



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“ALTERACIONES EN LA HOMEOSTASIS MITOCONDRIAL DURANTE EL
DESARROLLO DE FIBROSIS RENAL INDUCIDO POR LA OBSTRUCCIÓN
UNILATERAL DEL URÉTER EN RATAS”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctora en Ciencias

PRESENTA:

Alexis Paulina Jiménez Uribe

TUTOR PRINCIPAL

Dr. José Pedraza Chaverri
Facultad de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Xóchitl Pérez Martínez
Instituto de Fisiología Celular
Dra. Paula Liconá Limón
Instituto de Fisiología Celular

Ciudad de México, noviembre, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

La realización de este proyecto fue posible gracias al financiamiento otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con número de proyecto A1-S-7495), Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con número de proyecto IN202219 e IN200922, y por el programa de Apoyo a la Investigación y Posgrado (PAIP) 5000-9105 de la Facultad de Química.

Los procedimientos quirúrgicos en los animales de experimentación se realizaron bajo el asesoramiento de la Dra. Edilia Tapia en el Instituto Nacional de Cardiología. El procesamiento de tejidos para histología y microscopía electrónica de transmisión se realizó bajo el asesoramiento de la Dra. Marisol Orozco Ibarra del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.

Los procedimientos de obtención de corteza renal y aislamiento mitocondrial se realizaron bajo el asesoramiento del Dr. Emiliano Aparicio y la Bióloga Belén Bellido.

RESUMEN

La enfermedad renal crónica (ERC) es un problema de salud mundial cuyo origen puede ser diverso, desde enfermedades congénitas, diabetes mellitus, hipertensión, neoplasias, entre otros. Una de las consecuencias de la ERC, independientemente del origen que tenga, es el desarrollo de fibrosis. La fibrosis renal es un fenómeno complejo y progresivo que involucra la activación de diversas vías de señalización y modificaciones metabólicas que resultan en la transición epitelio-mesenquimal (TEM) y la deposición excesiva de matriz extracelular (MEC); dichos cambios llevan al daño estructural y disfunción renal. Debido a la alta demanda energética renal, las nefronas contienen una gran cantidad de mitocondrias en la porción tubular; por lo cual el desarrollo de patologías renales, incluyendo a la ERC, se han asociado con alteraciones mitocondriales. Las mitocondrias son orgánulos altamente dinámicos, sin embargo, los cambios adaptativos que sufren a lo largo de la progresión de la ERC y la fibrosis desencadenada por este proceso, han sido poco explorados. En este trabajo evaluamos el curso temporal de las alteraciones en la homeostasis mitocondrial debido a la obstrucción unilateral del uréter (OUU), un modelo de estudio que involucra la inducción y desarrollo de la fibrosis renal de manera progresiva y acelerada. Nuestros resultados revelan una reducción en la masa mitocondrial temprana y sostenida, probablemente derivado de la disminución de la biogénesis mitocondrial y del aumento de la mitofagia, la cual se observó que fue independiente a la vía de PINK1 y Parkin. De manera interesante, todas estas alteraciones mitocondriales anteceden al establecimiento de la fibrosis.

ABSTRACT

Chronic kidney disease (CKD) is a world health problem triggered by different conditions, such as congenital diseases, diabetes mellitus, hypertension, tumors, etc. One of the common consequences of CKD, regardless of its origin, is fibrosis development. Renal fibrosis is a complex and progressive phenomenon involving the activation of several signal pathways and metabolic alterations that result in the epithelial-mesenchymal transition and the excessive extracellular matrix deposition that drives structural damage and kidney dysfunction. Due to the high energy demand of the kidneys, the nephrons contain a high density of mitochondria, particularly in the tubular segment; hence, kidney pathologies, including CKD have shown mitochondrial alterations.

Mitochondria are highly dynamic organelles; however, adaptive changes during the CKD progression and the associated fibrotic process remain unexplored. This work aimed to evaluate the alterations in mitochondrial homeostasis in a temporal course during the unilateral ureteral obstruction (UUO) in rats, an animal model that involves the induction and development of kidney fibrosis in a progressive and accelerated manner.

Our results reveal a sustained reduction in the mitochondrial mass derived from the decreased biogenesis and induction of mitophagy; this last process was independent of PTEN-induced kinase 1 (PINK1) and Parkin. Interestingly, all of these mitochondrial alterations precede fibrosis establishment.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

4-HNE 4- hidroxinonenal
 α -SMA del inglés de alpha-smooth muscle actin
ADH del inglés antidiuretic hormone
ADP del inglés adenosine diphosphate
AMP del inglés adenosine monophosphate
AMPK del inglés AMP-activated protein kinase
ANT del inglés adenine nucleotide translocator
ARIH1 del inglés ariadne homolog protein 1
ATP del inglés adenosine triphosphate
BNIP3L del inglés BCL2/adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3-like
CICUAL Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio
CTGF del inglés connective tissue growth factor
COX del inglés cytochrome c oxidase
Drp1 del inglés dynamin-related protein 1
EDTA ácido etilendiaminotetraacético
ECA enzima convertidora de angiotensina
ERC enfermedad renal crónica
ERK del inglés extracellular signal-regulated kinase
ERO especies reactivas del oxígeno
ERR del inglés estrogen related receptor
eTFG tasa de filtración glomerular estimada
Fis1 del inglés mitochondrial fission 1 protein
FSP-1 del inglés fibroblasts-specific protein 1
FUNDC1 del inglés FUN14 domain containing 1
H&E hematoxilina y eosina
HEPES ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico
IL- interleucina
ILS del inglés insulin-like signaling
IRA insuficiencia renal aguda
JAK2 del inglés Janus 2 kinase
LC3 del inglés microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
LIR del inglés LC3 interacting region
MAPK del inglés mitogen-activated protein kinases
MEC matriz extracelular
MEM membrana externa mitocondrial
MET microscopía electrónica de transmisión
MDA malondialdehído
MIM membrana interna mitocondrial
MPP del inglés mitochondrial processing peptidase
mtDNA del inglés mitochondrial DNA
mTOR del inglés mammalian target of rapamycin
MUL1 del inglés mitochondrial E3 ubiquitin protein ligase 1
NADH-TR del inglés de NADH-tetrazolium reductase
NADPH del inglés nicotinamide adenine dinucleotide phosphatase
NCX del inglés Na⁺/Ca²⁺ exchanger
NHE3 del inglés Na⁺/H⁺ exchanger isoform 3

NOX4 NADPH oxidasa 4
NRF del inglés nuclear respiratory factor
OPA1 del inglés optic atrophy type 1
OUU obstrucción unilateral del uréter
P consumo de oxígeno mitocondrial asociado a la síntesis de ATP
PARL del inglés presenilin-associated rhomboid like protein
PAS del inglés periodic acid-Schiff
PBS amortiguador de fosfatos
PGC-1 α del inglés peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator
PHB2 del inglés prohibitin 2
PINK1 del inglés PTEN-induced kinase 1
PMSF fluoruro de fenilmetilsulfonilo
POL γ DNA polimerasa γ
PPAR del inglés peroxisome proliferator-activated receptor
PTEN del inglés phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10
PVDF fluoruro de polivinilideno
RIPA del inglés radioimmunoprecipitation assay lysis buffer
S3 estado 3 que indica el consumo de oxígeno total mitocondrial en presencia de sustratos y ADP
SEM del inglés standar error of median
SLC4A4 del inglés solute carrier family 4 member 4
SRAA sistema renina-angiotensina-aldosterona
STAT3 del inglés signal transducer and activator of transcription 3
STE sistema de transporte de electrones
TBST amortiguador TRIS-Tween 20
TEM transición epitelio-mesenquimal
TFAM del inglés mitochondrial transcription factor A
TGF- β del inglés transforming growth factor-beta
TGF β RI del inglés TGF- β receptor I
TGF β RII del inglés TGF- β receptor II
TIM del inglés translocase of the inner membrane
TNF- α del inglés tumor necrosis factor-alpha
TOM del inglés translocase of the outer membrane
TRAF2 del inglés TNF receptor associated factor 2
TRVP del inglés transient receptor potential cation channel
VDAC del inglés voltage dependent anion channel

TABLA DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN.....	9
FISIOLOGÍA RENAL	10
• Estructura renal.....	11
• Filtración y equilibrio osmótico.....	15
• Equilibrio iónico	17
• Regulación de la presión sanguínea	17
• Equilibrio del pH.....	17
• Producción de eritropoyetina	18
• Conversión de vitamina D	18
HOMEOSTASIS MITOCONDRIAL EN EL FUNCIONAMIENTO RENAL.....	19
• Bioenergética mitocondrial en la función renal	19
• Estructura y funciones de la mitocondria	20
• Biogénesis mitocondrial.....	22
• Mitofagia.....	23
ERC.....	25
OBSTRUCCIÓN UNILATERAL DEL URÉTER (OUU) COMO MODELO	27
MECANISMOS CELULARES DE LA FIBROSIS.....	27
MECANISMOS MOLECULARES DE LA FIBROSIS	29
ALTERACIONES MITOCONDRIALES EN LA ERC.....	29
ALTERACIONES MITOCONDRIALES EN LA OUU	30
JUSTIFICACIÓN	31
HIPÓTESIS.....	31
OBJETIVO GENERAL.....	31
OBJETIVOS PARTICULARES	31
MATERIALES Y MÉTODOS	32
• Modelo de OUU.....	32

• Histología renal	33
• Histoquímica enzimática.....	34
• Western blot.....	36
• Aislamiento de mitocondrias	39
• Análisis estadístico	40
RESULTADOS.....	40
• Progresión del daño inflamatorio y fibrótico en la OUU.....	40
• Evaluación de la función mitocondrial	43
• Determinación de la masa mitocondrial	44
• Determinación de la biogénesis mitocondrial.....	45
• Daño oxidativo en la mitocondria	47
• Correlación entre parámetros bioenergéticos con marcadores de masa y biogénesis mitocondrial.	49
• Determinación de marcadores de mitofagia.....	51
DISCUSIÓN.....	55
CONCLUSIÓN.....	59
REFERENCIAS.....	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de la enfermedad renal crónica (ERC)	26
Tabla 2. Concentración de geles de poliacrilamida de acuerdo a al peso molecular de la proteína de interés	36
Tabla 2. Lista de anticuerpos utilizados.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Funciones renales.....	11
Figura 2. Estructura renal.....	12
Figura 3. Estructura mitocondrial.	21
Figura 4. Homeostasis mitocondrial.....	25

Figura 5. Estrategia experimental..	36
Figura 6. El establecimiento de la inflamación y fibrosis ocurren a partir del día 14 de obstrucción	42
Figura 7. La obstrucción unilateral del uréter (OUU) provoca la disminución en la actividad del complejo I y del complejo IV del STE (sistema de transporte de electrones)	44
Figura 8. La obstrucción unilateral del uréter (OUU) provoca la disminución en la masa mitocondrial de manera temprana.	45
Figura 9. La obstrucción unilateral del uréter (OUU) provoca la disminución de marcadores de biogénesis mitocondrial.	47
Figura 10. La obstrucción unilateral del uréter (OUU) promueve el daño oxidante en mitocondrias	48
Figura 11. La biogénesis mitocondrial y masa mitocondrial correlacionan positivamente con la función mitocondrial y negativamente con TGF-β.	50
Figura 12. La obstrucción unilateral del uréter (OUU) induce cambios estructurales en mitocondrias	52
Figura 13. La obstrucción unilateral del uréter (OUU) induce la remoción de mitocondrias por mitofagia	53
Figura 14. El proceso de mitofagia inducido por la obstrucción unilateral del uréter (OUU) es independiente de la vía de PINK1 y Parkin	55
Figura 15. Alteraciones mitocondriales temporales en la progresión de la obstrucción unilateral del uréter (OUU).	59

INTRODUCCIÓN

La enfermedad renal crónica (ERC) se define como el deterioro progresivo en la función renal, reflejada por la disminución en la tasa de filtración glomerular estimada (eTFG) y el daño estructural en el riñón (1). La ERC representa un severo problema de salud a nivel mundial siendo prácticamente irreversible y que requiere la terapia de reemplazo (diálisis, hemodiálisis o trasplante renal) para su manejo terapéutico.

Dentro de las etiologías más comunes que pueden generar ERC, se encuentran la hipertensión, obesidad, la nefropatía diabética, la nefropatía obstructiva, entre otras (2). El daño persistente conduce a la pérdida del parénquima renal, favoreciendo la progresión de la ERC. Dentro de las alteraciones más conocidas en esta patología están los cambios hemodinámicos, aumento del estrés oxidante, inducción de la apoptosis e inflamación persistente que finalmente conducen al desarrollo de fibrosis (3-7).

La fibrosis es un proceso complejo que resulta en alteraciones de la arquitectura del tejido, la cual se caracteriza por la acumulación excesiva de componentes de la matriz extracelular (MEC) provenientes de fibroblastos y miofibroblastos (8). Dicha MEC, al modificar la estructura también impacta directamente en la función del órgano.

Recientemente, algunos eventos celulares como el estrés del retículo endoplásmico y la disfunción mitocondrial han sido descritos durante el desarrollo de la ERC y la fibrosis asociada a ésta (9-11).

Particularmente, las alteraciones mitocondriales en la ERC que han sido descritas incluyen su papel en la inducción del estrés oxidante, la apoptosis y la lipotoxicidad (4, 6, 11-14); sin embargo, las alteraciones en la homeostasis mitocondrial han sido poco exploradas y descritas generalmente cuando la fibrosis renal ya se encuentra establecida.

En este contexto, la obstrucción unilateral del uréter (OUU) representa un modelo animal valioso, ya que refleja la conversión de la insuficiencia renal aguda (IRA) a la ERC de una forma acelerada, reproduciendo en gran medida lo que sucede en la nefropatía obstructiva en humanos, además de ser un modelo ampliamente utilizado para estudiar el proceso fibrótico en el riñón (15).

Dentro de los cambios más notables en los tiempos tempranos de la OUU, se encuentran el aumento en la presión hidrostática, la reducción del flujo sanguíneo y por lo tanto la reducción en la eTFG. Los cambios hemodinámicos tempranos y el estrés oxidante conducen a la reprogramación metabólica, daño celular e inflamación; resultando así en la disminución de la función renal (16).

Dentro de las alteraciones metabólicas en este modelo se encuentran algunas relacionadas estrechamente al funcionamiento mitocondrial, tal es el caso de la disminución en la concentración de adenosín monofosfato (AMP) y adenosín difosfato (ADP) (17), así como la reducción en la expresión de algunas enzimas de la β -oxidación de los ácidos grasos (11). Hasta el momento, los estudios relacionados con alteraciones mitocondriales en la ERC inducida por la OUU se han enfocado principalmente al papel de este orgánulo en la inducción del estrés oxidante (6, 18), sin embargo, no es claro si existen modificaciones en la homeostasis mitocondrial y cómo éstas progresan durante la ERC y hasta el desencadenamiento de la fibrosis renal.

De ahí que el entender las alteraciones mitocondriales de una forma más amplia a lo largo del desarrollo de la OUU podría ser de utilidad para tener un escenario más completo sobre las implicaciones que podría tener este orgánulo en el daño renal y sus futuras posibles aplicaciones terapéuticas.

FISIOLOGÍA RENAL

El sistema urinario de los mamíferos terrestres consiste en un par de riñones, dos uréteres, vejiga y uretra. La función general de este sistema es la filtración de plasma proveniente del flujo renal (en humanos aproximadamente 200 L/día), y cuyo objetivo es la formación de orina. Durante la formación de la orina ocurre la eliminación de productos de desecho (toxinas, productos metabólicos, iones excedentes, entre otros), así como la reabsorción de algunas otras moléculas.

Otras funciones importantes de los riñones además de la filtración y la reabsorción son mantener el equilibrio iónico, regular la presión sanguínea, mantener el equilibrio ácido-base, convertir la vitamina D en su forma activa y producir la eritropoyetina (19) (Figura 1).

