mismo comportamiento incluso ante el tratamiento con tunicamicina.
- La suplementación con resveratrol (200 mg/kg pc/d) en ratones C57BL/6 alimentados con una dieta alta en grasa disminuyó la acumulación ectópica de depósitos lipídicos neutros en tejido renal, tanto en túbulos proximales como en glomérulos, respecto al grupo alimentado con la dieta alta en grasa no suplementado incluso ante la administración de tunicamicina, y presentó un comportamiento similar al del grupo alimentado con la dieta control.

- La suplementación con resveratrol (200 mg/kg pc/d) en ratones C57BL/6 alimentados con una dieta alta en grasa disminuyó de forma significativa el contenido de triglicéridos y de colesterol respecto al grupo alimentado con la dieta alta en grasa no suplementado, incluso ante la inducción aguda del estrés del RE por tunicamicina, y no presentó diferencia significativa en ambos casos respecto a los grupos alimentados con la dieta control, con y sin resveratrol.
- La suplementación con resveratrol (200 mg/kg pc/d) disminuyó de forma significativa la expresión del mRNA de Srebf2 en ratones C57BL/6 alimentados con una dieta control y con una dieta alta en grasa.
- La suplementación con resveratrol (200 mg/kg pc/d) en ratones C57BL/6 no modificó la expresión de GRP78 ni en el grupo alimentado con la dieta control ni en el grupo alimentado con la dieta alta en grasa. Sin embargo, ante la administración de tunicamicina, el grupo suplementado alimentado con la dieta alta en grasa disminuyó de forma significativa la expresión de GRP78 respecto al grupo no suplementado alimentado con la dieta alta en grasa.
- La suplementación con resveratrol (200 mg/kg pc/d) en ratones C57BL/6 no modificó la expresión de CHOP ni en el grupo alimentado con la dieta control ni en el grupo alimentado con la dieta alta en grasa, y tampoco presentó ninguna diferencia ante el tratamiento con tunicamicina.
- La suplementación con resveratrol (200 mg/kg pc/d) en ratones C57BL/6 alimentados con una dieta alta en grasa, no modificó la expresión de SREBP-1 (p) y SREBP-1 (m) respecto al grupo no suplementado; sin embargo, si presentó un incremento significativo respecto a los grupos alimentados con la dieta control, con y sin la suplementación con resveratrol. Se observó el mismo comportamiento con el tratamiento de tunicamicina.
- La suplementación con resveratrol (200 mg/kg pc/d) en ratones C57BL/6 alimentados con una dieta alta en grasa, presentó una tendencia a disminuir la expresión de SREBP-2 (m) respecto al grupo alimentado con la dieta alta en grasa no suplementado aunque no fue significativa. La misma tendencia se observó ante la administración con tunicamicina.
- La suplementación con resveratrol (200 mg/kg pc/d) en ratones C57BL/6 presentó una tendencia a incrementar la expresión relativa de p-AMPK/AMPK total, tanto en los animales alimentados con la dieta control como en los animales alimentados con la dieta alta en grasa, aunque no fue significativa. Sin embargo, ante el tratamiento con tunicamicina, el incremento en la expresión relativa de p-AMPK/AMPK total por la suplementación con resveratrol, tanto en la dieta control como en la dieta alta en grasa, si fue significativo respecto al grupo alimentado con la dieta alta en grasa no suplementado.
- La suplementación con resveratrol (200 mg/kg pc/d) incrementó de forma significativa la expresión de PGC1- $\alpha$  en ratones C57BL/6 alimentados con una dieta control y con una dieta alta en grasa, incluso ante la administración con tunicamicina.

## **11. CONCLUSIÓN**

La suplementación con resveratrol a una dosis de 200 mg/kg pc/d en un modelo de ratones C57BL/6 alimentados con una dieta alta en grasa (45% Kcal. grasa saturada), atenuó el estrés del RE, tanto fisiológico.crónico como farmacológico, y como consecuencia, disminuyó la acumulación de lípidos ectópicos en el riñón, es decir, la lipogénesis renal.