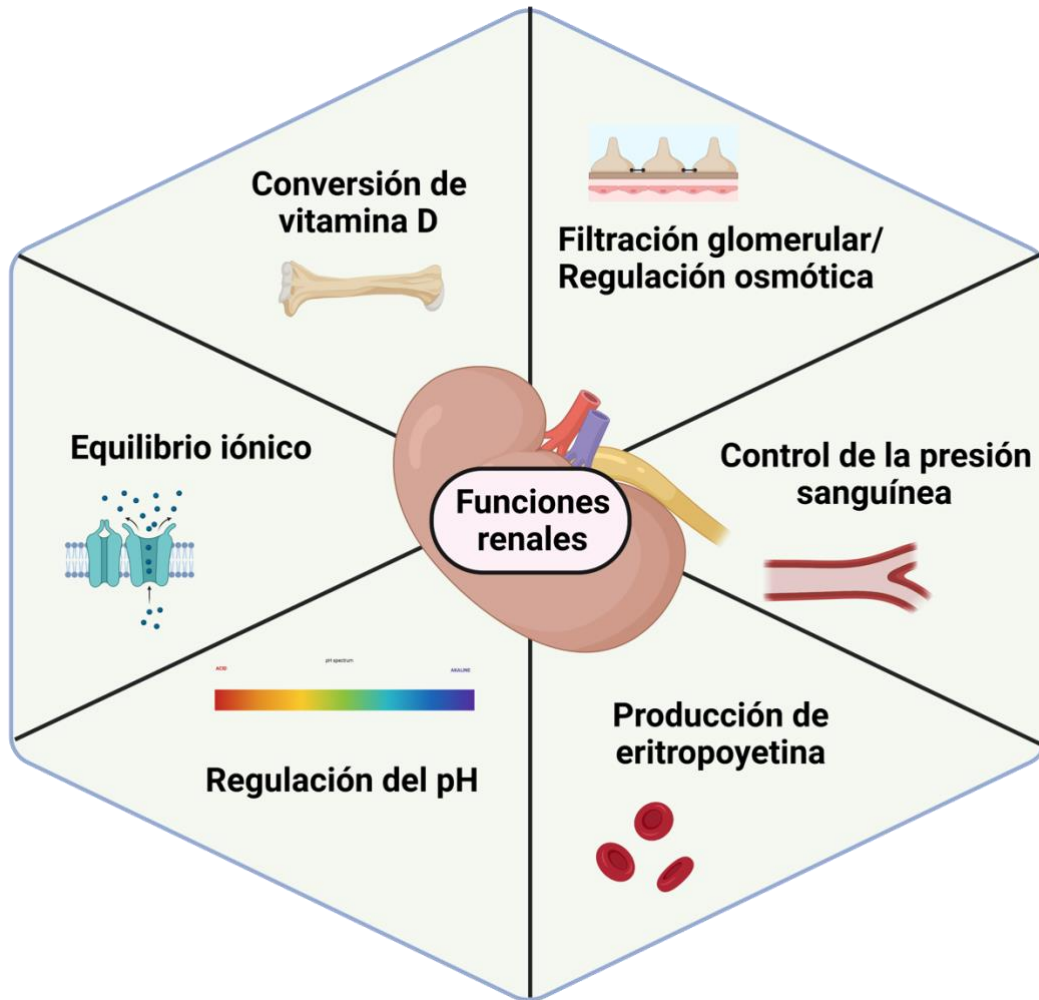


Figura 1. Funciones renales. Los riñones desempeñan diversas funciones que incluyen: 1) la filtración y absorción para mantener el equilibrio osmótico, 2) la regulación de la presión sanguínea por el sistema renina-angiotensina-aldosterona, 3) la regulación del equilibrio iónico a través de la reabsorción y excreción de iones, 4) la regulación del pH a través de la eliminación de H^+ o síntesis de HCO_3^- , 5) la producción de eritropoyetina, necesaria para la generación de eritrocitos y 5) la conversión de la vitamina D a su forma activa, la cual es necesaria para la absorción de Ca^{2+} a nivel intestinal. Figura creada con Biorender.

- **Estructura renal**

Los riñones son órganos pares capsulados ubicados en la región retroperitoneal, cada uno se encuentra ubicado a lado de la columna vertebral. Macroscópicamente, este órgano presenta dos regiones diferentes, una externa denominada corteza y

una interna denominada médula; en ambas regiones se distribuyen las nefronas, vasos sanguíneos, vasos linfáticos y la correspondiente inervación.

La corteza renal contiene a los glomérulos y una gran cantidad de túbulos contorneados.

Por su parte, la médula renal carece de glomérulos y contiene la mayor parte de túbulos correspondientes al asa de Henle y a los vasos sanguíneos denominados vasa recta. Macroscópicamente la médula se divide a su vez en segmentos denominados pirámides renales cuya base se origina en los bordes córtico-medulares y su punta corresponde a la papila. Las papilas desembocan en los cálices menores, que posteriormente convergen dando origen al cálix mayor, y a su vez a la pelvis renal.

La pelvis renal representa la región proximal del uréter, el cual es el medio de transporte de orina hacia la vejiga, órgano donde culmina la eliminación de ésta a través de la uretra (Figura 2).

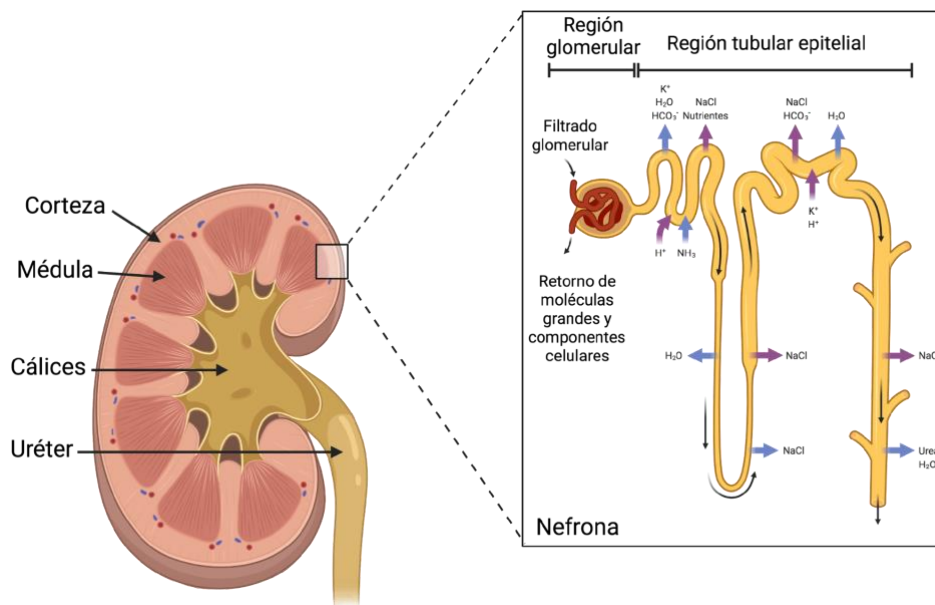


Figura 2. Estructura renal. En humanos, macroscópicamente el riñón se puede dividir en una región externa denominada corteza, y una región interna denominada médula. La formación de la orina ocurre en la nefrona, las cuales desechan el filtrado a través de los cálices menores, el conjunto de éstos forma a los cálices mayores que posteriormente desembocan en el uréter. Microscópicamente, la unidad funcional del riñón es la nefrona que se compone del glomérulo y del segmento tubular. En el glomérulo ocurre la primera filtración a través del endotelio capilar

fenestrado, permitiendo el paso de moléculas menores a 5 kDa, las moléculas de mayor tamaño y los componentes celulares retornan por la vía eferente. El filtrado pasa a la cápsula de Bowman, para posteriormente pasar al túbulo proximal, donde ocurre la reabsorción de iones y nutrientes; el filtrado continúa su paso al asa de Henle donde se reabsorben agua, Na^+ y Cl^- , posteriormente en el túbulo contorneado distal se reabsorbe Na^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} , mientras se elimina el K^+ . El túbulo colector produce los ajustes en la osmolaridad urinaria, la cual es mediada por la hormona antidiurética, en este segmento se reabsorbe NaCl y se secretan K^+ y H^+ . Figura creada con Biorender.

Como se mencionó, las nefronas son las unidades funcionales del riñón y son las responsables de la formación de la orina; éstas se encuentran distribuidas tanto en la corteza renal como en la médula renal, estimándose que cada riñón humano contiene aproximadamente 1.2 millones de nefronas (20).

Estructuralmente las nefronas pueden dividirse en la región vascular denominada glomérulo y en la región tubular epitelial (Figura 2).

El glomérulo es una red capilar alrededor de la cual se disponen los podocitos y las células mesangiales. El endotelio capilar es fenestrado, lo cual permite el paso de componentes sanguíneos acelulares de 70 a 100 nm. Este endotelio vascular está rodeado por una segunda capa de filtración, denominada membrana basal glomerular, la cual se compone de proteínas de la MEC como colágeno tipo IV, laminina, fibronectina y proteoglicano; estos componentes son producidos tanto por las células endoteliales como por los podocitos. Los podocitos, se encuentran localizados alrededor del endotelio capilar cubriéndolo con procesos membranosos denominados pedicelos y formando la parte visceral de la denominada cápsula de Bowman. Otro tipo celular encontrado adyacente al glomérulo, son las células mesangiales, las cuales forman una especie de tallo y su función contráctil permite regular la filtración a través del glomérulo. Cabe mencionar que la contractilidad de las células mesangiales es regulada por la mácula densa, un grupo de células epiteliales sensibles a los cambios osmóticos, estas células también son capaces de liberar renina, la cual a su vez regula la presión sanguínea a través de la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA).

El proceso de filtración comienza en el endotelio y es regulado por la contracción de las células mesangiales, posteriormente el filtrado pasa a la membrana basal

glomerular que sirve como un nuevo filtro para después depositarse en el espacio urinario de la cápsula de Bowman (20-22).

La cápsula de Bowman, es una cápsula que rodea al glomérulo, ésta tiene una cara visceral formada de podocitos; y una cara parietal que se compone de células epiteliales. El espacio entre la cara visceral y parietal de la cápsula de Bowman corresponde al espacio urinario, en el cual se deposita el filtrado proveniente del glomérulo para posteriormente pasar a la sección tubular de la nefrona (20).

La región tubular epitelial de la nefrona puede ser dividida en 4 diferentes segmentos: el túbulo proximal, el asa de Henle, el túbulo contorneado distal y el túbulo colector; cada uno de estos segmentos tiene funciones especializadas.

El túbulo proximal reabsorbe moléculas como glucosa, proteínas y aminoácidos que escapan al filtrado glomerular, adicionalmente también puede reabsorber agua y mantener el balance de electrolitos. Debido a la gran complejidad de funciones que se llevan a cabo en este segmento, las células requieren una gran cantidad de energía, por lo que contienen un gran número de mitocondrias.

El asa de Henle se encarga de reabsorber agua y mantener el balance de electrolitos, a diferencia del túbulo proximal, este segmento contiene pocas mitocondrias.

En el túbulo contorneado distal se reabsorbe Na^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} ; mientras que se elimina el K^+ , éste segmento también puede dar origen a la mácula densa.

El túbulo colector produce el ajuste en la osmolaridad urinaria, la cual es mediada por la hormona antidiurética (ADH). Este segmento se compone de dos tipos celulares: las células principales que reabsorben NaCl , secretan K^+ y contienen pocas mitocondrias; y las células intercaladas que se encargan de secretar H^+ y HCO_3^- , y que tienen una gran cantidad de mitocondrias (20).

Las nefronas pueden clasificarse como corticales y yuxtaglomerulares dependiendo de su localización y ciertas particularidades en su estructura.

Las nefronas corticales se caracterizan por disponer de su glomérulo en la parte más externa de la corteza renal, tener un asa de Henle corta que entra a la parte más externa de la médula renal, y tener una arteriola eferente que da origen a los capilares peritubulares. Los capilares peritubulares sirven para proveer de oxígeno

y nutrientes a los diferentes segmentos de la nefrona, además de liberar sustancias de la circulación para su secreción y servir de vía para la reabsorción de agua y solutos.

En humanos, además, se sabe de la existencia de nefronas corticales cuya asa de Henle nunca entra en la médula renal.

Por su parte, las nefronas yuxtamedulares también disponen de su glomérulo en la corteza renal; sin embargo, éste se encuentra en la región adyacente a la médula renal. En este tipo de nefronas el asa de Henle es más larga y se extiende a lo largo de toda la médula renal y su arteriola aferente da origen a los capilares peritubulares y a la vasa recta (20).

- **Filtración y equilibrio osmótico**

La filtración glomerular es el primer paso para la formación de la orina, ésta permite la filtración de solutos (urea, creatinina, electrolitos) y agua; pero previene la pérdida de componentes como células circulantes y proteínas plasmáticas. Una vez que la sangre entra al glomérulo se someterá a filtración por tres barreras: 1) el endotelio capilar fenestrado, 2) la membrana basal glomerular y 3) la barrera de los podocitos. El endotelio fenestrado permite el paso libre de sustancias de hasta 100 nm, esto excluye a las células sanguíneas circulantes (eritrocitos y leucocitos), y a las proteínas plasmáticas de alto peso molecular, las cuales regresan al flujo sanguíneo a través de la arteriola eferente.

La membrana basal glomerular representa la principal barrera para la filtración de macromoléculas y está compuesta de proteínas fibrosas como colágeno, fibrina y laminina, las cuales funcionan como un tipo de red.

La tercera capa se compone de células epiteliales especializadas denominadas podocitos, los cuales recubren la capa del endotelio y sintetizan la membrana basal. Es importante recalcar que en las tres capas predominan las cargas negativas, por lo que las moléculas de cierto tamaño y con carga negativa no logran atravesar. El glomérulo contiene un tipo celular adicional, las células mesangiales, las cuales además de soportar las estructuras capilares tienen capacidades contráctiles que permiten modular la filtración al modificar la superficie de contacto del fluido;

mecanismo que depende principalmente de la angiotensina II. El filtrado glomerular entra al espacio urinario de la cápsula de Bowman para posteriormente circular hacia el túbulo proximal donde ocurre la reabsorción (23).

El túbulo proximal se compone de células epiteliales con bordes en cepillo, lo que les permite tener una mayor área de superficie para la reabsorción. Una característica importante de las células epiteliales es la gran cantidad de mitocondrias que contienen para suplir la alta demanda energética. En condiciones normales, el túbulo proximal reabsorbe todos los aminoácidos y la glucosa, así como aproximadamente el 65% de Na^+ por transporte activo y el agua por ósmosis, también reabsorbe sustancias liposolubles por difusión pasiva. Además de la función de reabsorción, en el túbulo proximal se convierte la vitamina D en su forma activa (19, 24).

Los componentes no reabsorbidos pasan al asa de Henle, donde la rama descendente reabsorbe agua por ósmosis debido a la abundancia de acuaporinas; por su parte, en la rama ascendente del asa de Henle no hay reabsorción de agua, pero se reabsorbe Na^+ , K^+ y Cl^- por transporte activo mediado por simportadores; mientras que el Ca^{2+} y Mg^{2+} son reabsorbidos por difusión pasiva (19, 24).

El siguiente segmento tubular que recibe el filtrado proveniente del asa de Henle para la reabsorción de solutos es el túbulo contorneado distal, en este segmento ocurre nuevamente la reabsorción de Na^+ y Cl^- ; esta región es susceptible de control hormonal por la aldosterona y la hormona paratiroidea. Debido a sus funciones, este segmento, al igual que el túbulo proximal, contiene una gran cantidad de mitocondrias (25).

El último segmento de la nefrona corresponde al túbulo colector, segmento en el que ocurre la reabsorción de Na^+ y Ca^{2+} . Los túbulos colectores desembocan en los cálices menores, los cuales convergen para dar origen a los cálices mayores, que posteriormente desembocan en el uréter, el cual conduce la orina a la vejiga urinaria.

El volumen de orina producida por los riñones (diuresis), y en consecuencia la regulación del equilibrio hídrico para evitar la deshidratación o la generación de edema; se regula principalmente por la ADH y por el sistema multiplicador

contracorriente, que se compone de una bomba Na^+/K^+ y del co-transportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ (26).

- **Equilibrio iónico**

Los electrolitos son esenciales para la mayoría de las funciones celulares, tales como la generación y conducción de los potenciales de acción. Dentro de éstos, el Na^+ , K^+ , Cl^- , Mg^{2+} , Ca^{2+} , PO_3^- y HCO_3^- son reabsorbidos o excretados durante la filtración renal para mantener su equilibrio. El desbalance de estos elementos puede llevar al desarrollo de patologías como el hiperparatiroidismo secundario; enfermedad derivada del desbalance de Ca^{2+} y PO_3^- (27).

- **Regulación de la presión sanguínea**

De la mano de la regulación osmótica, el riñón contribuye en la regulación de la presión sanguínea a través del SRAA.

El aparato yuxtglomerular es el responsable de la liberación de renina; este aparato se conforma de la mácula densa (células epiteliales especializadas), células mesangiales extraglomerulares y de células granulares.

El SRAA comienza con la renina, enzima cuya función es convertir al angiotensinógeno en angiotensina I, la cual a su vez puede convertirse en angiotensina II por acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA). La angiotensina II induce la síntesis y liberación de aldosterona, la cual promueve la reabsorción de Na^+ e incrementa la secreción de vasopresina para regular negativamente la diuresis e inducir vasoconstricción periférica (28).

Un mecanismo de regulación negativo de la presión sanguínea es a través del péptido natriurético auricular que es sintetizado en el corazón. Éste incrementa la excreción de Na^+ en orina, disminuye la producción de aldosterona, disminuye la liberación de renina y por lo tanto limita la función del sistema SRAA (20).

- **Equilibrio del pH**

La regulación del pH del líquido intracelular y extracelular se regula principalmente por los sistemas de amortiguamiento $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ a nivel pulmonar y renal.