## 12. LITERATURA CITADA

- [1] J. Gambini, R. López-Grueso, G. Olaso-González, M. Inglés, K. Abdelazid, M. El Alami, et al., Resveratrol: Distribución, propiedades y perspectivas, *Rev. Esp. Geriatr. Gerontol.* 48 (2013) 79–88. doi:10.1016/j.regg.2012.04.007.
- [2] World Health Organization, Obesity and overweight, *Obes. Overweight.* (2016). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> (accessed January 3, 2017).
- [3] C. Arroyo-johnson, K.D. Mincey, *Obesity Epidemiology and World Wide, Gastroenterol. Clin. NA.* 45 (2016) 571–579. doi:10.1016/j.gtc.2016.07.012.
- [4] M. Tremmel, U.-G. Gerdtham, P.M. Nilsson, S. Saha, Economic Burden of Obesity: A Systematic Literature Review., *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 14 (2017) 435. doi:10.3390/ijerph14040435.
- [5] E. Morales Ruiz, M. Praga Terente, Relación entre obesidad y desarrollo de insuficiencia renal, *Hipertensión.* 25 (2008) 61–69. doi:10.1016/S0212-8241(08)70873-9.
- [6] M.C. Foster, S.-J. Hwang, S.A. Porter, J.M. Massaro, U. Hoffmann, C.S. Fox, Fatty kidney, hypertension, and chronic kidney disease: the Framingham Heart Study., *Hypertension.* 58 (2011) 784–90. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.175315.
- [7] M. Praga, E. Morales, The Fatty Kidney: Obesity and Renal Disease, *Nephron.* (2016). doi:10.1159/000447674.
- [8] I.A. Bobulescu, Renal lipid metabolism and lipotoxicity, *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 19 (2010) 393–402. doi:10.1097/MNH.0b013e32833aa4ac.
- [9] C. Martinez-Garcia, a Izquierdo, V. Velagapudi, Y. Vivas, I. Velasco, M. Campbell, et al., Accelerated renal disease is associated with the development of metabolic syndrome in a glucolipotoxic mouse model, *Dis Model Mech.* 5 (2012) 636–648. doi:10.1242/dmm.009266 [pii].
- [10] C.K. Abrass, Overview: obesity: what does it have to do with kidney disease?, *J. Am. Soc. Nephrol.* 15 (2004) 2768–2772. doi:10.1097/01.ASN.0000141963.04540.3E.
- [11] J. a Joles, U. Kunter, U. Janssen, W. Kriz, T.J. Rabelink, H. a Koomans, et al., Early mechanisms of renal injury in hypercholesterolemic or hypertriglyceridemic rats., *J. Am. Soc. Nephrol.* 11 (2000) 669–683.
- [12] A. Izquierdo-Lahuerta, C. Mart??nez-Garc??a, G. Medina-G??mez, Lipotoxicity as a trigger factor of renal disease, *J. Nephrol.* 29 (2016) 603–610. doi:10.1007/s40620-016-0278-5.
- [13] E. Galgani, Expansibilidad del tejido adiposo en la homeostasis metabólica, 7 (2014) 14–16.
- [14] F. Guebre-Egziabher, P.M. Alix, L. Koppe, C.C. Pelletier, E. Kalbacher, D. Fouque, et al., Ectopic lipid accumulation: A potential cause for metabolic disturbances and a contributor to the alteration of kidney function, *Biochimie.* 95 (2013) 1971–1979. doi:10.1016/j.biochi.2013.07.017.
- [15] G. Proctor, T. Jiang, M. Iwahashi, Z. Wang, J. Li, M. Levi, Regulation of renal fatty acid and cholesterol metabolism, inflammation, and fibrosis in Akita and OVE26 mice with type 1 diabetes, *Diabetes.* 55 (2006) 2502–2509. doi:10.2337/db05-0603.
- [16] C. Tovar-Palacio, I. Torre-Villalvazo, G. Alemán, E. Figueroa-Juárez, N. Torres, A. Tovar, et al., Unfolded protein response on renal lipogenesis in C57BL/6 mice (1029.2), *FASEB J.* . 28 (2014). [http://www.fasebj.org/content/28/1\\_Supplement/1029.2.abstract](http://www.fasebj.org/content/28/1_Supplement/1029.2.abstract).
- [17] G.S. Hotamisligil, Endoplasmic Reticulum Stress and the Inflammatory Basis of Metabolic Disease, *Cell.* 140 (2010) 900–917. doi:10.1016/j.cell.2010.02.034.
- [18] M. Schröder, R.J. Kaufman, ER stress and the unfolded protein response, *Mutat. Res.* 569 (2005) 29–63. doi:10.1016/j.mrfmmm.2004.06.056.

- [19] R. Bravo, V. Parra, D. Gatica, A.E. Rodriguez, N. Torrealba, F. Paredes, et al., Endoplasmic Reticulum and the Unfolded Protein Response, 2013. doi:10.1016/B978-0-12-407704-1.00005-1.Endoplasmic.
- [20] R. Cunard, K. Sharma, The endoplasmic reticulum stress response and diabetic kidney disease, *Am J Physiol-Renal.* 300 (2011) 1054–1061. doi:10.1152/ajprenal.00021.2011.
- [21] C. Hetz, The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond, *Nat. Publ. Gr.* 13 (2012) 89–102. doi:10.1038/nrm3270.
- [22] T.W. Jung, K.M. Choi, Pharmacological modulators of endoplasmic reticulum stress in metabolic diseases, *Int. J. Mol. Sci.* 17 (2016). doi:10.3390/ijms17020192.
- [23] B.C.I.C.S.H. (NY): C.S.H.L.P. 2009. C. 50. A. from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1938>. Esko JD, Chemical Tools for Inhibiting Glycosylation., in: *Essentials Glycobiol.*, 2nd editio, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 2009. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1938/>.
- [24] S.M. Colgan, A. Hashimi, R.C. Austin, Endoplasmic reticulum stress and lipid dysregulation., *Expert Rev. Mol. Med.* 13 (2011) e4. doi:10.1017/S1462399410001742.
- [25] S. Basseri, R.C. Austin, Endoplasmic reticulum stress and lipid metabolism: mechanisms and therapeutic potential., *Biochem. Res. Int.* 2012 (2012) 841362. doi:10.1155/2012/841362.
- [26] N.L. Price, A.P. Gomes, A.J.Y. Ling, F. V Duarte, A. Martin-montalvo, B.J. North, et al., Article SIRT1 Is Required for AMPK Activation and the Beneficial Effects of Resveratrol on Mitochondrial Function, *Cell Metab.* 15 (2012) 675–690. doi:10.1016/j.cmet.2012.04.003.
- [27] S.S. Kulkarni, C. Cantó, The molecular targets of resveratrol, *Biochim. Biophys. Acta.* (2014). doi:10.1016/j.bbadis.2014.10.005.
- [28] C. Cantó, J. Auwerx, PGC-1alpha, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure., *Curr. Opin. Lipidol.* 20 (2009) 98–105. doi:10.1097/MOL.0b013e328328d0a4.
- [29] M. Boutant, C. Cantó, SIRT1 metabolic actions: Integrating recent advances from mouse models, *Mol. Metab.* 3 (2014) 5–18. doi:10.1016/j.molmet.2013.10.006.
- [30] Y. Li, S. Xu, M. Mihaylova, B. Zheng, X. Hou, B. Jiang, et al., AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in Diet-induced Insulin Resistant Mice, *Cell Metab.* 13 (2011) 376–388. doi:10.1016/j.cmet.2011.03.009.AMPK.
- [31] S. Liu, F. Jing, C. Yu, L. Gao, Y. Qin, J. Zhao, AICAR-induced activation of AMPK inhibits TSH/SREBP-2/HMGCR pathway in liver, *PLoS One.* 10 (2015). doi:10.1371/journal.pone.0124951.
- [32] S.R. Woo, J.E. Park, Y.H. Kim, Y.J. Ju, H.J. Shin, H.Y. Joo, et al., SIRT1 suppresses activating transcription factor 4 (ATF4) expression in response to proteasome inhibition, *J. Microbiol. Biotechnol.* 23 (2013) 1785–1790. doi:10.4014/jmb.1309.09027.
- [33] J.W. Chang, H. Kim, C.H. Baek, R.B. Lee, W.S. Yang, S.K. Lee, Up-Regulation of SIRT1 Reduces Endoplasmic Reticulum Stress and Renal Fibrosis, *Nephron.* 133 (2016) 116–128. doi:10.1159/000447067.
- [34] Q. Duan, P. Song, Y. Ding, M.-H. Zou, Activation of AMP-activated Protein Kinase By Metformin Ablates Angiotensin II-Induced Endoplasmic Reticulum Stress and Hypertension in Mice *in vivo*, *Br. J. Pharmacol.* (2017) 404–413. doi:10.1111/bph.13833.
- [35] H. Kim, S.Y. Moon, J.-S. Kim, C.H. Baek, M. Kim, J.Y. Min, et al., Activation of AMP-activated protein kinase inhibits ER stress and renal fibrosis., *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* (2014) ajprenal.00495.2014. doi:10.1152/ajprenal.00495.2014.

- [36] Organisation for Economic Co-operation and Development, OBESITY Update, (2014).
- [37] E. Berenice, G. Pineda, I.M. Gómez-humarán, T.S. Levy, Informe final de resultados ENSANUT 2016, 2016 (2016).
- [38] C.M. López De Fez, M.T. Gaztelu, T. Rubio, A. Castaño, Mecanismos de hipertensión en obesidad, *An. Sist. Sanit. Navar.* 27 (2004) 211–219. doi:10.4321/S1137-66272004000300006.
- [39] J.E. Hall, A.C. Guyton, Guyton and Hall textbook of medical physiology, 2011.
- [40] E.L.B. Walter F. Boron, Medical Physiology, 3th ed., Elsevier Health Sciences, 2008, 2016.
- [41] T. Shafi, J. Coresh, Chapter 1 - Chronic Kidney Disease: Definition, Epidemiology, Cost, and Outcomes, in: J.H.H.B.T.-C.K.D. Sayegh Dialysis, and Transplantation (Third edition) (Ed.), W.B. Saunders, Philadelphia, 2010: pp. 3–21. doi:http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-4377-0987-2.00001-7.
- [42] S. Snyder, G.A. Turner, A. Turner, Obesity-related kidney disease., *Prim. Care.* 41 (2014) 875–93. doi:10.1016/j.pop.2014.08.008.
- [43] V. Soetikno, F.R. Sari, V. Sukumaran, A. Prasath, M. Harima, K. Suzuki, et al., Curcumin decreases renal triglyceride accumulation through AMPK – SREBP signaling pathway in streptozotocin-induced type 1 diabetic rats ☆, *J. Nutr. Biochem.* 24 (2013) 796–802. doi:10.1016/j.jnutbio.2012.04.013.
- [44] J. Garbarino, S.L. Sturley, Saturated with fat: new perspectives on lipotoxicity., *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 12 (2009) 110–116. doi:10.1097/MCO.0b013e32832182ee.
- [45] A.P.J. de Vries, P. Ruggenenti, X.Z. Ruan, M. Praga, J.M. Cruzado, I.M. Bajema, et al., Fatty kidney: emerging role of ectopic lipid in obesity-related renal disease, *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2 (2014) 417–426. doi:10.1016/S2213-8587(14)70065-8.
- [46] L. Sun, Role of Sterol Regulatory Element-binding Protein 1 in Regulation of Renal Lipid Metabolism and Glomerulosclerosis in Diabetes Mellitus, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 18919–18927. doi:10.1074/jbc.M110650200.
- [47] S. Kume, T. Uzu, S. Araki, T. Sugimoto, K. Isshiki, M. Chin-Kanasaki, et al., Role of altered renal lipid metabolism in the development of renal injury induced by a high-fat diet., *J. Am. Soc. Nephrol.* 18 (2007) 2715–2723. doi:10.1681/ASN.2007010089.
- [48] T. Jiang, Z. Wang, G. Proctor, S. Moskowitz, S.E. Liebman, T. Rogers, et al., Diet-induced Obesity in C57BL/6J Mice Causes Increased Renal Lipid Accumulation and Glomerulosclerosis via a Sterol Regulatory Element-binding Protein-1c-dependent Pathway, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 32317–32325. doi:10.1074/jbc.M500801200.
- [49] J. Lytton, M. Westlin, M.R. Hanley, Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 17067–17071. doi:VL - 266.
- [50] U. Ozcan, Q. Cao, E. Yilmaz, A. Lee, N. Iwakoshi, Endoplasmic Reticulum Stress Links Obesity, Insulin Action, and Type 2 Diabetes, *Science* (80-. ). 457 (2004). doi:10.1126/science.1103160.
- [51] S. Back, R. Kaufman, Endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes, *Annu. Rev. Biochem.* (2012) 767–793. doi:10.1146/annurev-biochem-072909-095555.Endoplasmic.
- [52] E. Araki, S. Oyadomari, M. Mori, Endoplasmic reticulum stress and diabetes mellitus, *Intern. Med.* 42 (2003) 7–14. http://www.naika.or.jp/im2/42/01/03r.aspx.
- [53] X.-Q. Zhang, Role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease, *World J. Gastroenterol.* 20 (2014) 1768. doi:10.3748/wjg.v20.i7.1768.
- [54] B. Meusser, C. Hirsch, E. Jarosch, T. Sommer, ERAD: The long road to destruction,