Los riñones regulan los niveles sistémicos de HCO_3^- mediante su reabsorción, o bien produciéndolo *de novo*.

La reabsorción de HCO_3^- ocurre principalmente en el túbulo proximal, comenzando con el intercambio de H^+ hacia el lumen y la entrada de Na^+ a la célula a través de la isoforma 3 del intercambiador de Na^+/H^+ (NHE3). El H^+ reacciona con el HCO_3^- luminal para dar lugar a CO_2 y H_2O , los cuales son sustratos de la anhidrasa carbónica, la cual puede encontrarse tanto en la membrana plasmática como en el citosol para originar un nuevo HCO_3^- a nivel intracelular, el cual será reabsorbido junto con el Na^+ a través del cotransportador de $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ también llamado acarreador de solutos miembro 4 de la familia 4 (SLC4A4).

La generación *de novo* involucra el metabolismo de glutamina para generar como subproductos H^+ y NH_4^+ para su excreción (29).

- **Producción de eritropoyetina**

La eritropoyetina es una hormona producida por los fibroblastos intersticiales peritubulares de la corteza renal, aunque otros órganos como el bazo, la médula ósea, el hígado y el pulmón también pueden producir esta hormona. La síntesis de esta hormona a nivel renal es estimulada por bajas concentraciones de oxígeno en la corteza renal (30).

La función principal de la eritropoyetina es inducir la eritropoyesis a nivel de médula ósea, adicionalmente se han informado otras funciones de esta hormona, como tener propiedades neuroprotectoras, regular el tono vascular, participar en la reparación de músculo, remodelación ósea y proteger de la inflamación asociada a la obesidad (31).

- **Conversión de vitamina D**

El Ca^{2+} participa en diversas funciones como la contracción muscular, la transmisión de impulsos nerviosos, la coagulación y la mineralización ósea. La dieta es la principal fuente de Ca^{2+} , y su absorción en el intestino depende de la forma activa de la vitamina D. Como previamente se mencionó, la vitamina D es convertida a su forma activa en el riñón. El colecalciferol D3 se obtiene de la dieta o por síntesis en

la piel, mientras que el ergocalciferol D2 se obtiene de la dieta; ambas moléculas son convertidas a 25-hidroxi-vitamina D3 y 25-hidroxi-vitamina D2, respectivamente, por acción de la enzima 25-hidroxilasa en hígado; posteriormente ambas pueden ser convertidas a la forma activa de la vitamina D (también llamada $1\alpha,25$ -dihidroxi-vitamina D) por acción de la enzima $1-\alpha$ -hidroxilasa en riñón (32). Esta vitamina D activa en riñón se une a su receptor intracelular para promover la reabsorción de Ca^{2+} indirectamente al inducir la expresión de genes como el receptor de potencial transitorio (TRPV) 5 y 6 (que regulan la entrada de Ca^{2+} a la célula), calbindina D (la cual regula los niveles intracelulares de Ca^{2+}) y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) 1 (el cual promueve la reabsorción de Ca^{2+}). También, la vitamina D puede ser transportada al intestino vía circulatoria para ejercer su efecto en este tejido (33-35).

HOMEOSTASIS MITOCONDRIAL EN EL FUNCIONAMIENTO RENAL

- **Bioenergética mitocondrial en la función renal**

El riñón junto con el corazón, es uno de los órganos con mayor demanda energética en el organismo, por lo que es el segundo órgano con mayor contenido de mitocondrias y consumo de oxígeno (36, 37), esto proveerá de suficiente energía para la eliminación de productos de desecho, reabsorción de nutrientes, regulación en el balance de iones, mantenimiento del equilibrio del pH y regulación de la presión sanguínea (38). La sección tubular de la nefrona requiere principalmente del transporte activo, y por tanto de una alta demanda energética para reabsorber iones. En contraste está el glomérulo, cuya filtración depende del mantenimiento de la presión hidrostática, la cual es un proceso pasivo que no tiene tal demanda energética y por ello su contenido de mitocondrias es menor.

El túbulo proximal en particular tiene una mayor demanda energética debido a que en éste se reabsorbe el 80% del filtrado proveniente del glomérulo (principalmente glucosa, iones y otros nutrientes); por ello requiere de un gran número de mitocondrias. Debido a la demanda energética, las células del túbulo proximal, además de glucosa, utilizan preferentemente ácidos grasos para obtener energía, de hecho, una disfunción en el metabolismo de los ácidos grasos favorece la deposición de lípidos en gotas lipídicas en la célula tubulares, fenómeno que da

lugar a lipotoxicidad, la cual es un hallazgo común en la disfunción renal. La habilidad de las mitocondrias para detectar y responder a cambios en la disponibilidad de nutrientes y a la demanda energética para mantener su homeostasis es crítica para la función correcta del túbulo proximal principalmente, pero también para el resto del segmento tubular de la nefrona (38).

- **Estructura y funciones de la mitocondria**

Las mitocondrias son orgánulos membranosos semiautónomos que contienen su propio DNA que codifica para ciertos genes necesarios para su mantenimiento y función, aunque la gran mayoría de las proteínas necesarias para su estructura y función son codificadas a nivel nuclear. Estos orgánulos tienen morfología variada debido a los procesos constantes de dinámica que involucran la fusión y fisión para su adaptabilidad (39); aunque típicamente se les describe con morfología arriñonada, la cual corresponde a la encontrada en células como hepatocitos y fibroblastos; en el riñón su morfología es más bien alargada (40, 41).

Estructuralmente se conforman de una membrana interna que delimita la matriz mitocondrial y una membrana externa que separa a este orgánulo del medio intracelular. Ambas membranas están separadas por una región acuosa denominada espacio intermembranal (Figura 3).

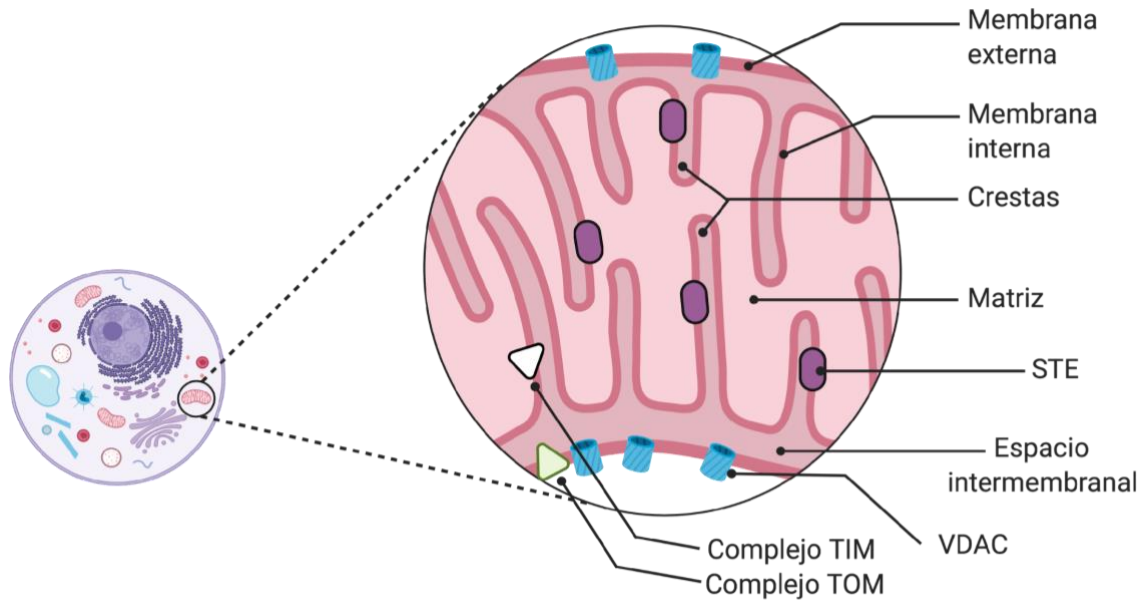


Figura 3. Estructura mitocondrial. La mitocondria es un *órganulo membranoso* que se compone de una membrana externa rica en proteínas, algunas de las cuáles funcionan como canales aniónicos dependientes de voltaje (VDAC) y otras como parte de los complejos de translocación de membrana externa (TOM). Por su parte la membrana interna contiene múltiples invaginaciones denominadas crestas, en las que se encuentran insertados la mayoría de los componentes del sistema de transporte de electrones (STE) y complejos de translocación de membrana interna (TIM). Entre las membranas interna y externa se encuentra el espacio intermembranal, y en la región más interna de la mitocondria se localiza la matriz mitocondrial. Figura creada con Biorender.

La membrana externa mitocondrial (MEM) delimita a la mitocondria y es la vía de intercambio de moléculas con el citoplasma, se compone de lípidos como fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, y se caracteriza por tener gran abundancia de canales aniónicos dependientes de voltaje (VDAC). Los VDAC permiten el libre paso de iones y moléculas de menos de 5 kDa, mientras que las moléculas más grandes pueden pasar a través de translocasas especializadas. Además de los VDAC, otros componentes importantes de la MEM incluyen a las proteínas de fusión y fisión, las proteínas de translocación, los transportadores de lípidos, etc (42, 43). El espacio intermembranal actúa como un nodo de transporte de moléculas entre el citoplasma y la matriz mitocondrial, en este sitio hay una alta concentración de H^+ y existen alrededor de 100 diferentes proteínas como el citocromo c, sirtuina 5, proteínas antioxidantes, entre otras (42, 43).

La membrana interna mitocondrial (MIM), es una membrana altamente selectiva, permeable sólo a moléculas sin carga y menores de 150 Da, otras moléculas requieren de transportadores especiales para poder atravesar. Al igual que la MEM, se compone de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, sin embargo, está enriquecida con cardiolipina. La estructura de la MIM contiene múltiples invaginaciones llamadas crestas mitocondriales, en las cuales se localizan los componentes del sistema de transporte de electrones (STE) (44).

La matriz mitocondrial, delimitada por la MIM, es una región rica en enzimas involucradas en diversas vías metabólicas, como el ciclo de Krebs y el metabolismo de lípidos, además de contener el DNA mitocondrial (mtDNA) (42, 45).

Aunque el papel predominante de la mitocondria es la generación de adenosín trifosfato (ATP), este orgánulo también participa en la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO), en la regulación de la apoptosis, en la respuesta al estrés de retículo endoplásmico y en la regulación de Ca^{2+} , entre otras (45). Para lo anterior se requiere una estricta regulación de la homeostasis mitocondrial, lo cual involucra los procesos de biogénesis y mitofagia.

- **Biogénesis mitocondrial**

Al ser orgánulos dinámicos, la generación de nuevas mitocondrias y la remoción de mitocondrias dañadas es un proceso activo altamente regulado para mantener la homeostasis mitocondrial y, por lo tanto, la homeostasis celular; de esta forma, estos orgánulos se recambian constantemente, generando nuevas mitocondrias (biogénesis) o eliminando las dañadas (mitofagia) (Figura 4). La biogénesis mitocondrial ocurre en respuesta a un aumento en la demanda energética principalmente; éstas al no poder ser generadas *de novo*, se originan a partir de otras preexistentes. Este proceso implica la replicación del mtDNA y la transcripción de genes codificados tanto por éste como por el DNA nuclear (46).

La vía de biogénesis mitocondrial es iniciada por el coactivador 1 alfa del receptor activado por el proliferador de peroxisomas (PGC-1 α), el cual es modulado por procesos de fosforilación y de desacetilación. Este factor estimula la expresión de

los factores nucleares respiratorios (NRF) 1 y 2, y del receptor relacionado a estrógenos (ERR); los cuales son factores transcripcionales que a su vez estimulan la expresión del factor transcripcional A mitocondrial (TFAM), que funciona como efector de la replicación del mtDNA (47). Durante este proceso, la mitocondria utiliza su propia DNA polimerasa, la DNA polimerasa γ (POL γ), y también utiliza la maquinaria nuclear para la transcripción de genes codificantes para proteínas mitocondriales (48). Los transcritos de éstas se traducen con un péptido señal que les permitirá dirigirse a la mitocondria y ser importados a través de los complejos de translocación de la membrana interna (TIM) y de translocación de la membrana externa (TOM) (49). Estos procesos son controlados en gran medida por la proteína cinasa activada por AMP (AMPK), el blanco de rapamicina en mamíferos (mTOR) y la señalización parecida a insulina (ILS), así como las cascadas de señalización impulsadas por Ca²⁺ y óxido nítrico (47).

- **Mitofagia**

Se sabe que las proteínas homólogas a tensina y fosfatasa presentes en el cromosoma 10 (PTEN) regulan diversas funciones mitocondriales, como la producción de ATP (50) y la mitofagia (51). La mitofagia se define como la eliminación selectiva de mitocondrias a causa de daño, envejecimiento o exceso de éstas. Las proteínas Parkin y la cinasa 1 inducida por PTEN (PINK1) están involucradas en la inducción del tipo de mitofagia más conocida. PINK1 se estabiliza en la MEM en respuesta al daño mitocondrial, esto induce el reclutamiento de Parkin, la cual ubiquitina diversas proteínas de la MEM resultando en la fragmentación de la mitocondria dañada. Los fragmentos mitocondriales son reconocidos por la proteína asociada a los microtúbulos 1A/1B-cadena ligera 3 (LC3) para generar un autofagosoma en el que se degradan los fragmentos de las mitocondrias dañadas (52).

Bajo condiciones no estresantes PINK1 es importado a la MIM por los complejos TOM/TIM, donde sufre cortes proteolíticos por las peptidasas mitocondriales de procesamiento (MPP) y por la proteína romboide asociada a presenilina (PARL)

para posteriormente liberarse al citosol y ser degradado por el proteasoma; cabe resaltar que este proceso es dependiente del potencial de membrana.

Al estar dañadas las mitocondrias, la pérdida del potencial de membrana interrumpe el transporte de PINK1 a través de la membrana mitocondrial, generando su acumulación (sin el corte proteolítico) en la MEM. La acumulación de PINK1 es estabilizada por la proteína prohibitina 2 (PHB2), para permitir la fosforilación y reclutamiento de Parkin, la cual ubiquitina a diferentes sustratos de la MME como VDAC, mitofusinas 1 y 2, Miro1, etc. La ubiquitinación de las proteínas de MEM permite la unión de proteínas como P62, optineurina y NDP52; las cuales al tener un dominio de interacción con LC3 (LIR), permiten la unión de LC3 que se encuentra en el autofagosoma en formación (53-55).

Recientemente se han descrito otras vías de mitofagia independientes a PINK1 y Parkin que involucran la activación de otras moléculas como la ubiquitin ligasa E2 mitocondrial (MUL1), la proteína homóloga a ariadna 1 (ARIH1), la proteína de interacción parecida a BCL2/adenovirus E1B 19 kDa (BNIP3L), el factor 2 asociado al receptor de TNF (TRAF2) y la proteína 1 que contiene el dominio FUN14 (FUNDC1); incluso se ha reportado una vía en la que la exposición de cardiolipina en la superficie mitocondrial y que usualmente se encuentra en la MIM, se une directamente a LC3 para inducir el proceso de mitofagia (53-57).

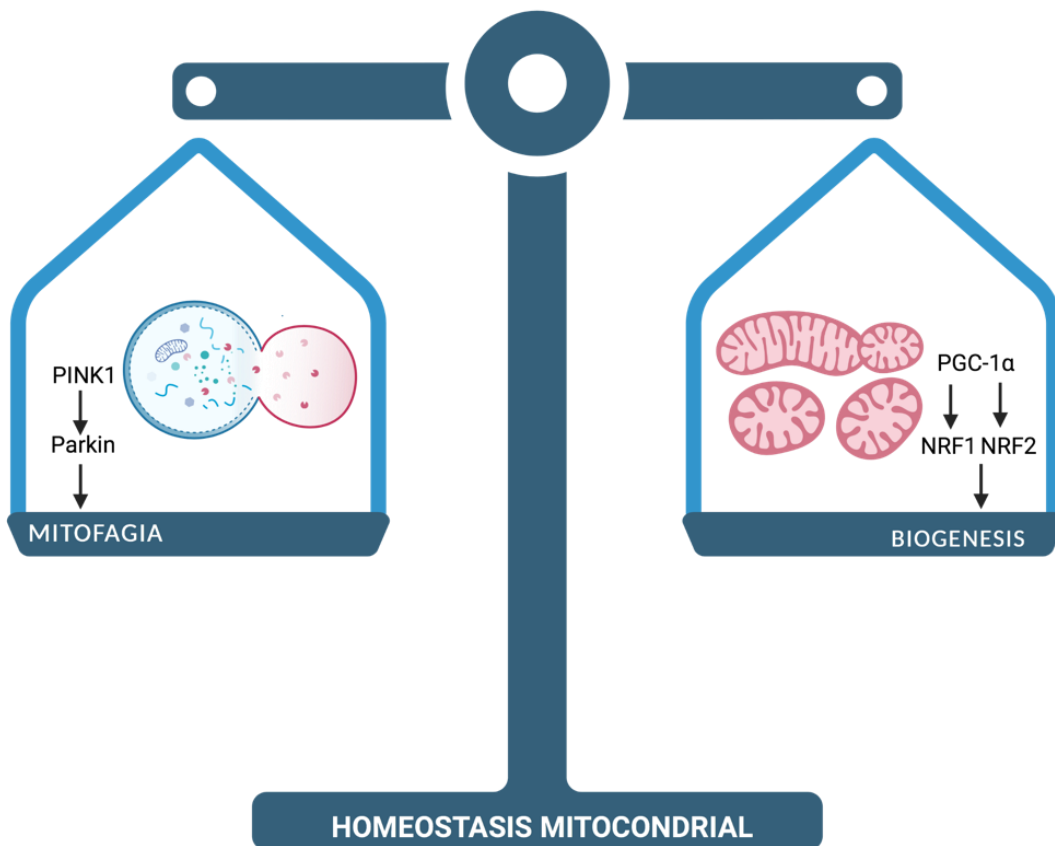


Figura 4. Homeostasis mitocondrial. La homeostasis mitocondrial se mantiene con el recambio de mitocondrias dañadas por el proceso de mitofagia en balance con la generación de nuevas mitocondrias por el proceso de biogénesis. La forma más común de mitofagia depende de la activación de la proteína cinasa 1 inducida por PTEN (PINK1) y Parkin, por su parte la biogénesis es dirigida por la activación de factores transcripcionales como el coactivador 1 alfa del receptor activado por el proliferador de peroxisomas (PGC-1 α), y los factores nucleares respiratorios (NRF) 1 y 2. Figura creada en Biorender.