- Nat. Cell Biol. 7 (2005) 766–772. doi:10.1038/ncb0805-766.
- [55] J.A. Olzmann, R.R. Kopito, J.C. Christianson, The Mammalian Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation System, *CSH Perspect.* (2015) 1–16.
- [56] J.G. Zeevaert, L. Wang, V. V Thakur, C.S. Leung, J. Tirado-, C.M. Bailey, et al., Time series proteome profiling to study endoplasmic reticulum stress response, *J. Proteome Res.* 130 (2009) 9492–9499. doi:10.1021/ja8019214.Optimization.
- [57] M. Wang, R.J. Kaufman, Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease, *Nature.* 529 (2016) 326–335. doi:10.1038/nature17041.
- [58] C. Hetz, The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 13 (2012) 89–102. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3270>.
- [59] S. Wang, R.J. Kaufman, The impact of the unfolded protein response on human disease, *J. Cell Biol.* 197 (2012) 857–867. doi:10.1083/jcb.201110131.
- [60] L. Ozcan, A.S. Ergin, A. Lu, J. Chung, S. Sarkar, D. Nie, et al., Endoplasmic Reticulum Stress Plays a Central Role in Development of Leptin Resistance, *Cell Metab.* 9 (2009) 35–51. doi:10.1016/j.cmet.2008.12.004.
- [61] M.J. Pagliassotti, P.Y. Kim, A.L. Estrada, C.M. Stewart, C.L. Gentile, Endoplasmic reticulum stress in obesity and obesity-related disorders: An expanded view, *Metabolism.* 65 (2016) 1238–1246. doi:10.1016/j.metabol.2016.05.002.
- [62] S. Basseri, R.C. Austin, ER Stress and Lipogenesis: A Slippery Slope toward Hepatic Steatosis, *Dev. Cell.* 15 (2008) 795–796. doi:10.1016/j.devcel.2008.11.013.
- [63] J.-S. Lee, Z. Zheng, R. Mendez, S.-W. Ha, Y. Xie, K. Zhang, Pharmacologic ER stress induces non-alcoholic steatohepatitis in an animal model, *Toxicol. Lett.* 211 (2012) 29–38. doi:10.1016/j.toxlet.2012.02.017.
- [64] S.E. Schadinger, N.L.R. Bucher, B.M. Schreiber, S.R. Farmer, PPARgamma2 regulates lipogenesis and lipid accumulation in steatotic hepatocytes., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 288 (2005) E1195-205. doi:10.1152/ajpendo.00513.2004.
- [65] Y. Moon, Review Article The SCAP / SREBP Pathway: A Mediator of Hepatic Steatosis, (2017) 1–5.
- [66] J. Ye, R.A. DeBose-Boyd, Regulation of cholesterol and fatty acid synthesis, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3 (2011) 1–13. doi:10.1101/cshperspect.a004754.
- [67] B.F. Teske, S. a Wek, P. Bunpo, J.K. Cundiff, J.N. McClintick, T.G. Anthony, et al., The eIF2 kinase PERK and the integrated stress response facilitate activation of ATF6 during endoplasmic reticulum stress., *Mol. Biol. Cell.* 22 (2011) 4390–405. doi:10.1091/mbc.E11-06-0510.
- [68] J. Ye, R.B. Rawson, R. Komuro, X. Chen, U.P. Davé, R. Prywes, et al., ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs, *Mol. Cell.* 6 (2000) 1355–1364. doi:10.1016/S1097-2765(00)00133-7.
- [69] L. Lee, Ann-Hwee; Scapa, Erez; Cohen, David; Glimcher, Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1, *Science (80-. ).* 320 (2008) 1492–1496. doi:10.1038/jid.2014.371.
- [70] E.D. Rosen, C. Hsu, X. Wang, S. Sakai, M.W. Freeman, F.J. Gonzalez, et al., C/EBPα induces adipogenesis through PPARγ: a unified pathway, *Genes Dev.* (2002) 22–26. doi:10.1101/gad.948702.nuclear.
- [71] R.C. Bauer, M. Sasaki, D.M. Cohen, J. Cui, M.A. Smith, B.O. Yenilmez, et al., Tribbles-1 regulates hepatic lipogenesis through posttranscriptional regulation of C/EBP??, *J. Clin. Invest.* 125 (2015) 3809–3818. doi:10.1172/JCI77095.
- [72] M. Cnop, F. Foufelle, L.A. Velloso, Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes, *Trends Mol. Med.* 18 (2012) 59–68. doi:10.1016/j.molmed.2011.07.010.
- [73] S.W. Park, Y. Zhou, J. Lee, J. Lee, U. Ozcan, Sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-

- ATPase 2b is a major regulator of endoplasmic reticulum stress and glucose homeostasis in obesity., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 19320–5. doi:10.1073/pnas.1012044107.
- [74] S. Fu, L. Yang, P. Li, O. Hofmann, L. Dicker, W. Hide, et al., Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity, *Nature*. 473 (2011) 528–531. doi:10.1038/nature09968.
- [75] N. Kawasaki, R. Asada, A. Saito, S. Kanemoto, K. Imaizumi, Obesity-induced endoplasmic reticulum stress causes chronic inflammation in adipose tissue., *Sci. Rep.* 2 (2012) 799. doi:10.1038/srep00799.
- [76] G. Castro, M.F. Maria, L. Weissmann, P.G.F. Quaresma, C.K. Katashima, M.J.A. Saad, et al., Diet-induced obesity induces endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in the amygdala of rats, *FEBS Open Bio.* 3 (2013) 443–449. doi:10.1016/j.fob.2013.09.002.
- [77] M.I. Fernández-mar, R. Mateos, M.C. García-parrilla, B. Puertas, E. Cantos-villar, Bioactive compounds in wine : Resveratrol , hydroxytyrosol and melatonin : A review, *Food Chem.* 130 (2012) 797–813. doi:10.1016/j.foodchem.2011.08.023.
- [78] M.I. Fernández-Mar, R. Mateos, M.C. García-Parrilla, B. Puertas, E. Cantos-Villar, Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review, *Food Chem.* 130 (2012) 797–813. doi:10.1016/j.foodchem.2011.08.023.
- [79] M.G. Novelle, D. Wahl, C. Dieguez, M. Bernier, R. De Cabo, Resveratrol supplementation : Where are we now and where should, *Ageing Res. Rev.* (2015) 1–15. doi:10.1016/j.arr.2015.01.002.
- [80] C. Chang, K. Lin, K. Peng, Y. Day, L. Hung, Resveratrol exerts anti-obesity effects in high-fat diet obese mice and displays differential dosage effects on cytotoxicity , differentiation , and lipolysis in 3T3-L1 cells, (2015). doi:10.1507/endocrj.EJ15-0545.
- [81] K. Liu, R. Zhou, B. Wang, M. Mi, Effect of resveratrol on glucose control and insulin sensitivity: a meta-analysis of 11 randomized controlled trials, *Am. J. Clin. Nutr.* 99 (2014) 1510–1519. doi:10.3945/ajcn.113.082024.INTRODUCTION.
- [82] M. Lagouge, C. Argmann, Z. Gerhart-Hines, H. Meziane, C. Lerin, F. Daussin, et al., Resveratrol Improves Mitochondrial Function and Protects against Metabolic Disease by Activating SIRT1 and PGC-1 alpha, *Cell.* 127 (2006) 1109–1122. doi:10.1016/j.cell.2006.11.013.
- [83] S. Wang, X. Liang, Q. Yang, X. Fu, C.J. Rogers, M. Zhu, et al., Resveratrol induces brown-like adipocyte formation in white fat through activation of AMP-activated protein kinase (AMPK)  $\alpha$ 1, *Int. J. Obes.* 39 (2015) 967–976. doi:10.1038/ijo.2015.23.
- [84] G. Alberdi, V. Rodríguez, M.T. Macarulla, J. Miranda, I. Churruga, P. Portillo, Hepatic lipid metabolic pathways modified by resveratrol in rats fed an obesogenic diet, *Nutrition.* 29 (2013) 562–567. doi:10.1016/j.nut.2012.09.011.
- [85] M.Y. Kim, J.H. Lim, H.H. Youn, Y.A. Hong, Resveratrol prevents renal lipotoxicity and inhibits mesangial cell glucotoxicity in a manner dependent on the AMPK – SIRT1 – PGC1  $\alpha$  axis in db / db mice, *Diabetologia.* (2013) 204–217. doi:10.1007/s00125-012-2747-2.
- [86] B.P. Hubbard, A.P. Gomes, H. Dai, J. Li, A.W. Case, T. V Riera, et al., Evidence for a common mechanism of SIRT1 regulation by allosteric activators, *Science* (80-. ). 339 (2013) 1216–1219. doi:10.1126/science.1231097.Evidence.
- [87] C. Kang, L.L. Ji, Role of PGC-1 alpha signaling in skeletal muscle health and disease, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1271 (2012) 110–117. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06738.x.
- [88] J. Kim, G. Yang, Y. Kim, J. Kim, J. Ha, AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities, *Exp. Mol. Med.* 48 (2016) e224. doi:10.1038/emmm.2016.16.
- [89] J. Zheng, V.D. Ramirez, Inhibition of mitochondrial proton F0F1-ATPase/ATP synthase