ERC

La ERC es un síndrome caracterizado por la presencia de alteraciones estructurales y/o funcionales de manera persistente (en humanos más de 3 meses) en el riñón. El origen que desencadena esta patología puede ser diverso, desde enfermedades congénitas, tumores, enfermedades adquiridas como la diabetes tipo II, hipertensión, entre otras (1, 58).

Clínicamente esta patología se puede detectar por la disminución en la eTFG (lo cual refleja la pérdida de nefronas), presencia de albúmina en orina (lo cual indica disfunción de la barrera renal), y otras alteraciones como aumento de creatinina, cistanina C y urea en sangre (59).

Dependiendo del grado de severidad dado por la disminución en la eTFG o la concentración de albúmina en orina, la ERC puede clasificarse en diversos grados (2) tal como se describe en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de la enfermedad renal crónica (ERC)

CLASIFICACIÓN DE LA ERC		Cociente albúmina/creatinina en orina		
		A1	A2	A3
 <p>Riesgo de desarrollar enfermedad renal terminal</p>		Normal a ligeramente incrementado <30 mg/g <3 mg/mmol	Moderadamente incrementado 30-300 mg/g 3-30mg/mmol	Severamente incrementado >300mg/g >30mg/mmol
eTFG (ml/min/1.73 m ²)	G1	>90	>90	>90
	G2	60-89	60-89	60-89
	G3a	45-59	45-59	45-59
	G3b	30-44	30-44	30-44
	G4	15-29	15-29	15-29
	G5	<15	<15	<15

Tomado y modificado de Romagnani et al. (59) .eTFG, tasa de filtración glomerular estimada. El riesgo de desarrollo de enfermedad renal terminal se realiza con la combinación de la eTGF y el cociente albúmina/creatinina el cual puede identificarse con la escala de colores.

La manifestación patológica común de la ERC independiente de la causa que la haya originado, es el desarrollo de fibrosis, causando la pérdida de la función renal y conduciendo a alteraciones clínicas como la anemia, desnutrición, alteraciones hidro-electrolíticas y de equilibrio ácido base, osteodistrofia renal y enfermedades cardiovasculares (59).

Debido a que la fibrosis es en general un proceso irreversible, la función de los órganos que la desarrollan queda comprometida debido a las modificaciones celulares, metabólicas y moleculares que ocurren (60). La prevalencia de ERC en México se estima que es de 12 a 16%, y la terapia de reemplazo (diálisis, hemodiálisis o trasplante renal) se ha reportado que es aplicada en más de una persona por cada 1,000 habitantes (61), de ahí la importancia de estudiar esta patología tanto en los pacientes como en modelos experimentales.

OBSTRUCCIÓN UNILATERAL DEL URÉTER (OUU) COMO MODELO

El desarrollo de modelos animales de fibrosis renal representa una valiosa herramienta para entender los mecanismos moleculares y celulares involucrados en durante este proceso patológico. En este sentido, la OUU en roedores es uno de los modelos animales más utilizados para estudiar el daño renal crónico. Este modelo, al ser progresivo, puede replicar los procesos de daño tubular, inflamación intersticial y finalmente el desarrollo de fibrosis, es por ello que ha funcionado como modelo de daño renal agudo que progresa a daño renal crónico de una manera acelerada (62).

La OUU simula en gran medida a la ERC derivada de la nefropatía obstructiva en humanos; la cual puede presentarse en infantes por falta de desarrollo del uréter, generando estenosis parcial o total de éste (62, 63). También puede presentarse en adultos derivado de la presencia de litos renales y neoplasias (64, 65).

La obstrucción del uréter genera una rápida secuencia de eventos en las primeras 24 h, tales como reducción del flujo sanguíneo, inducción de hipoxia, disminución del filtrado glomerular, inflamación intersticial y dilatación tubular. Posteriormente, en los primeros 7 días se logra observar atrofia tubular y fibrosis (66).

MECANISMOS CELULARES DE LA FIBROSIS

La fibrosis se define como la formación y deposición excesiva de MEC en respuesta a algún daño, afectando la arquitectura normal del tejido y conllevando a su disfunción.

Fisiológicamente los mecanismos que llevan a la fibrosis se disparan en respuesta al daño con la finalidad de reparar el tejido, sin embargo, si dicha reparación y

recuperación no es exitosa, o bien, el estímulo dañino persiste, las células residentes son reemplazadas por miofibroblastos en un fenómeno conocido como transición epitelio-mesenquimal (TEM), los cuales a su vez sintetizan componentes de la MEC, como colágeno y fibronectina (67, 68).

En el riñón, dependiendo del área y tipo celular afectados, la fibrosis puede denominarse como glomerulosclerosis, fibrosis intersticial, arteriosclerosis y fibrosis perivascular, aunque la mayoría de las veces se encuentran en combinación más que de manera aislada.

La glomerulosclerosis involucra el desprendimiento de los podocitos de la membrana basal, esto provoca que las células endoteliales asociadas a los podocitos sufran daño mecánico y estrés por la falta de factores angiogénicos producidos por los podocitos. En el caso de las células parietales epiteliales, las cuales delimitan la cápsula de Bowman, posiblemente se activan por factores liberados por el daño a podocitos y en respuesta éstos comienzan a producir MEC para formar puentes intercelulares. Este tipo celular comienza a proliferar y a adquirir marcadores mesenquimales, adicionalmente, las células mesangiales son una de las principales que producen componentes de la MEC tras activarse. Otra característica de la glomerulosclerosis es el adelgazamiento de la membrana basal. La fibrosis intersticial es la deposición excesiva de MEC entre los túbulos y los capilares peritubulares; las células responsables de la producción de MEC son las células epiteliales tubulares y los fibroblastos que se diferencian a miofibroblastos, este proceso se potencia por los leucocitos infiltrantes que promueven la activación de los miofibroblastos además de contribuir con la secreción del factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β), el cual es considerado como el factor maestro de la fibrosis.

La arteriosclerosis y fibrosis perivascular hacen referencia a los cambios que ocurren en los vasos sanguíneos, los cuales incluyen su dilatación y tortuosidad, así como cambios en sus membranas basales que incluyen, adelgazamiento, cambio de composición y acumulación de varias capas (69).

MECANISMOS MOLECULARES DE LA FIBROSIS

Los estadios tempranos de la fibrosis se caracterizan por eventos inflamatorios complejos iniciados por el infiltrado de leucocitos al parénquima renal que incluyen monocitos, macrófagos, linfocitos T y células dendríticas, entre otras. Estas células secretan mediadores inflamatorios como interleucinas (IL-)1 β , IL-6, IL-13 y TGF- β , ésta última citocina es considerada como un regulador maestro en el desarrollo de la fibrosis, ya que uno de sus efectos más notables es el de inducir la expresión de proteínas de MEC.

El TGF- β puede ser secretado por diferentes tipos celulares como plaquetas, monocitos, macrófagos, linfocitos T, células epiteliales y fibroblastos, o bien puede estar anclado de manera inactiva en la MEC.

Una vez secretado o escindido se une al receptor II de TGF- β (TGF β RII), el cual se dimeriza con el receptor I de TGF- β (TGF β RI) para su transfosforilación. Esto desencadena la fosforilación de las proteínas SMAD2/3 y permite su unión a SMAD4, lo que permite su translocación al núcleo para inducir la transcripción de genes profibróticos, a esta vía de señalización del TGF- β se le denomina canónica (70).

Además, TGF- β puede activar de manera no canónica otras vías como las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), la proteína cinasa regulada por señales extracelulares (ERK) y la cinasa Janus 2/transductor de señal y activador de la transcripción 3 (JAK2/STAT3) las cuáles promueven también la síntesis de MEC y la TEM (71, 72).

Algunos de los blancos tanto para las SMAD2/3 y 4 como para STAT3, son genes pro-fibróticos que incluyen a los que codifican al colágeno tipo I y III, a la actina alfa de músculo liso (α -SMA), a la fibronectina, a el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), a la proteína específica de fibroblastos 1 (FSP-1), entre otros (73).

ALTERACIONES MITOCONDRIALES EN LA ERC

Como previamente se mencionó, debido a la alta demanda energética renal, la disfunción de este órgano se ha relacionado con alteraciones mitocondriales, principalmente las asociadas a la producción de ERO y la apoptosis intrínseca.

Durante la ERC, una característica común es el estrés oxidante, el cual puede ser derivado de un incremento en la producción de ERO mitocondriales y una disminución de los sistemas antioxidantes (74). Dichas ERO pueden ser derivadas del STE, del ciclo del ácido tricarboxílico y de las nicotinamida adenín dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasas (NOX) (75). Por otra parte, la producción excesiva de ERO puede llevar a la muerte celular por la vía de la apoptosis intrínseca, proceso regulado por la liberación del citocromo c de la mitocondria (76).

Adicionalmente, otras alteraciones observadas en modelos experimentales de ERC inducida por diabetes es el incremento en la fragmentación de mitocondrias mediada por la proteína 1 relacionada a dinamina (Drp1) (77-79). De igual forma en este modelo se ha observado la disminución del factor transcripcional PGC-1 α , sugiriendo una disminución en la biogénesis mitocondrial y/o en el metabolismo de lípidos (80-82).

ALTERACIONES MITOCONDRIALES EN LA OUU

En el modelo de OUU en roedores, se han descrito diversas alteraciones mitocondriales en diferentes puntos temporales del desarrollo de la enfermedad.

Mediante espectrometría de masas por imagen, en la OUU en ratas, se observó la reducción de AMP, ADP y metabolitos del ciclo del ácido cítrico al primer y tercer día de obstrucción del uréter, sugiriendo alteraciones en la función mitocondrial (17).

En cuanto al estrés oxidante, éste parece estar presente desde las primeras horas y parece ser resultado de la activación de NOX4 y la desregulación de los sistemas antioxidantes (83, 84). Adicionalmente se han descrito alteraciones en la dinámica y en la masa mitocondrial. En la OUU en ratones, al día 5 de obstrucción del uréter se observó un incremento en los niveles de la proteína mitocondrial de fisión 1 (Fis1) y disminución de la proteína de atrofia óptica 1 (OPA1), sugiriendo un desbalance en la dinámica mitocondrial que presenta una mayor tasa de fisión y una menor tasa de fusión (85).

La homeostasis mitocondrial se ha explorado poco en este modelo, aunque se ha observado disminución de PGC-1 α al séptimo día de obstrucción en ratones (86) e incremento en PINK1 como marcador de autofagia al día 7 de obstrucción en ratones (18).

Sin embargo, todos estos estudios identifican dichas alteraciones mitocondriales cuando el daño ya está establecido, o bien, en un punto específico temporal de la obstrucción (9). De ahí la importancia de caracterizar el curso temporal de las alteraciones mitocondriales durante el daño renal.

JUSTIFICACIÓN

La ERC representa un importante problema a nivel mundial. Las terapias están dirigidas principalmente a disminuir las alteraciones asociadas a ésta (desequilibrio hidro-electrolítico, anemia, alteraciones en niveles de Ca^{2+} , etc.), más que a su resolución, debido principalmente a los cambios irreversibles provocados por el desarrollo de la fibrosis. De ahí que entender a profundidad la fisiopatología de esta enfermedad es de gran relevancia. Si bien se han caracterizado una gran variedad de alteraciones que incluyen cambios hemodinámicos, respuesta inflamatoria, estrés oxidante, entre otras; poco se ha descrito sobre las modificaciones que se presentan a nivel subcelular. Además, éstas se han descrito en un tiempo determinado de la enfermedad, desconociéndose cómo van evolucionando a lo largo de la progresión de ésta.

Debido a esto, entender las alteraciones mitocondriales a lo largo del desarrollo de la fibrosis inducida por la OUU es fundamental para tener un escenario más completo y conocer más acerca de las posibles implicaciones de este orgánulo en el desarrollo de la patología renal.

HIPÓTESIS

Durante el daño renal inducido por la OUU en ratas, existen alteraciones tempranas y progresivas en la homeostasis mitocondrial previas al establecimiento de la fibrosis renal.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar en un curso temporal las alteraciones de la homeostasis mitocondrial en el desarrollo de la fibrosis renal en ratas, inducida por la OUU.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Validar el desarrollo de la inflamación y fibrosis renal inducida por la OUU utilizando como marcadores IL-6, TNF- α , TGF- β , colágeno tipo IV y α -SMA.

- Determinar los cambios estructurales en riñón inducidos por la OUU mediante histología.
- Determinar la función mitocondrial mediante histoquímica enzimática.
- Evaluar los cambios temporales en la masa mitocondrial en el modelo de OUU utilizando los marcadores moleculares VDAC y ANT.
- Determinar los cambios temporales en la biogénesis mitocondrial utilizando los marcadores moleculares PGC-1 α , NRF1, NRF2 y TFAM.
- Evaluar los cambios estructurales en las mitocondrias inducidos por la OUU mediante microscopía.
- Evaluar los cambios temporales de los marcadores de autofagia (LC3, beclina 1, Bcl-2 y P62) y mitofagia (Drp1, PINK1, Parkin).

MATERIALES Y MÉTODOS

El protocolo experimental utilizado en el presente trabajo fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México con número de registro FQ/CICUAL/260/18. Este protocolo se realizó de acuerdo a las normas oficiales mexicanas NOM-062-ZOO-1999 y NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 correspondientes a la producción, uso y cuidado de animales de laboratorio y a la disposición de residuos peligrosos respectivamente.

- **Modelo de OUU**

Se utilizaron un total de 40 ratas Wistar con un peso de 250 a 300 g, las cuales se dividieron en 2 grupos: 1) ratas con obstrucción del uréter izquierdo y 2) ratas *sham*, en el que la cirugía se simuló. El grupo de las ratas con obstrucción del uréter a su vez fue subdividido en grupos correspondientes a 7, 14, 21 y 28 días de obstrucción (n=4 por cada tiempo).

Los animales se sometieron a anestesia inhalada con isoflurano, se rasuró el área abdominal y se procedió a la asepsia y antisepsia. Para realizar el procedimiento quirúrgico, los animales se colocaron sobre una tablilla termorregulable para mantener su temperatura corporal, adicionalmente se utilizó un microscopio estereoscópico para visualizar el campo quirúrgico.

Una vez anestesiado el animal, se realizó una incisión de aproximadamente 2.5 cm de largo por debajo del área umbilical sobre la línea media. Una vez accediendo a la cavidad peritoneal se localizaron los intestinos y se retrajeron lateralmente hasta ubicar el riñón izquierdo y su uréter correspondiente para disecarlo. La OUU se realizó colocando una doble ligadura en el uréter izquierdo de 1.5 a 2 cm por debajo del riñón utilizando una sutura de seda 3-0. Para el caso del grupo de animales *sham* se accedió a la cavidad abdominal, se localizó y disecó el uréter izquierdo sin colocar ligaduras.

Una vez terminado el procedimiento quirúrgico se procedió a suturar por planos para cerrar la cavidad abdominal y la piel. Los animales se mantuvieron en observación hasta su recuperación y posteriormente fueron transportados al bioterio donde permanecieron bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y ciclos de luz:oscuridad 12:12 h, con agua y alimento *ad libitum*. Posterior a cada tiempo de obstrucción del uréter, se realizó la eutanasia de los animales utilizando pentobarbital sódico (120 mg/kg, intraperitoneal). Se obtuvieron las muestras de corteza renal del riñón obstruido y del riñón contralateral, y se mantuvieron en el amortiguador correspondiente para cada ensayo. De igual forma, del grupo de ratas *sham*, se obtuvo la corteza renal del riñón izquierdo al día 14 posterior a la simulación de la cirugía.