- by polyphenolic phytochemicals, *Br. J. Pharmacol.* 130 (2000) 1115–1123. doi:10.1038/sj.bjp.0703397.
- [90] J.H. Chung, V. Manganiello, J.R.B. Dyck, Resveratrol as a calorie restriction mimetic: therapeutic implications, *Trends Cell Biol.* 22 (2012) 546–554. doi:10.1016/j.tcb.2012.07.004.
- [91] N.B. Ruderman, X. Julia Xu, L. Nelson, J.M. Cacicedo, A.K. Saha, F. Lan, et al., AMPK and SIRT1: a long-standing partnership?, *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 298 (2010) E751–E760. doi:10.1152/ajpendo.00745.2009.
- [92] C. Cantó, L.Q. Jiang, A.S. Deshmukh, C. Matak, A. Coste, M. Lagouge, et al., Interdependence of AMPK and SIRT1 for Metabolic Adaptation to Fasting and Exercise in Skeletal Muscle, *Cell Metab.* 11 (2010) 213–219. doi:10.1016/j.cmet.2010.02.006.
- [93] M. Fulco, Y. Cen, P. Zhao, E.P. Hoffman, M.W. Mcburney, A. Sauve, et al., Glucose restriction inhibits skeletal myoblast differentiation by activating SIRT1 through AMPK-mediated regulation of Nampt, *Differentiation.* 14 (2009) 661–673. doi:10.1016/j.devcel.2008.02.004. Glucose.
- [94] J.L. Barger, T. Kayo, J.M. Vann, E.B. Arias, J. Wang, T.A. Hacker, et al., A low dose of dietary resveratrol partially mimics caloric restriction and retards aging parameters in mice, *PLoS One.* 3 (2008). doi:10.1371/journal.pone.0002264.
- [95] V.W. Dolinsky, C.F. Rueda-Clausen, J.S. Morton, S.T. Davidge, J.R.B. Dyck, Continued postnatal administration of resveratrol prevents diet-induced metabolic syndrome in rat offspring born growth restricted, *Diabetes.* 60 (2011) 2274–2284. doi:10.2337/db11-0374.
- [96] E.L. Robb, L. Winkelmoen, N. Visanji, J. Brotchie, J.A. Stuart, Dietary resveratrol administration increases MnSOD expression and activity in mouse brain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 372 (2008) 254–259. doi:10.1016/j.bbrc.2008.05.028.
- [97] Reeves, F.H. Nielsen, G.C. Fahey, AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet., *J. Nutr.* 123 (1993) 1939–1951. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- [98] G. Lusk, Animal calorimetry, *J. Biol. Chem.* (1924) 41–43.
- [99] J. Folch, M. Lees, G. H. Sloane Stanley, A Simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues, *J. Biol. Chem.* 55 (1957) 497–509. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2011.03.005.
- [100] C.A. Schneider, W.S. Rasband, K.W. Eliceiri, NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis, *Nat Meth.* 9 (2012) 671–675. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2089>.
- [101] E. Ferrannini, The theoretical bases of indirect calorimetry: A review, *Metabolism.* 37 (1988) 287–301. doi:10.1016/0026-0495(88)90110-2.
- [102] P.C. Even, A. Mokhtarian, A. Pele, Practical aspects of indirect calorimetry in laboratory animals, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 18 (1994) 435–447. doi:10.1016/0149-7634(94)90056-6.
- [103] J.B.D. V. Weir, New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism, *J. Physiol.* 109 (1949) 1–9. doi:PMCID: PMC1392602.
- [104] E. Jequier, J.P. Felber, Indirect calorimetry., *Baillieres. Clin. Endocrinol. Metab.* 1 (1987) 911–935.
- [105] Charles River Laboratories, C57BL/6 Mouse Hematology and Clinical Chemistry, (2008).
- [106] C. Wang, J.K. Liao, A mouse model of Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance, *Methods Mol Biol.* 821 (2012) 421–433. doi:10.1007/978-1-61779-430-8.
- [107] K. Eisinger, G. Liebisch, G. Schmitz, C. Aslanidis, S. Krautbauer, C. Buechler, Lipidomic analysis of serum from high fat diet induced obese mice, *Int. J. Mol. Sci.* 15

(2014) 2991–3002. doi:10.3390/ijms15022991.

- [108] M.G. Bastos, A. Andriolo, G.M. Kirsztajn, World Kidney Day 2011 albuminuria and creatinine: simple, inexpensive and essential tests in the course of chronic kidney disease., *J. Bras. Nefrol. 'orgão Of. Soc. Bras. E Latino-Americana Nefrol.* 33 (2011) 1–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21541457>.
- [109] J. Throop, M.E. Kerl, L. Cohn, Albumin in Health and Disease: Causes and Treatment of Hypoalbuminemia, *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.* 26 (2004) 940–949. [https://secure.vlsstore.com/Media/PublicationsArticle/PV\\_26\\_12\\_940.pdf](https://secure.vlsstore.com/Media/PublicationsArticle/PV_26_12_940.pdf).
- [110] M. De Felice, C. Mazzaccara, G. Labruna, G. Cito, M. Scarfo, L. Sacchetti, Age-Related Reference Intervals of the Main Biochemical and Hematological Parameters in C57BL / 6J , 129SV / EV and C3H / HeJ Mouse Strains, *PLoS One.* 3 (2008) 4–10. doi:10.1371/journal.pone.0003772.
- [111] A.R. Saltiel, C.R. Kahn, Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism, *Nature.* 414 (2001) 799–806. doi:10.1038/414799a.
- [112] R. Trevisan, Lipids and Renal Disease, *J. Am. Soc. Nephrol.* 17 (2006) S145–S147. doi:10.1681/ASN.2005121320.
- [113] M. Flamment, E. Hajduch, P. Ferré, F. Foufelle, New insights into ER stress-induced insulin resistance, *Trends Endocrinol. Metab.* 23 (2012) 381–390. doi:10.1016/j.tem.2012.06.003.
- [114] M.D. Klok, S. Jakobsdottir, M.L. Drent, The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: A review, *Obes. Rev.* 8 (2007) 21–34. doi:10.1111/j.1467-789X.2006.00270.x.
- [115] A. Shankar, S. Syamala, J. Xiao, P. Muntner, Relationship between plasma Leptin level and chronic kidney disease, *Int. J. Nephrol.* 2012 (2012). doi:10.1155/2012/269532.
- [116] T. Hosoi, M. Sasaki, T. Miyahara, C. Hashimoto, S. Matsuo, M. Yoshii, et al., Endoplasmic Reticulum Stress Induces Leptin Resistance, *Mol. Pharmacol.* 74 (2008) 1610–1619. doi:10.1124/mol.108.050070.the.
- [117] H. Ruan, L.Q. Dong, Adiponectin signaling and function in insulin target tissues, *J Mol Cell Biol.* 8 (2016) 101–109. doi:10.1093/jmcb/mjw014.
- [118] C.-Y. Yoon, Y.L. Kim, S.H. Han, T.-H. Yoo, S.-A. Sung, W. Chung, et al., Hypoadiponectinemia and the presence of metabolic syndrome in patients with chronic kidney disease: results from the KNOW-CKD study, *Diabetol. Metab. Syndr.* 8 (2016) 75. doi:10.1186/s13098-016-0191-z.
- [119] A.K. Mondal, S.K. Das, V. Varma, G.T. Nolen, R.E. McGehee, S.C. Elbein, et al., Effect of endoplasmic reticulum stress on inflammation and adiponectin regulation in human adipocytes, *Metab Syndr Relat Disord.* 10 (2012) 297–306. doi:10.1089/met.2012.0002.
- [120] S. Daemen, M. Kutmon, C.T. Evelo, A pathway approach to investigate the function and regulation of SREBPs, *Genes Nutr.* 8 (2013) 289–300. doi:10.1007/s12263-013-0342-x.
- [121] R. Cunard, Endoplasmic Reticulum Stress in the Diabetic Kidney, the Good, the Bad and the Ugly, *J. Clin. Med.* 4 (2015) 715–740. doi:10.3390/jcm4040715.
- [122] C.M. Osowski, F. Urano, Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system, *Methods Enzymol.* 490 (2013) 71–92. doi:10.1016/B978-0-12-385114-7.00004-0.Measuring.
- [123] a Heifetz, R.W. Keenan, a D. Elbein, Mechanism of action of tunicamycin on the UDP-GlcNAc:dolichyl-phosphate Glc-NAc-1-phosphate transferase., *Biochemistry.* 18 (1979) 2186–2192. doi:10.1021/bi00578a008.
- [124] J. Baur, K. Pearson, N. Price, H. Jamieson, C. Lerin, A. Kalra, Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet, *Nature.* 444 (2006) 337–342.

doi:10.1038/nature05354.Resveratrol.