- **Histología renal**

Para la evaluación de los cambios histológicos, se realizaron cortes longitudinales de cada riñón y se fijaron por inmersión en 2-metil butano frío (enfriado con nitrógeno líquido), inmediatamente después se cubrieron con una solución crioprotectora Tissue-Tek® y se montaron en un portamuestras para ser procesados en el criostato. Se realizaron cortes de 20 µm en el criostato (CM-1520; Leica Microsystems, Nussloch, Alemania) a -20°C y se almacenaron a -70°C para su posterior tinción.

Para evaluar los cambios estructurales se utilizó la tinción de hematoxilina y eosina (H&E); para ello, los cortes correspondientes se colocaron en una solución de hemateína (0.1% de hematoximina, 5% de sulfato de amonio-hierro y 2% de yodato de sodio) por 10 min y posteriormente se lavaron con agua destilada para después colocarlos en una solución de eosina (0.25% de eosina y 0.5% de ácido acético glacial en etanol al 80%) por 5 min. Se realizaron lavados para quitar el excedente de colorante; posteriormente se deshidrató la muestra secuencialmente con etanol a diferentes concentraciones, comenzando con etanol al 70%, después al 96% y finalmente con etanol absoluto dos veces. El tejido se aclaró en un baño de solución de xilol-etanol (1:1) seguido de 3 baños de xileno. Posteriormente se montó en un portaobjetos utilizando la resina sintética Entellan®.

Para evaluar la deposición de MEC se utilizó la tinción de ácido periódico (PAS), para ello el tejido se colocó en solución fijadora de Carnoy (60% etanol absoluto, 30% cloroformo y 10% ácido acético glacial) por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó con agua destilada y se incubó con ácido periódico (0.5 g de ácido periodico en 100mL de agua destilada) por 10 min. Se lavó con agua destilada para después colocar el tejido en el reactivo de Schiff por 30 min a temperatura ambiente. Se realizaron lavados con agua destilada para quitar el excedente de colorante; posteriormente se deshidrató la muestra secuencialmente con etanol a diferentes concentraciones, comenzando con etanol al 70%, después al 96% y finalmente con etanol absoluto dos veces. El tejido se aclaró en un baño de solución de xilol-etanol (1:1) seguido de 3 baños de xileno.

Las fotomicrografías fueron tomadas y analizadas usando el equipo Cytation 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader, asociado al software Gen 5TM (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)

- **Histoquímica enzimática**

Utilizando los cortes procesados en el criostato obtenidos como se mencionó previamente, se evaluaron las actividades de los complejos I y IV.

Para evaluar la actividad del complejo I se utilizó el ensayo de nicotinamida adenín dinucleótido deshidrogenasa (NADH)-tetrazolio reductasa (NADH-TR), para ello se

incubó la muestra en solución de NADH-TR (1mg/mL de azul de tetrazolio y 1.5 mg/mL de NADH en solución amortiguadora de fosfatos 0.2 M a pH 7.4) por 30 min at 37°C. Posteriormente se lavó y se montó en un portaobjetos utilizando un medio de montaje basado en glicerol-gelatina.

Para evaluar la actividad del complejo IV se utilizó el ensayo de citocromo c oxidasa (COX) en el que se incubó la muestra en solución de COX de trabajo (1mg/mL de citocoromo c y 1mg/mL de diaminobenzidina en solución amortiguadora de fosfatos 0.2M a pH 7.4) por 4 h a 37°C. Posteriormente se lavó y se montó en un portaobjetos utilizando un medio de montaje basado en glicerol-gelatina.

Las fotomicrografías fueron tomadas y analizadas usando el equipo Cytation 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader, asociado al software Gen 5™ (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)

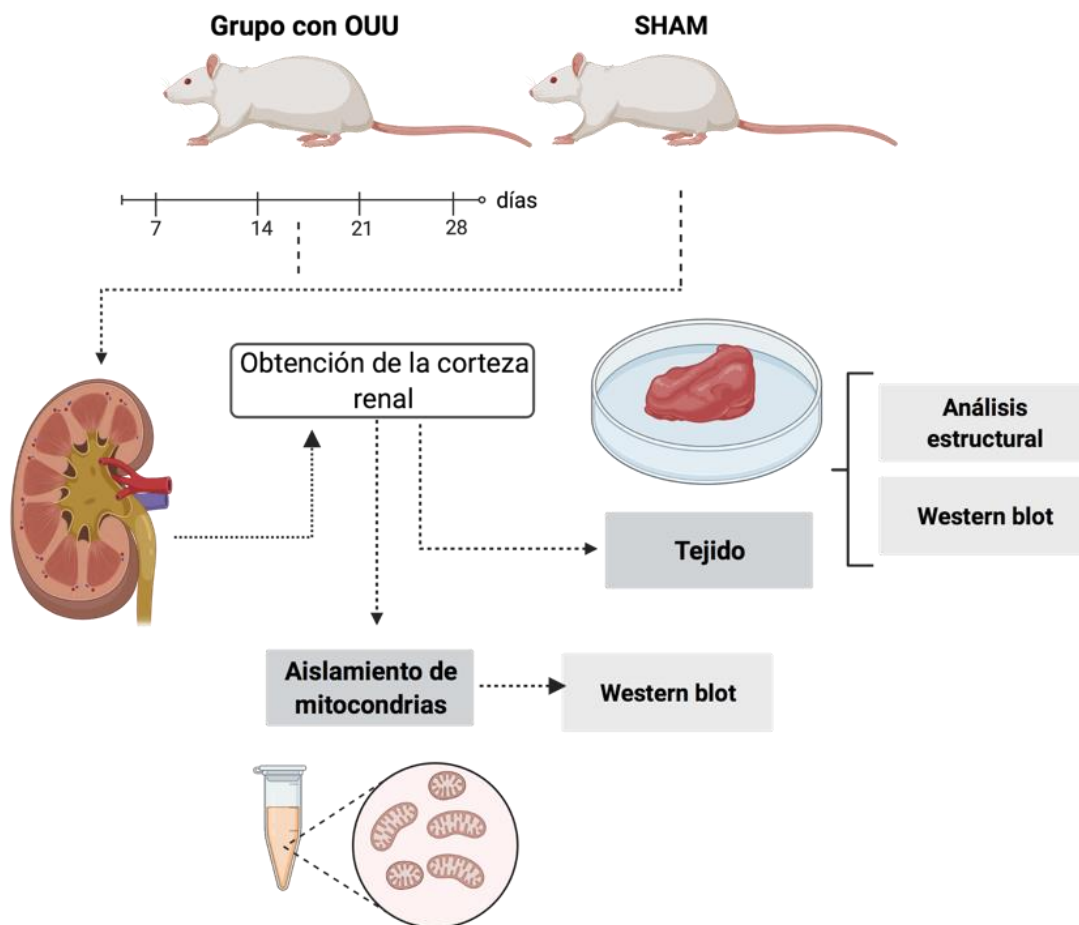


Figura 5. Estrategia experimental. Se utilizaron dos grupos de ratas Wistar divididas en el grupo con obstrucción unilateral del uréter (OUU) izquierdo y el grupo sham, o de cirugía simulada. En grupo de OUU se subdividió en 7, 14, 21 y 28 días posteriores a la obstrucción. De ambos grupos se obtuvo la corteza renal para su análisis estructural o el análisis de sus proteínas por western blot. Las mitocondrias aisladas se utilizaron para determinar marcadores de mitofagia por western blot. Figura creada en Biorender.

- **Western blot**

Se obtuvieron fragmentos de corteza renal y se pesaron cortes de aproximadamente 1 mg de tejido. Por cada mg de tejido se agregaron 0.5 mL de amortiguador de radio-inmuno precipitación (RIPA) adicionado con NaF 5 mM, Na₃VO₄ 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM y un cocktail inhibidor de proteasas (Sigma aldrich®). Se disgregó el tejido utilizando un homogeneizador Potter-Elvehjem; posteriormente, el homogenado se centrifugó a 15,000 g por 20 min a 4°C y se recolectó el sobrenadante (fracción proteica) para posteriormente realizar la cuantificación de proteínas utilizando el método de Bradford. Una vez cuantificadas, las muestras se prepararon con amortiguador de Laemmli 1:6 y se ajustó la concentración a 2µg/µL completando el volumen necesario con RIPA; posteriormente se calentaron a 95°C por 5 min y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Para la electroforesis se colocaron 30 µg de muestra por pozo y se realizó la electroforesis en geles de poliacrilamida al 10, 12 y 15%, dependiendo del peso molecular de la molécula de interés (Tabla 2).

Tabla 2. Concentración de geles de poliacrilamida de acuerdo a al peso molecular de la proteína de interés

Concentración de geles de poliacrilamida	Proteína de interés
10%*	Colágeno tipo IV

12%**	α -SMA, PGC-1 α , NRF1, NRF2, TFAM, VDAC, ANT, MDA, 4-HNE, Drp1, PINK1, Parkin, P62, Beclina 1, Bcl-2, LC3
15%**	IL-6, TNF- α , TGF- β

*Geles realizados para proteínas de más de 95 kDa, ** entre 30 a 95 kDa y *** menores s 30 kDa.

Las condiciones para la electroforesis fueron 30 V por 30 minutos para el gel concentrador y 80 V por 2 h para el gel separador. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) por transferencia semi-húmeda a 10 V por 30 min. Una vez terminada la transferencia, cada membrana se bloqueó 1 hora a temperatura ambiente con amortiguador TRIS-Tween 20 (TBST) con leche descremada al 5%. Las membranas fueron lavadas con TBST e incubadas con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 2) durante toda la noche a 4°C. Para realizar el revelado, se lavaron las membranas con TBST y se incubaron por 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario. Las bandas se detectaron y se analizaron utilizando el equipo Odyssey Sa scanner (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) asociado al software Image Studio™ Lite Software LI-COR Odyssey (LI-COR Biosciences).

Tabla 2. Lista de anticuerpos utilizados

Molécula blanco del anticuerpo	Reactividad	Especie de origen	Marca	Catálogo	Dilución utilizada	Observaciones
IL-6*	Rata, ratón	Ratón	Santa cruz biotech.	sc57315	1:1000	Monoclonal
TNF- α *	Rata, ratón, humano, cobayo	Ratón	Abcam	ab1793	1:1000	Monoclonal
TGF- β 1*	Rata, ratón, humano	Ratón	Santa cruz biotech.	sc130348	1:1000	Monoclonal

α -SMA*	Rata, ratón, humano	Conejo	Genetech	GTX10034	1:2000	Policlonal
Colágeno IV*	Rata, ratón, humano	Ratón	Sigma aldrich	SAB4200500	1:1000	Monoclonal
GAPDH*	Rata, ratón, humano	Conejo	Genetech	GTX100118	1:10000	Policlonal
PGC-1 α *	Rata, humano	Cabra	Abcam	ab106814	1:1000	Policlonal
Nrf1*	Rata, humano	Conejo	Santa cruz biotech.	sc33771	1:1000	Policlonal
Nrf2 (GABP1/2)*	Rata, humano	Ratón	Santa cruz biotech.	sc271571	1:500	Monoclonal
TFAM*	Rata	Conejo	Genetech	GTX59889	1:500	Policlonal
ANT*	Rata, ratón, pez zebra	Conejo	Abcam	ab102032	1:1000	Policlonal
VDAC*	Rata, ratón, humano	Conejo	Sigma aldrich	V2139	1:2000	Policlonal
MDA*	Rata, humano	Conejo	Abcam	ab6463	1:1000	Policlonal
4-HNE*	Reacción independiente a la especie	Ratón	Abcam	ab48506	1:2000	Monoclonal
Drp1*	Rata, ratón, humano	Conejo	Santa cruz biotech.	sc32898	1:500	Policlonal
PINK1*	Rata, ratón, humano	Conejo	Abcam	ab23707	1:1000	Policlonal
Parkin*	Rata, ratón, humano	Ratón	Abcam	ab77924	1:500	Monoclonal
Beclina 1*	Rata, ratón, humano	Ratón	R&D system	MAB5295	1:1000	Monoclonal
Bcl-2*	Rata, ratón	Ratón	Thermo fisher	14699282	1:1000	Monoclonal
P62*	Rata, ratón, humano	Conejo	Sigma aldrich	p0067	1:1000	Policlonal

LC3*	Rata, ratón, humano	Conejo	Abcam	ab48394	1:1000	Policlonal
IgG**	Cabra	Burro	Licor	926-68074	1:15000	Conjugado al fluoróforo 680RD
IgG**	Conejo	Burro	Licor	926-68073	1:15000	Conjugado al fluoróforo 680RD
IgG**	Conejo	Burro	Licor	926-32213	1:15000	Conjugado al fluoróforo 800RD
IgG**	Ratón	Burro	Licor	926-32212	1:15000	Conjugado al fluoróforo 800RD
IgG**	Ratón	Burro	Licor	926-68072	1:15000	Conjugado al fluoróforo 680RD

**Usado como anticuerpo primario, ** usado como anticuerpo secundario*

- **Aislamiento de mitocondrias**

Para el aislamiento de mitocondrias se obtuvieron cortes de la corteza renal y se colocaron en 2 mL de amortiguador de aislamiento mitocondrial (D-manitol 225 mM, sacarosa 75 mM, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM, ácido 4-(2-hidroxi-etil) piperazin-1-iletanosulfónico (HEPES) 5 mM, albúmina sérica bovina 0.1%, pH=7.4) a 4°C; el tejido se disgregó utilizando un homogeneizador Potter Helvehjem, posteriormente se centrifugó 2000 rpm por 5 min a 4°C, el sobrenadante se transfirió a otro tubo y se centrifugó nuevamente a 9000 rpm por 10 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y la pastilla resultante se lavó con 2 mL de amortiguador de aislamiento sin albúmina, se repitió la centrifugación de 9000 rpm por 5 minutos a 4°C. Nuevamente se desechó el sobrenadante y se agregaron 200 µl de amortiguador de aislamiento sin albúmina, la pastilla (correspondiente a las mitocondrias aisladas) se disgregó suavemente utilizando un pincel. Se realizó la cuantificación de proteínas en las fracciones mitocondriales utilizando el método de Bradford. Las muestras se prepararon de acuerdo a lo descrito para el procedimiento de western blot.

1.1 Microscopía electrónica de transmisión (MET)

La corteza renal se cortó en segmentos de aproximadamente 1 mm³, los cuales se fijaron en glutaraldehído al 2.5% (2.5 ml glutaraldehído en 97.5 mL de amortiguador de fosfatos pH=7.2) por 1.5 h, posteriormente se lavaron 3 veces en amortiguador de fosfatos y se trataron con tetróxido de osmio al 1% por 1 h para una segunda fijación. Las muestras se lavaron nuevamente 3 veces con amortiguador de fosfatos y se deshidrataron secuencialmente con etanol a diferentes concentraciones, comenzando con etanol al 70%, después al 96% y finalmente con etanol absoluto dos veces. Posteriormente se sumergieron en óxido de propileno por 10 min. Se colocaron en una resina de óxido de propileno/Epon por toda la noche a temperatura ambiente para posteriormente ser embebidas en una resina Epon a 60°C por 24 h. La muestra fue procesada para obtener cortes de 300 nm de grosor. Finalmente se realizaron cortes ultradelgados de 60-90 nm y se contrastaron con acetato de uranilo al 4% por 20 min y citrato de plomo 1% por 10 min. Las muestras se analizaron utilizando el microscopio JEM-1400 Plus (JEOL, Boston, MA, USA).

- **Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados utilizando el software Graph Pad Prism 7 (San Diego, CA, USA) utilizando la prueba ANOVA de una vía, y seguido de la prueba Dunnett. Los datos se presentan como la media ± error estándar de la media (SEM).

RESULTADOS

- **Progresión del daño inflamatorio y fibrótico en la OUU**

Para evaluar el proceso inflamatorio y validar el desarrollo de fibrosis inducido por el modelo de OUU, se determinaron en cada tiempo de obstrucción del uréter los niveles de marcadores asociados a dichos procesos.

Como marcadores del proceso inflamatorio se utilizaron la IL-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Para el caso de IL-6 se observó una tendencia a aumentar progresivamente a lo largo del tiempo de obstrucción del uréter, sin embargo, no hubo diferencias significativas; para el caso de TNF- α de igual forma se observó un aumento progresivo, siendo estadísticamente significativo desde el día 14 y hasta el día 28 de la OUU (Figura 6A).

En el caso del mediador clave de la fibrosis, TGF- β , se observó un aumento significativo desde los 14 días de obstrucción del uréter siguiendo con el mismo comportamiento hasta el día 28; en relación a la molécula α -SMA, la cual es un indicador de la TEM, a pesar de observarse una tendencia a aumentar desde los 7 días de obstrucción del uréter, sólo se encontró diferencia significativa hasta el día 28; sin embargo para colágeno tipo IV, siguiendo el mismo comportamiento que TGF- β , se observó un aumento significativo desde el día 14 y hasta el día 28 de obstrucción del uréter (Figura 6B).