- [125] Y.Y. Lam, C.M. Peterson, E. Ravussin, Resveratrol vs . calorie restriction : Data from rodents to humans, *Exp. Gerontol.* 48 (2013) 1018–1024. doi:10.1016/j.exger.2013.04.005.
- [126] L. Carmona, M. Gavilanes, V. Maya, C. Plata, *Compendio de Bioquímica: Proteínas, membranas y metabolismo.*, (2010).
- [127] D. Muoio, Metabolic Inflexibility: When mitochondrial indecision leads to metabolic gridlock, *Cell.* 159 (2014) 1253–1262. doi:10.1038/nbt.3121.ChIP-nexus.
- [128] W.T. Cefalu, Animal models of type 2 diabetes: clinical presentation and pathophysiological relevance to the human condition., *ILAR J.* 47 (2006) 186–98. doi:10.1093/ILAR.47.3.186.
- [129] S. Andrikopoulos, A.R. Blair, N. Deluca, B.C. Fam, J. Proietto, Evaluating the glucose tolerance test in mice, 295 (2008) E1323–E1332. doi:10.1152/ajpendo.90617.2008.
- [130] The Jackson Laboratory, *Physiological Data Summary – C57BL / 6J mice*, 2007.
- [131] S. Frendo-Cumbo, R.E.K. MacPherson, D.C. Wright, Beneficial effects of combined resveratrol and metformin therapy in treating diet-induced insulin resistance, *Physiol. Rep.* 4 (2016) e12877. doi:10.14814/phy2.12877.
- [132] R. Hage Hassan, I. Hainault, J.T. Vilquin, C. SamaM.A., F. Lasnier, P. Ferré, et al., Endoplasmic reticulum stress does not mediate palmitate-induced insulin resistance in mouse and human muscle cells, *Diabetologia.* 55 (2012) 204–214. doi:10.1007/s00125-011-2328-9.
- [133] H. Jo, S.S. Choe, K.C. Shin, H. Jang, J.H. Lee, J.K. Seong, et al., Endoplasmic reticulum stress induces hepatic steatosis via increased expression of the hepatic very low-density lipoprotein receptor, *Hepatology.* 57 (2013) 1366–1377. doi:10.1002/hep.26126.
- [134] G.N. Levinthal, A.S. Tavill, *Liver Disease and Diabetes Mellitus*, *Clin. Diabetes.* 17 (1999).
- [135] G.K. Sood, *Acute Liver Failure*, (2016). <http://emedicine.medscape.com/article/177354-overview> (accessed May 31, 2017).
- [136] Q. Pan, Y. Ren, W. Liu, Y. Hu, J. Zheng, Y. Xu, et al., Resveratrol prevents hepatic steatosis and endoplasmic reticulum stress and regulates the expression of genes involved in lipid metabolism , insulin resistance , and inflammation in rats, *Nutr. Res.* 35 (2015) 576–584. doi:10.1016/j.nutres.2015.05.006.
- [137] A.J. Kennedy, K.L.J. Ellacott, V.L. King, A.H. Hasty, Mouse models of the metabolic syndrome, *Dis. Model. Mech.* 3 (2010) 156–166. doi:10.1242/dmm.003467.
- [138] D.C. Musial, T.C. Alexandrino Becker, A.P. Isolani, L. Bracht, A.C. Broetto Biazon, Hypercholesterolemia and hepatic steatosis in mice fed on low-cost high-fat diet, *Acta Sci. - Heal. Sci.* 35 (2013) 23–27. doi:10.4025/actascihealthsci.v35i1.10871.
- [139] C.M. Balarini, M.Z. Oliveira, T.M. Pereira, N.F. Silva, E.C. Vasquez, S.S. Meyrelles, et al., Hypercholesterolemia promotes early renal dysfunction in apolipoprotein E-deficient mice, *Lipids Health Dis.* 10 (2011) 220. doi:10.1186/1476-511X-10-220.
- [140] S.M. Hammad, D.J. Hazen-Martin, M. Sohn, L. Eldridge, L. Powell-Braxton, W. Won, et al., Nephropathy in a hypercholesterolemic mouse model with streptozotocin- induced diabetes, *Kidney Blood Press. Res.* 26 (2003) 351–361. doi:10.1159/000073942.
- [141] E. Sozen, N.K. Ozer, Impact of high cholesterol and endoplasmic reticulum stress on metabolic diseases: An updated mini-review, *Redox Biol.* 12 (2017) 456–461. doi:10.1016/j.redox.2017.02.025.
- [142] A.M. Gajda, M.A. Pellizzon, D. Ph, M.R. Ricci, D. Ph, E.A. Ulman, et al., *Diet-Induced Metabolic Syndrome*, (2007).

- [143] H. Malhi, R.J. Kaufman, Endoplasmic Reticulum Stress in Liver Disease, *J Hepatol.* 54 (2011) 795–809. doi:10.1016/j.jhep.2010.11.005.Endoplasmic.
- [144] M. Chopra, A. Siddhu, N. Tandon, Effect of Nutritional Regulation on Adipokines in Obesity : A Review, 2 (2014) 66–70. doi:10.12691/ajfn-2-4-4.
- [145] C. Caruso, C.R. Balistreri, G. Candore, The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases, *Mediators Inflamm.* 2010 (2010). doi:10.1155/2010/802078.
- [146] R. Ricci, F. Bevilacqua, The potential role of leptin and adiponectin in obesity: A comparative review, *Vet. J.* 191 (2012) 292–298. doi:10.1016/j.tvjl.2011.04.009.
- [147] M. Tesauro, A. Mascali, O. Franzese, S. Cipriani, C. Cardillo, N. Di Daniele, Chronic kidney disease, obesity, and hypertension: The role of leptin and adiponectin, *Int. J. Hypertens.* 2012 (2012). doi:10.1155/2012/943605.
- [148] G. Wolf, S. Chen, D.C. Han, F.N. Ziyadeh, Leptin and renal disease, *Am. J. Kidney Dis.* 39 (2017) 1–11. doi:10.1053/ajkd.2002.29865.
- [149] Z.A. Knight, K.S. Hannan, M.L. Greenberg, J.M. Friedman, Hyperleptinemia is required for the development of leptin resistance, *PLoS One.* 5 (2010) 1–8. doi:10.1371/journal.pone.0011376.
- [150] B. Wang, J. Sun, L. Li, J. Zheng, Y. Shi, G. Le, Regulatory effects of resveratrol on glucose metabolism and T-lymphocyte subsets in the development of high-fat diet-induced obesity in C57BL/6 mice, *Food Funct.* 5 (2014) 1452. doi:10.1039/c3fo60714c.
- [151] A. Wang, M. Liu, X. Liu, L.Q. Dong, R.D. Glickman, T.J. Slaga, et al., Up-regulation of adiponectin by resveratrol: The essential roles of the Akt/FOXO1 and amp-activated protein kinase signaling pathways and DsbA-L, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 60–66. doi:10.1074/jbc.M110.188144.
- [152] H. Ji, L. Wu, X. Ma, X. Ma, G. Qin, The effect of resveratrol on the expression of AdipoR1 in kidneys of diabetic nephropathy, *Mol. Biol. Rep.* 41 (2014) 2151–2159. doi:10.1007/s11033-014-3064-2.
- [153] I. Cakir, N.E. Cyr, M. Perello, B.P. Litvinov, A. Romero, R.C. Stuart, et al., Obesity induces hypothalamic endoplasmic reticulum stress and impairs proopiomelanocortin (POMC) post-translational processing, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 17675–17688. doi:10.1074/jbc.M113.475343.
- [154] D. Ariyasu, H. Yoshida, Y. Hasegawa, Endoplasmic reticulum (Er) stress and endocrine disorders, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017). doi:10.3390/ijms18020382.
- [155] L. Zhou, M. Liu, J. Zhang, H. Chen, L.Q. Dong, F. Liu, DsbA-L Alleviates Endoplasmic Reticulum Stress – Induced Adiponectin Downregulation, *Diabetes.* 59 (2010). doi:10.2337/db10-0412.
- [156] I. Torre-Villalvazo, A.E. Bunt, N. Torres, A.R. Tovar, Adiponectin and leptin secretion are differentially modulated in subcutaneous and visceral adipose tissue by endoplasmic reticulum stress, *FASEB J.* 26 (2012) 570.7-570.7. [http://www.fasebj.org/content/26/1\\_Supplement/570.7.abstract](http://www.fasebj.org/content/26/1_Supplement/570.7.abstract).
- [157] G.J. Becker, T.D. Hewitson, Animal models of chronic kidney disease: Useful but not perfect, *Nephrol. Dial. Transplant.* 28 (2013) 2432–2438. doi:10.1093/ndt/gft071.
- [158] M.D. Breyer, Mouse Models of Diabetic Nephropathy, *J. Am. Soc. Nephrol.* 16 (2004) 27–45. doi:10.1681/ASN.2004080648.
- [159] P. Mount, M. Davies, S.-W. Choy, N. Cook, D. Power, Obesity-Related Chronic Kidney Disease—The Role of Lipid Metabolism, *Metabolites.* 5 (2015) 720–732. doi:10.3390/metabo5040720.
- [160] H.S. Park, J.H. Lim, M.Y. Kim, Y. Kim, Y.A. Hong, S.R. Choi, et al., Resveratrol increases AdipoR1 and AdipoR2 expression in type 2 diabetic nephropathy, *J. Transl. Med.* 14 (2016) 176. doi:10.1186/s12967-016-0922-9.

- [161] Y. Zhou, S. Lin, L. Zhang, Y. Li, Resveratrol prevents renal lipotoxicity in high-fat diet-treated mouse model through regulating PPAR- $\alpha$  pathway, *Mol. Cell. Biochem.* 411 (2016) 143–150. doi:10.1007/s11010-015-2576-y.
- [162] M. Taniguchi, H. Yoshida, Endoplasmic reticulum stress in kidney function and disease, *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 24 (2015) 345–350. doi:10.1097/MNH.0000000000000141.
- [163] R.E. Carlisle, E. Brimble, K.E. Werner, G.L. Cruz, K. Ask, A.J. Ingram, et al., 4-phenylbutyrate inhibits tunicamycin-induced acute kidney injury via CHOP/GADD153 repression, *PLoS One.* 9 (2014) 1–13. doi:10.1371/journal.pone.0084663.
- [164] A. V. Cybulsky, T. Takano, J. Papillon, T.M. Kitzler, K. Bijian, Endoplasmic reticulum stress in glomerular epithelial cell injury, *AJP Ren. Physiol.* 301 (2011) F496–F508. doi:10.1152/ajprenal.00728.2010.
- [165] N. Deji, S. Kume, S. Araki, M. Soumura, T. Sugimoto, K. Isshiki, et al., Structural and functional changes in the kidneys of high-fat diet-induced obese mice., *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 296 (2009) 118–126. doi:10.1152/ajprenal.00110.2008.
- [166] S. Munusamy, J.M. do Carmo, J.P. Hosler, J.E. Hall, Obesity-induced changes in kidney mitochondria and endoplasmic reticulum in the presence or absence of leptin, *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 309 (2015) F731–F743. doi:10.1152/ajprenal.00188.2015.
- [167] T. Jiang, Z. Wang, G. Proctor, S. Moskowitz, S.E. Liebman, T. Rogers, et al., Diet-induced obesity in C57BL/6J mice causes increased renal lipid accumulation and glomerulosclerosis via a sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent pathway, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 32317–32325. doi:10.1074/jbc.M500801200.
- [168] L. Zhu, X. Luo, Z. Jin, Effect of resveratrol on serum and liver lipid profile and antioxidant activity in hyperlipidemia rats, *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 21 (2008) 890–895. doi:10.5713/ajas.2008.70638.
- [169] M. Nagai, J. Sakakibara, Y. Nakamura, F. Gejyo, T. Ono, SREBP-2 and NF- $\kappa$ B are involved in the transcriptional regulation of squalene epoxidase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 295 (2002) 74–80. doi:10.1016/S0006-291X(02)00623-X.
- [170] S. Lhotak, S. Sood, E. Brimble, R.E. Carlisle, S.M. Colgan, A. Mazzetti, et al., ER stress contributes to renal proximal tubule injury by increasing SREBP-2-mediated lipid accumulation and apoptotic cell death, *Am J Physiol Ren. Physiol.* 303 (2012) F266–78. doi:10.1152/ajprenal.00482.2011.
- [171] M. Wang, S. Wey, Y. Zhang, R. Ye, A.S. Lee, Role of the Unfolded Protein Response Regulator GRP78/BiP in Development, Cancer, and Neurological Disorders, *Antioxid. Redox Signal.* 11 (2009) 2307–2316. doi:10.1089/ars.2009.2485.
- [172] H. Zinszner, M. Kuroda, X. Wang, N. Batchvarova, R.T. Lightfoot, H. Remotti, et al., CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum, *Genes Dev.* 12 (1998) 982–995. doi:10.1101/gad.12.7.982.
- [173] D. Imrie, K.C. Sadler, Stress management: How the unfolded protein response impacts fatty liver disease, *J. Hepatol.* 57 (2012) 1147–1151. doi:10.1016/j.jhep.2012.06.018.
- [174] J.A. Gomez, D. Thomas Rutkowski, Experimental reconstitution of chronic ER stress in the liver reveals feedback suppression of BiP mRNA expression, *Elife.* 5 (2016) 1–22. doi:10.7554/eLife.20390.001.
- [175] J.D. Horton, J.L. Goldstein, M.S. Brown, SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver, *J. Clin. Invest.* 109 (2002) 1125–1131. doi:10.1172/JCI200215593.Lipid.
- [176] M.S. Brown, J.L. Goldstein, The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor., *Cell.* 89 (1997) 331–340.
- [177] H. Tang, R. Yu, S. Liu, B. Huwatibieke, Z. Li, W. Zhang, Irisin Inhibits Hepatic

Cholesterol Synthesis via AMPK-SREBP2 Signaling, *EBioMedicine*. 6 (2016) 139–148. doi:10.1016/j.ebiom.2016.02.041.

- [178] D.G. Hardie, Review AMPK — Sensing Energy while Talking to Other Signaling Pathways, *Cell Metab.* 20 (2014) 939–952. doi:10.1016/j.cmet.2014.09.013.
- [179] A.-E. Decleves, A. V. Mathew, R. Cunard, K. Sharma, AMPK Mediates the Initiation of Kidney Disease Induced by a High-Fat Diet, *J. Am. Soc. Nephrol.* 22 (2011) 1846–1855. doi:10.1681/ASN.2011010026.
- [180] S. Austin, J. St-Pierre, PGC1 and mitochondrial metabolism - emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders, *J. Cell Sci.* 125 (2012) 4963–4971. doi:10.1242/jcs.113662.