Adicionalmente, los cambios estructurales en la corteza renal se observaron utilizando las tinciones de H&E y PAS. De manera cualitativa se observó infiltrado celular desde el día 7 y evidencia de deposición de tejido conectivo desde el día 14 con la tinción de H&E; mientras que por la tinción PAS se observó presencia de agregados proteicos denominados placas amiloides desde el día 7 de la OUU (Figura 6C).

El conjunto de estos resultados revela que los proceso inflamatorio y fibrótico, en base a los marcadores moleculares y metodologías utilizados, son evidentes a partir del día 14 de obstrucción y para el día el día 28 se encuentran completamente establecidos con prácticamente todos los marcadores incrementados, con excepción de la IL-6. Esto es un resultado interesante, ya que usualmente el proceso inflamatorio tiende a resolverse para dar paso a la reparación tisular (87). Sin embargo, en este caso, como ocurre en la inflamación crónica (88), al no poder reparar el daño por la persistente presión hidrostática, el propio proceso inflamatorio conduce al desarrollo de fibrosis generando un círculo vicioso.

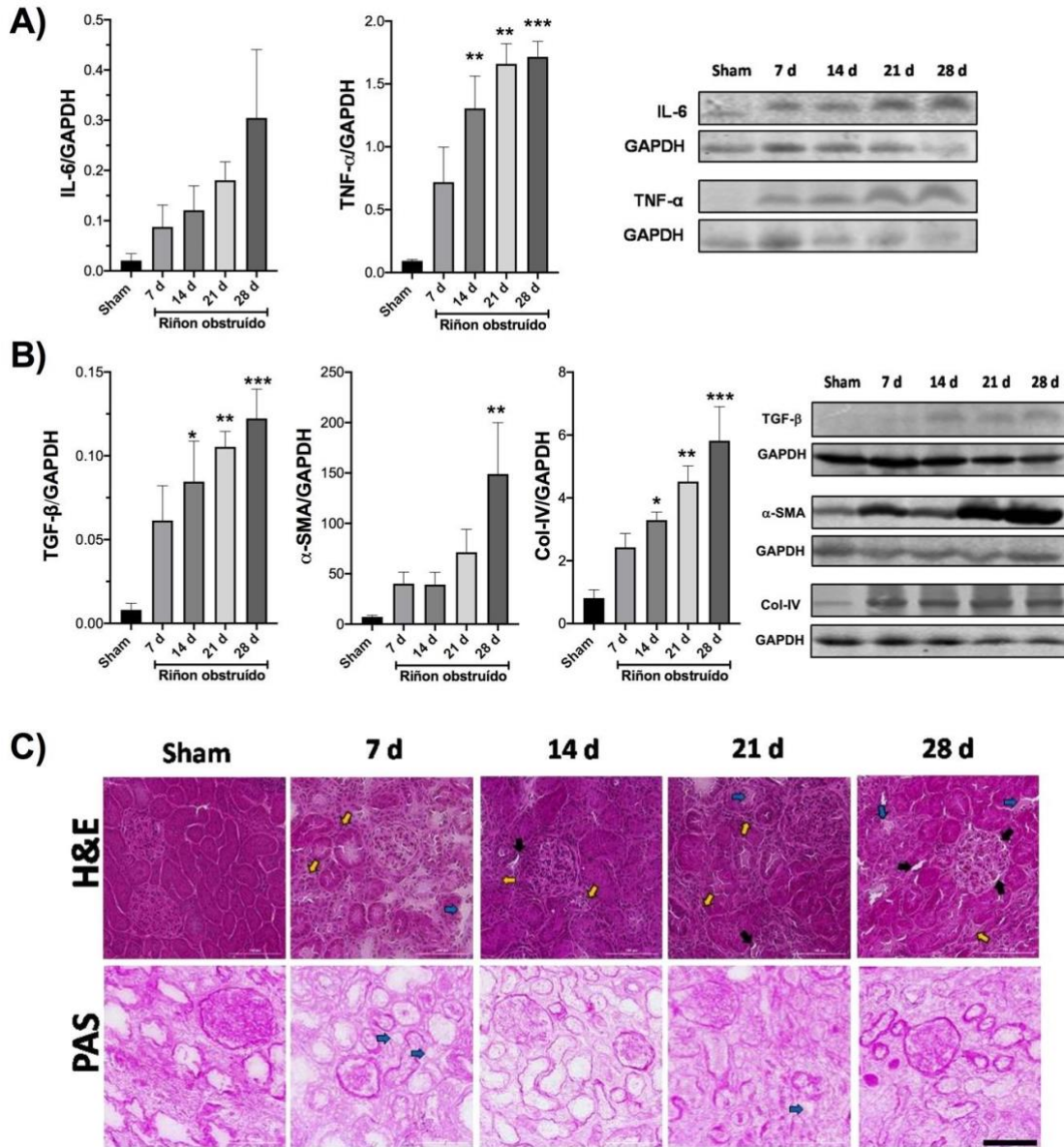


Figura 6. El establecimiento de la inflamación y fibrosis ocurren a partir del día 14 de obstrucción. (A) Evaluación de los marcadores inflamatorios interleucina 6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y (B) los marcadores de fibrosis, factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), actina de músculo liso alfa (α -SMA), y colágeno tipo IV (Col-IV). Los datos fueron analizados utilizando la prueba de ANOVA de una vía y post-prueba Dunnett, $n=4$. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs. Sham. Para los westerns blots, como control de carga se utilizó la proteína gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). (C) Imágenes representativas del cambio en la morfología renal y deposición de matriz extracelular utilizando las tinciones de hematoxilina y eosina (H&E) y ácido periódico de Schiff tomadas con objetivo 20x. Las flechas negras indican la presencia de tejido conectivo, las flechas azules indican la deposición de placas amiloides, las flechas amarillas indican infiltrado celular. Escala de la barra = 100 μ m, d=días de la obstrucción unilateral de uréter, sham=grupo control de simulación de cirugía.

- **Evaluación de la función mitocondrial**

Como antecedente directo, previamente en nuestro laboratorio se evaluaron, mediante respirometría de alta resolución, los parámetros bioenergéticos mitocondriales: estado 3 (S3), consumo de oxígeno asociado a la producción de ATP (P) y control respiratorio (RC) en mitocondrias aisladas de riñones a los 7, 14, 21 y 28 días de obstrucción del uréter (datos correspondientes a la tesis de maestría en preparación de Belén Bellido). Los parámetros S3 y P indican la actividad de la fosforilación oxidante y ambos se encontraron disminuidos desde los 7 días y manteniéndose así hasta los 28 días de obstrucción del uréter, sin embargo para el caso de RC no se encontraron alteraciones. Dichos datos indicaron en general que la síntesis de ATP se encuentra reducida, sin embargo, al no haber cambios en el RC, el consumo de oxígeno sigue asociado a la producción de ATP y no a otros procesos metabólicos como la generación de ERO en mitocondria.

Para determinar de manera cualitativa la función del STE y en relación con los antecedentes directos previamente mencionados, se determinó mediante histoquímica enzimática la actividad del complejo I y del complejo IV.

La actividad del complejo I se determinó utilizando el ensayo NADH-TR en el que el azul de tetrazolio actúa como receptor de electrones provenientes del complejo I (NADH deshidrogenasa) generando un azul intenso; los resultados indicaron que la actividad de este complejo se encuentra disminuida en los días 7, 14 y 28 de obstrucción del uréter; sin embargo, el día 21 parece haber una recuperación parcial de su actividad (Figura 7).

La actividad del citocromo c oxidasa (COX), también denominada complejo IV, se determinó utilizando la diaminobenzidina como donador de electrones, y su oxidación indica que sus electrones han sido transportados por el citocromo c a la COX, observándose como un color marrón; los resultados muestran que su actividad tiende a disminuir en todos tiempos de obstrucción del uréter (Figura 7).

Cabe recalcar que estos resultados son un indicador cualitativo y en conjunto con los antecedentes previamente mencionados demuestran que la actividad mitocondrial se encuentra disminuida.

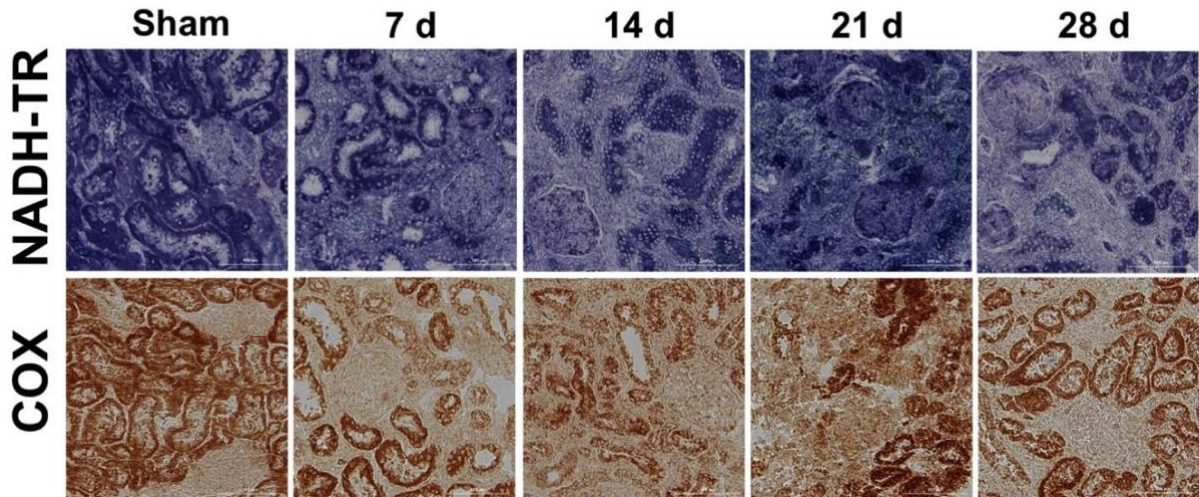


Figura 7. La obstrucción unilateral del uréter (OUU) provoca la disminución en la actividad del complejo I y del complejo IV del STE (sistema de transporte de electrones). Imágenes representativas de la actividad enzimática del complejo I (NADH-TR) y complejo IV (COX). Las micrografías fueron tomadas utilizando un objetivo de 40X. Escala de la barra = 100 μ m. d=días de la obstrucción unilateral de uréter, sham=grupo control de simulación de cirugía.

- **Determinación de la masa mitocondrial**

Una de las posibles causas que podrían llevar a la disminución de la función mitocondrial es una menor cantidad de mitocondrias en el tejido; debido a ello se evaluó la masa mitocondrial utilizando como marcadores VDAC, como proteína constitutiva de la MEM, y al translocador de adenín-nucleótidos (ANT), como proteína constitutiva de la MIM.

Tanto para VDAC como para ANT se observó una disminución significativa en sus niveles desde el día 7 y hasta el día 28 de obstrucción del uréter (Figura 8).

Estos resultados sugieren que la reducción de la masa mitocondrial pudiera ser el origen de la disfunción mitocondrial, ya que ambos procesos ocurren desde los 7 días de la OUU.

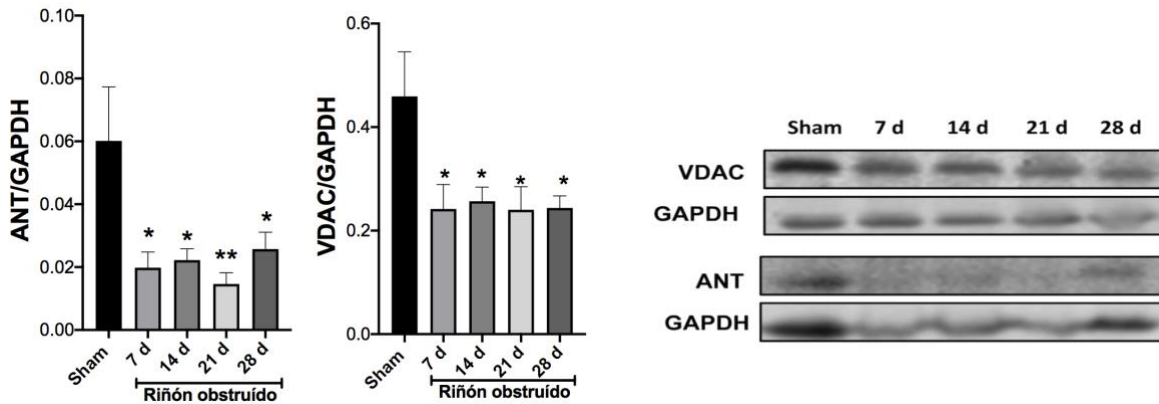


Figura 8. La obstrucción unilateral del uréter (OUU) provoca la disminución en la masa mitocondrial de manera temprana. La masa mitocondrial se evaluó utilizando los marcadores canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) y el translocador de adenín-nucleótidos (ANT), como control de carga se usó la proteína gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) Los datos se analizaron utilizando la prueba de ANOVA de una vía y post-prueba Dunnett, $n=4$. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs. Sham. d=días de la obstrucción unilateral de uréter, sham=grupo control de simulación de cirugía.

- **Determinación de la biogénesis mitocondrial**

La homeostasis mitocondrial es un proceso altamente dinámico que comprende la generación de nuevas mitocondrias (biogénesis) y la remoción de mitocondrias dañadas (mitofagia), el conjunto de ambos procesos regula la masa mitocondrial.

Debido a la disminución en los marcadores de masa mitocondrial observada, el siguiente objetivo fue evaluar marcadores asociados a la biogénesis de este orgánulo. Para ello se evaluaron los factores transcripcionales PGC-1 α , NRF1, NRF2 y TFAM, los cuales son claves en la inducción de este proceso.

Se encontró que los niveles de PGC-1 α tienden a disminuir progresivamente, siendo significativamente menor al día 28 de obstrucción del uréter. Para el caso de NRF1 hubo disminución significativa desde el día 7 y hasta el día 28 (Figura 9); sin embargo, para el caso de NRF2 no se encontraron diferencias significativas.

TFAM es un factor que regula la transcripción y replicación del mtDNA (89), por lo que sus niveles se midieron en mitocondrias aisladas; los resultados mostraron que

durante la OUU hay una tendencia a disminuir, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Estos hallazgos son interesantes, ya que PGC-1 α es una molécula relacionada con diversos procesos metabólicos y actúa como un co-activador de diferentes factores transcripcionales como los ya mencionados NRF1 y NRF2 para promover la biogénesis mitocondrial; sin embargo, también participa en la activación de otros como los ERR y los receptores activados por proliferadores de peroxisoma (PPAR), los cuales están involucrados en procesos como la angiogénesis y el metabolismo de ácidos grasos y carbohidratos (90). Debido a su participación en diferentes procesos, probablemente sus niveles se ven afectados hasta estados avanzados de la enfermedad.

Por su parte, el NRF1 es un factor transcripcional más directamente asociado a la biogénesis mitocondrial actuando río abajo de PGC-1 α , por lo que la reducción en sus niveles desde el día 7 de obstrucción del uréter sugiere que la biogénesis mitocondrial se encuentra disminuida de manera temprana, fenómeno que puede estar relacionado con la disminución en la actividad mitocondrial temprana.

Para el caso de TFAM y NRF2, aunque sus niveles no mostraron diferencias significativas posterior a la OUU, se observa una tendencia a la disminución para ambos casos. Adicionalmente, independientemente a los niveles de todos los factores mencionados, su actividad transcripcional pudiera también estar afectada.

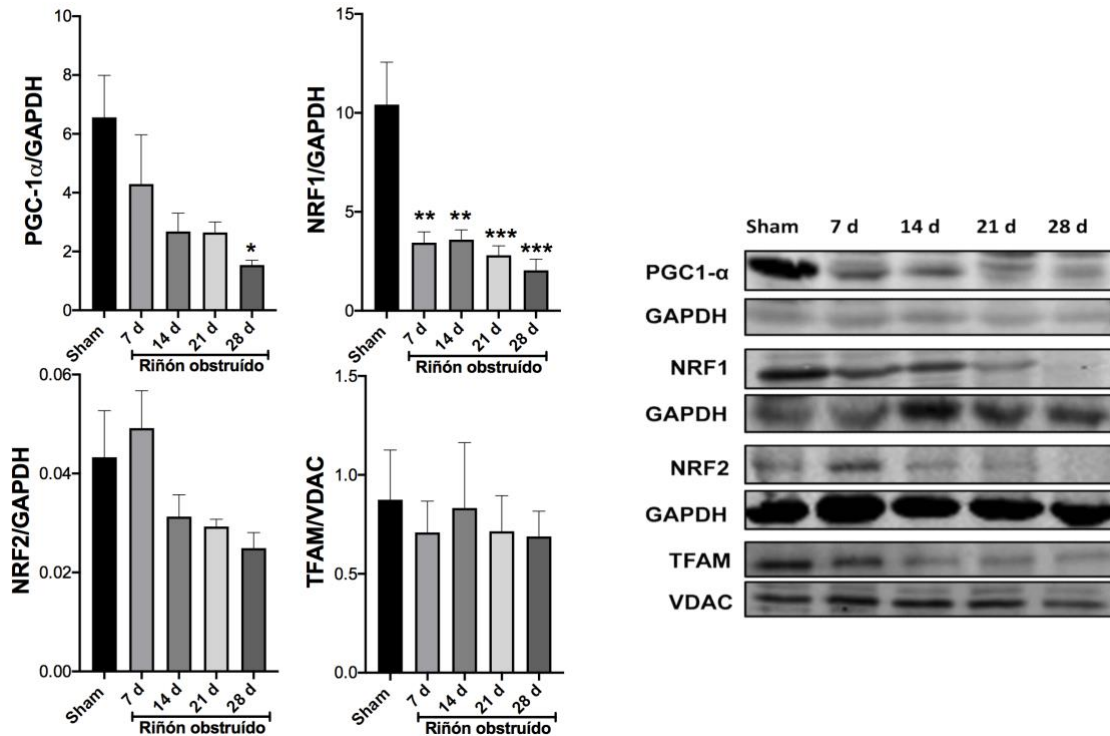


Figura 9. La obstrucción unilateral del uréter (OUU) provoca la disminución de marcadores de biogénesis mitocondrial. (A) Evaluación de los marcadores de biogénesis mitocondrial: coactivador 1 alfa del receptor activado por proliferador de peroxisomas (PGC-1 α), factor nuclear respiratorio (NRF) 1 y 2, y factor transcripcional mitocondrial A (TFAM). Para los westerns blots, como controles de carga se usaron la proteína gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) respectivamente. Los datos se analizaron utilizando la prueba de ANOVA de una vía y post-prueba Dunnett, $n=4$. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs. Sham. d=días de la obstrucción unilateral de uréter, sham=grupo control de simulación de cirugía.

- **Daño oxidativo en la mitocondria**

NRF2 es un factor relacionado tanto a la biogénesis mitocondrial como a la respuesta antioxidante. Debido a que no se encontraron diferencias significativas de éste, una posibilidad es que sus niveles se mantengan para promover la respuesta antioxidante; por lo que uno de los objetivos fue evaluar el daño oxidante en mitocondria aisladas mediante los marcadores 4-hidroxinonanal (4-HNE) y malondialdehído (MDA), los cuales son producto de la oxidación de lípidos.

Se observó que para 4-HNE al igual que para el grupo control existe evidencia de niveles basales de este metabolito en lipoproteínas de diferentes pesos moleculares sin encontrarse diferencias significativas inducidas por la OUU; sin embargo, para el caso de MDA se observó que la OUU induce un incremento significativo en los días 7, 14 y 28 (Figura 10), indicando que hay daño oxidante en la mitocondria. Una observación interesante es que en el día 21, los niveles de MDA no son diferentes significativamente con respecto al grupo control, por lo que el daño oxidante probablemente está siendo remediado parcialmente por la acción de NRF2.

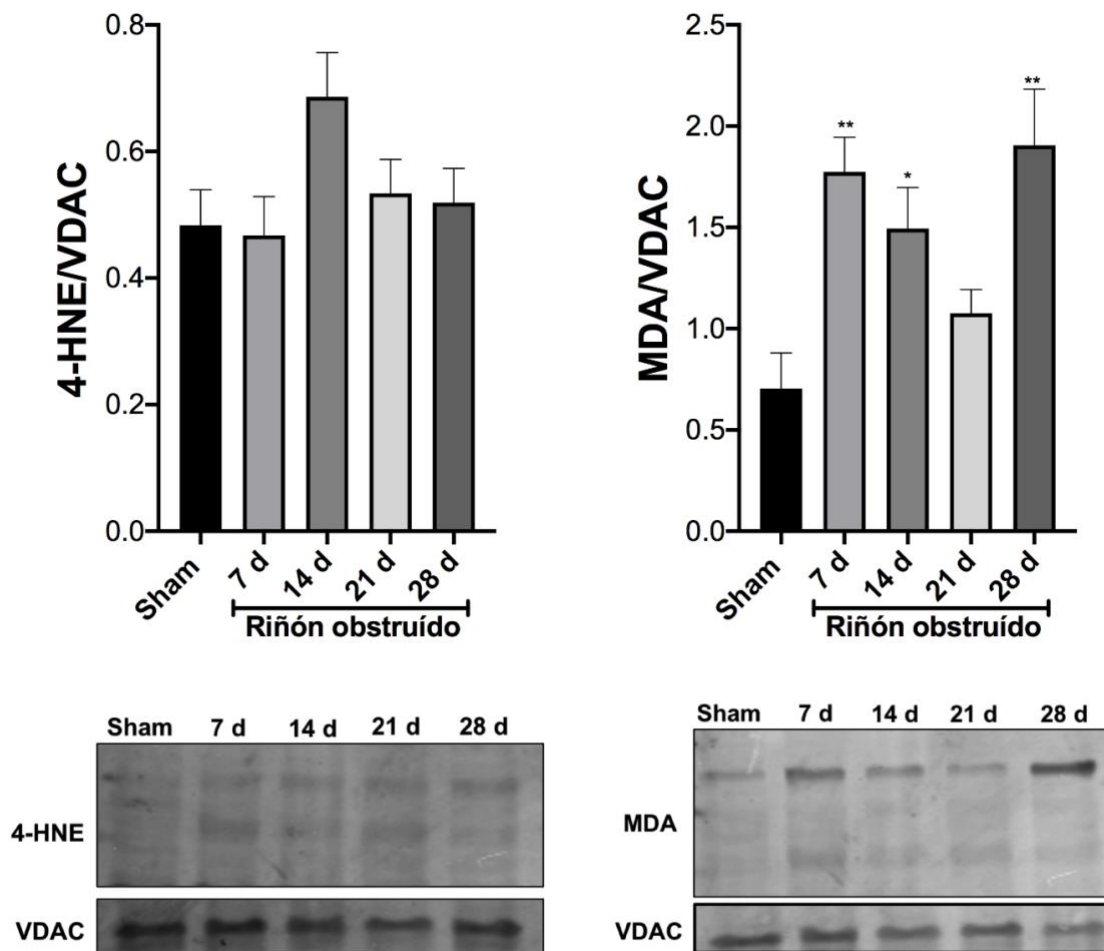


Figura 10. La obstrucción unilateral del uréter (OUU) promueve el daño oxidante en mitocondrias. Niveles de 4-hidroxinonenal (4-HNE) y malondialdehído (MDA), el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) se utilizó como control de carga. Los datos se analizaron utilizando la prueba de ANOVA de una vía y post-

prueba Dunnett, n=4. *p<0.05, **p<0.01 vs. Sham. d=días de la obstrucción unilateral de uréter, sham=grupo control de simulación de cirugía.

- **Correlación entre parámetros bioenergéticos con marcadores de masa y biogénesis mitocondrial.**

Para saber si existía asociación entre la disminución de la función mitocondrial reportada previamente (tesis de maestría en preparación de Belén Bellido) y los marcadores de masa y biogénesis mitocondriales, se analizaron las correlaciones entre el marcador de biogénesis mitocondrial NRF1 y los parámetros bioenergéticos S3 y P. De igual manera para saber si existía alguna asociación entre el desarrollo de fibrosis con la biogénesis y masa mitocondriales se realizaron correlaciones entre el marcador de fibrosis TGF- β con PGC-1 α , NRF1, VDAC y ANT, respectivamente. Se observó una correlación moderada positiva de los parámetros bioenergéticos de la actividad de complejo I y NRF1; de manera similar se observó una correlación alta positiva de los parámetros bioenergéticos de la actividad de complejo II y NRF1 (Figura 11A). Estas correlaciones indican que conforme disminuye la biogénesis mitocondrial indicada por NRF1, también disminuyen los parámetros bioenergéticos S3 y P.

Por su parte TGF- β presentó una correlación moderada negativa con los marcadores de PGC-1 α , NRF1, VDAC y ANT; indicando que conforme incrementa la fibrosis, disminuyen la masa y biogénesis mitocondriales (Figura 11B).

Es importante recalcar que estas correlaciones indican asociaciones y no causalidad, por lo que estudios adicionales son necesarios para determinar si estos fenómenos están relacionados funcionalmente.

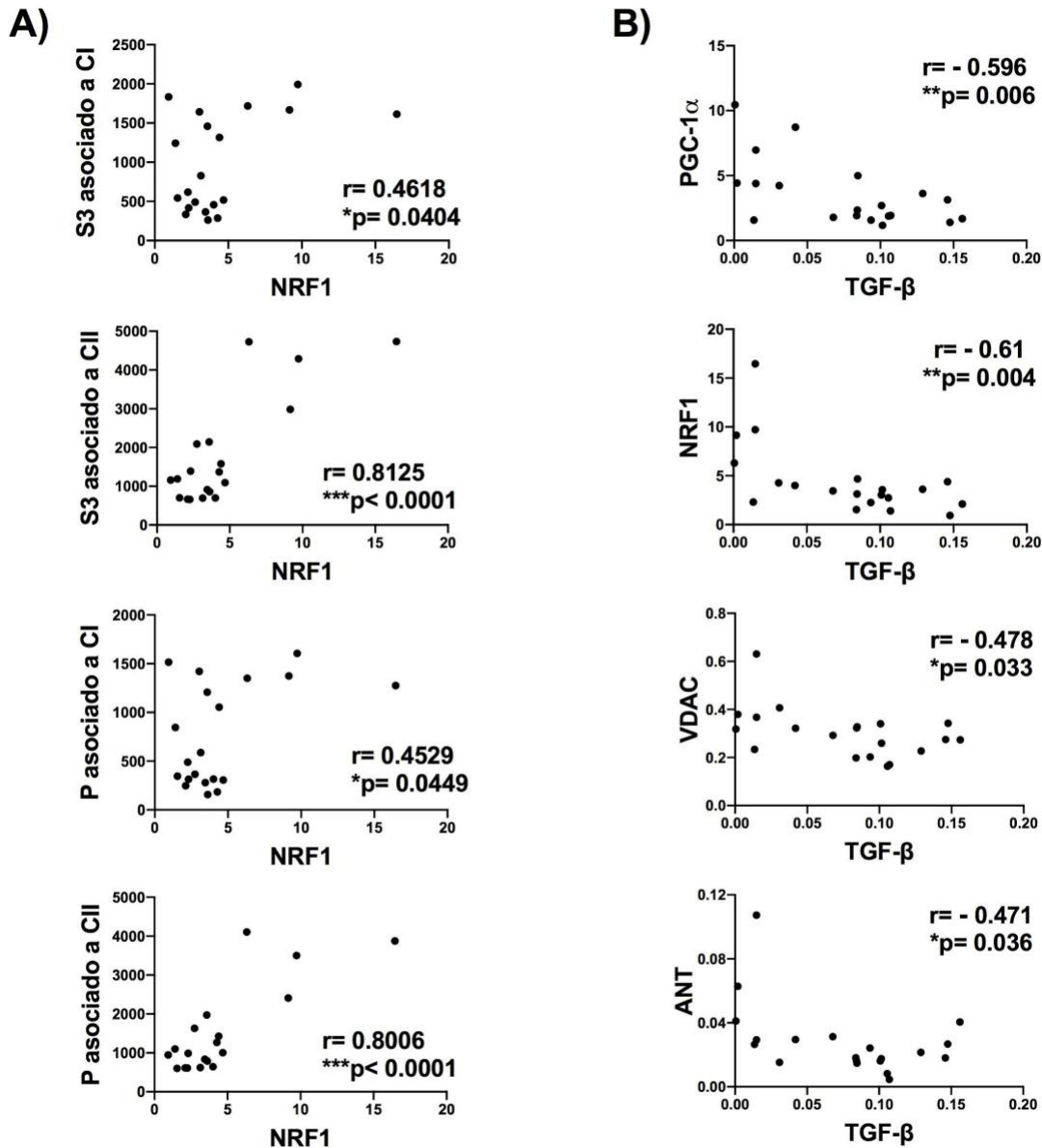


Figura 11. La biogénesis mitocondrial y masa mitocondrial correlacionan positivamente con la función mitocondrial y negativamente con TGF- β . (A) Correlaciones entre el factor nuclear respiratorio 1 (NRF1) como marcador de biogénesis mitocondrial con los parámetros bioenergéticos S3 y P (S3 indica consumo de oxígeno total en presencia de adenosin difosfato (ADP) y sustratos para el complejo I (CI) o complejo II (CII). P indica el consumo de oxígeno mitocondrial asociado a la producción de adenosín trifosfato (ATP). Ambos parámetros están determinados en mitocondrias aisladas. (B) Correlaciones entre el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) como marcador de fibrosis con la biogénesis y masa mitocondrial, utilizando a los marcadores coactivador 1 alfa del receptor activado por proliferador de peroxisomas (PGC-1 α), NRF1, canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) y al translocador de adenín-nucleótidos (ANT).

- **Determinación de marcadores de mitofagia**

Como previamente se mencionó, otro mecanismo involucrado en la regulación de la masa mitocondrial, además de la reducción en la biogénesis mitocondrial, es la remoción de dicho orgánulo por el proceso de mitofagia, por lo que el siguiente objetivo fue determinar marcadores de este proceso.

Para comprobar el proceso de mitofagia, se determinó inicialmente por MET la presencia y estructura de mitocondrias a los diferentes tiempos de obstrucción del uréter y utilizando como control interno el riñón contralateral. Se observó que a partir del día 7 de obstrucción del uréter hay una aparente disminución en el número de mitocondrias y con cambios morfológicos marcados; observándose que mostraban una forma redondeada en comparación con las del control, cuya morfología es alargada, adicionalmente se observó la pérdida de crestas mitocondriales (Figura 12).

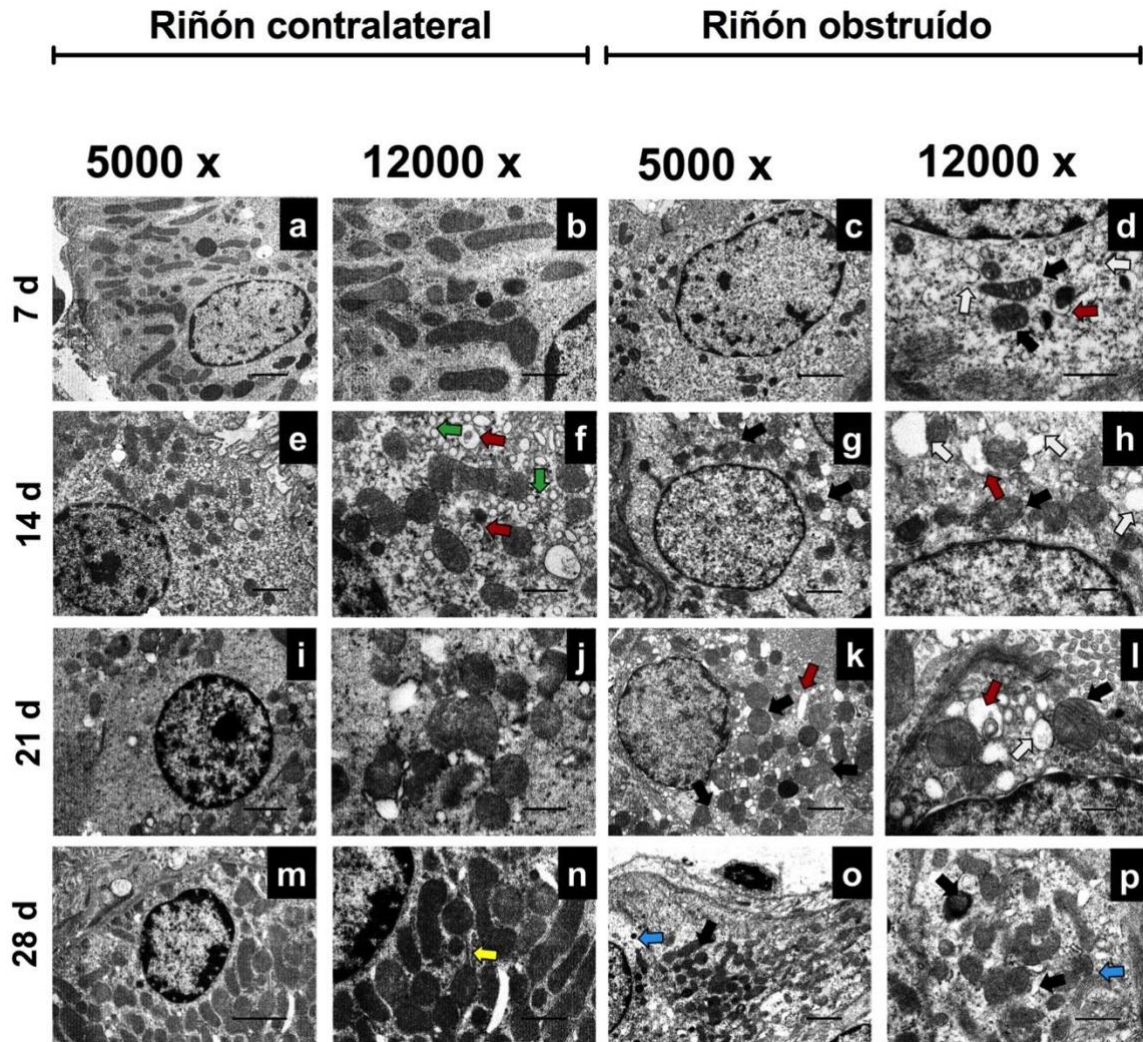


Figura 12. La obstrucción unilateral del uréter (OUU) induce cambios estructurales en mitocondrias. Imágenes representativas de 3 réplicas biológicas. La corteza renal se analizó por microscopía electrónica de transmisión (MET) para observar los cambios en la morfología y distribución mitocondrial en los riñones obstruidos comparados con su riñón contralateral a los 7, 14, 21 y 28 días de la obstrucción. Se observaron las crestas, membranas y la integridad mitocondrial en los riñones contralaterales no obstruidos (a, b, e, f, i, j, m, y n) y obstruidos (c, d, g, h, k, l, o, y p) en cada tiempo. Las flechas rojas indican la presencia de membranas autofágicas, las flechas amarillas indican la presencia de retículo endoplásmico, las flechas verdes indican la proximidad del retículo endoplásmico a las mitocondrias, las flechas negras indican mitocondrias dañadas, las flechas blancas indican dilatación del retículo endoplásmico con formación de vacuolas, las flechas azules indican vacuolas con material digerido. La escala de la barra es de 2 μm y 1 μm para la magnificación de 5000x y 12000x, respectivamente.

Adicionalmente, realizando una magnificación de las imágenes se observó que las mitocondrias se encuentran adyacentes o dentro de vesículas, lo cual es un indicativo de que este orgánulo está siendo removido por el proceso de autofagia, observándose incluso restos mitocondriales dentro de dichas vesículas (Figura 13).

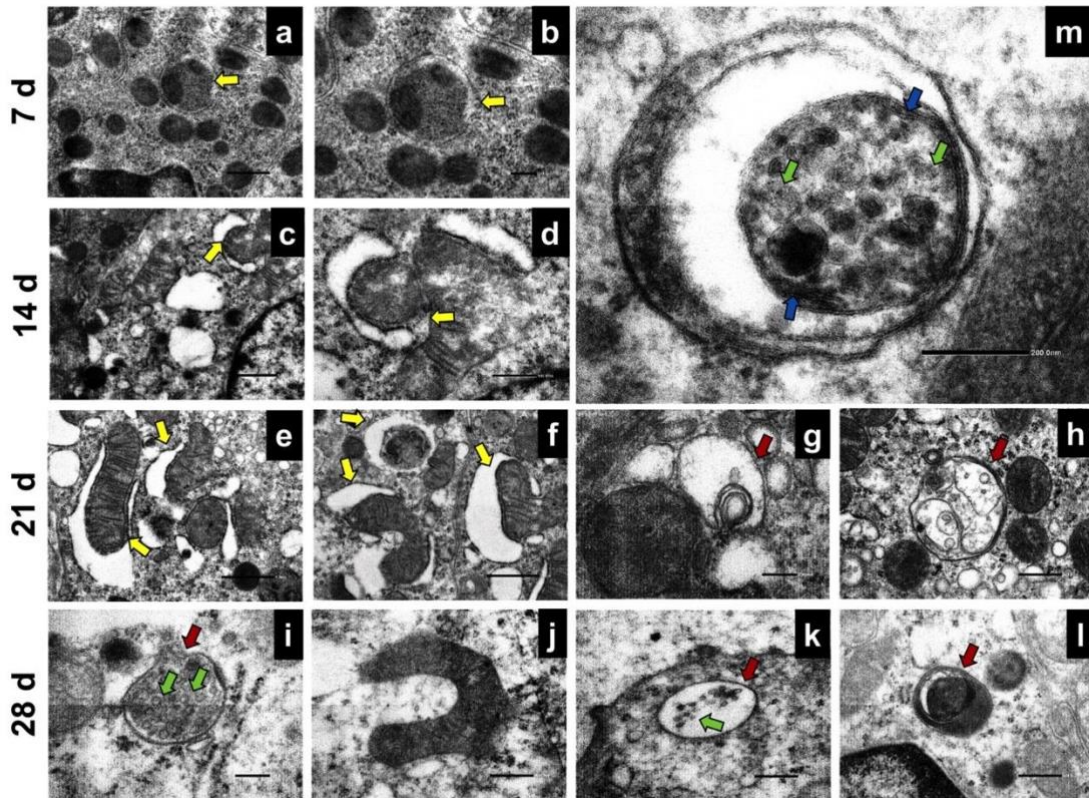


Figura 13. La obstrucción unilateral del uréter (OUU) induce la remoción de mitocondrias por mitofagia. Magnificación de las micrografías del riñón obstruido. Las flechas amarillas indican la presencia de autofagosomas adyacentes a mitocondrias, las flechas rojas indican contenido dentro de las vacuolas, y las flechas verdes indican presencia de material digerido, las flechas azules indican remanentes de mitocondria cerca de la vesícula autofágica. Escala de la barra para a, d, h, j, k, l = 500 nm; para b, g, i, m = 200 nm, y para c, e, f = 1 μ m. d= días de la obstrucción.

El proceso autofágico para la remoción específicamente de mitocondrias se denomina mitofagia, para ello las mitocondrias inicialmente deben ser fragmentadas, proceso que involucra la participación de la proteína Drp1. Al medir los niveles de Drp1 se observa un comportamiento cíclico, con tendencia a aumentar al día 7 y diferente significativamente en los días 14 y 28; sin embargo,

en el día 21 no se observan diferencias con el grupo control (Figura 14A), por lo que este comportamiento puede estar reflejando una regulación negativa de esta proteína.

Para el caso de las moléculas efectoras de la vía canónica de mitofagia, PINK1 y Parkin, no se observaron cambios inducidos por la OUU con respecto al grupo control (Figura 14A).

Nuestros resultados reflejan que a pesar de que las mitocondrias están fragmentadas y exista evidencia de su remoción observada con la MET, la mitofagia inducida en este modelo y bajo estas condiciones experimentales es independiente de la vía canónica de PINK1 y Parkin.

De manera interesante, observamos que los marcadores generales de autofagia como LC3B y beclina-1 se encuentran aumentados, mientras que Bcl-2 se encuentra disminuido (Fig. 14B), indicando en general la inducción de este proceso. Adicionalmente se observó que la molécula P62 aumentó sus niveles, y el cociente LC3B II/LC3B I disminuyó (Figura 14B), lo cual indica alteraciones en el flujo autofágico; por lo que a pesar que la mitofagia sea inducida por una vía independiente a PINK1 y Parkin, la eliminación adecuada de este orgánulo está alterada.

Estos resultados sugieren, en conjunto con los antecedentes que, durante la progresión del daño renal, existen cambios tempranos en la función mitocondrial debido a la disminución en la masa de este orgánulo. Este fenómeno puede deberse a la reducción de biogénesis, así como a la inducción de mitofagia de manera independiente a PINK1 y Parkin. Adicionalmente es importante recalcar que estos cambios mitocondriales anteceden al establecimiento del proceso fibrótico, el cual es evidente a partir del día 14 de obstrucción del uréter.

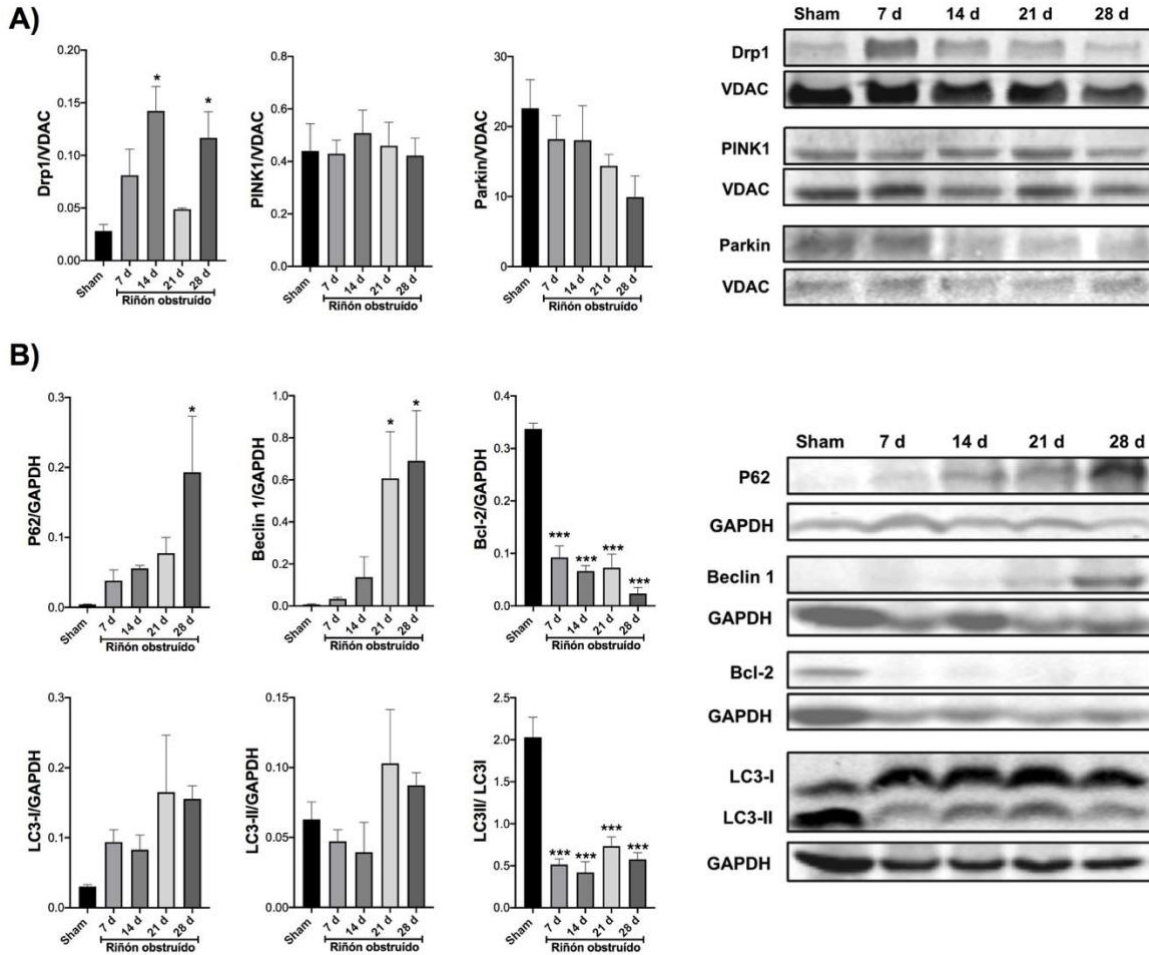


Figura 14. El proceso de mitofagia inducido por la obstrucción unilateral del uréter (OUU) es independiente de la vía de PINK1 y Parkin. (A) Evaluación de la proteína 1 parecida a dinamina (Drp1), cinasa 1 inducida por PTEN (PINK1) y Parkin en mitocondrias aisladas, el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) se utilizó como control de carga. (B) Las proteínas asociadas a autofagia P62, beclina 1, proteína linfoma 2 de células B (Bcl-2) y las proteínas asociadas a microtúbulos 1A/1B cadena ligera 3B I y II (LC3-II/I). La proteína gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) fue utilizada como control de carga. Los datos se analizaron utilizando la prueba de ANOVA de una vía y post-prueba Dunnett, n=4. *p<0.05, ***p<0.001 vs. Sham. d=días después de la obstrucción, sham= grupo control de cirugía simulada.

DISCUSIÓN

El desarrollo de fibrosis es considerado una característica común en el daño renal progresivo como el que se presenta en la ERC. Sin embargo, los mecanismos que inducen la fibrosis no siempre son los mismos, debido a las diversas etiologías de la ERC (91). El modelo de OUU representa un modelo valioso para estudiar el

establecimiento de la fibrosis de una manera secuencial y acelerada (15, 16, 62). En este modelo se han descrito diversas alteraciones, observándose en las primeras horas de obstrucción del uréter, aumento en los componentes y activación del SRAA, además de alteraciones hemodinámicas lo que resulta en vasoconstricción local (92-94). También se han descrito aumento en la presión hidrostática, dilatación tubular, disminución de la filtración glomerular, hipoxia y apoptosis de células epiteliales (16, 95, 96).

Dichos cambios, y la inducción de estrés oxidante en el parénquima renal (4, 83, 97) han sido asociados a la posterior respuesta inflamatoria y la activación de la vía de señalización de TGF- β , induciendo diversos cambios a nivel celular (98) y promoviendo el proceso fibrótico (99-103). En concordancia con lo descrito previamente, en nuestro trabajo encontramos un aumento de la citocina proinflamatoria TNF- α y de la citocina profibrótica TGF- β desde el día 14 de obstrucción del uréter; indicando un ambiente proinflamatorio, acompañado del desarrollo continuo de la fibrosis.

Se ha reportado que la vía activada por TGF- β puede aparecer desde el segundo día de evolución de la OUU (104) y persistir hasta un mes después (11, 103); sin embargo, en nuestros resultados, aunque hay una tendencia al aumento de esta citocina desde el día 7 de obstrucción, hay un aumento significativo hasta el día 14 de la obstrucción, esto pudiera ser debido al método de detección y a la concentración de esta citocina.

Debido a que el riñón es un órgano con una alta demanda energética, principalmente para cumplir sus funciones de filtración y reabsorción, las mitocondrias juegan un papel fundamental en la correcta función de este órgano. Recientemente se ha explorado cómo la mitocondria puede verse afectada durante diferentes enfermedades renales, incluida la fibrosis renal desencadenada por la ERC (105, 106).

La mayoría de las implicaciones de la mitocondria en la progresión de la ERC recaen principalmente en sus funciones involucradas en el estrés oxidante, en la inducción de la apoptosis y en la activación del inflammasoma (7, 75, 107-112). Sin

embargo, la caracterización bioenergética y su homeostasis han sido poco exploradas y con escasa información sobre estos cambios en un curso temporal. En este trabajo realizamos las evaluaciones de diversas alteraciones mitocondriales en un curso temporal de daño renal inducido por la OUU, observando que la actividad de los complejos I y IV se encuentra disminuida desde el día 7 y en concordancia con los antecedentes directos del laboratorio donde se observó que los parámetros bioenergéticos S3 y P se encuentran disminuidos cuando se alimenta el STE a través del complejo I y del complejo II. Este fenómeno pudiera deberse en parte a la hipoxia temprana que se ha descrito en el modelo de OUU (4), el cual pudiera ser un desencadenante, o bien, un potenciador de los cambios bioenergéticos. De forma interesante, estas alteraciones anteceden al establecimiento de la inflamación y la fibrosis renal (Figura 15), sugiriendo un probable papel de la mitocondria en la inducción de estos procesos.

Esto concuerda con reportes que han observado una reprogramación metabólica desde el primer día de OUU, aumentando la tasa glucolítica por aumento en la expresión de la hexocinasa 2 y de la piruvato cinasa 2; este cambio probablemente es inducido por la señalización de TGF- β , la cual a su vez favorece la proliferación y activación de fibroblastos (113) para promover la producción de proteínas de MEC (114). Adicionalmente, se ha encontrado que durante los primeros días de la OUU algunos metabolitos relacionados con la actividad mitocondrial, incluyendo metabolitos del ciclo de Krebs y ADP, se encuentran disminuidos (17). El conjunto de estas evidencias indica que la reprogramación metabólica ocurre de manera temprana, siendo consecuencia probablemente de la disfunción mitocondrial e incluso relacionada con la disfunción en la β -oxidación y la lipotoxicidad observada en el parénquima renal posterior a la OUU (11, 115, 116). Tanto la reprogramación metabólica como la lipotoxicidad pueden ser desencadenantes del estrés oxidante, activar la vía intrínseca de la apoptosis y participar activamente en el proceso fibrótico (11, 103, 117, 118).

Adicionalmente, la reprogramación metabólica y la disfunción en la β -oxidación pueden ser resultado del reemplazo de las células epiteliales residentes (que utilizan preferentemente ácidos grasos para la obtención de energía), por

miofibroblastos en el proceso de TEM y cuyo metabolismo es más glucolítico (9, 16, 97, 119). Debido a la alta densidad de mitocondrias en las células epiteliales de la nefrona, comparada con la de fibroblastos y miofibroblastos (97, 119), el reemplazo y/o muerte de células epiteliales puede favorecer la pérdida en la masa mitocondrial, lo que explicaría también la reducción en los parámetros bioenergéticos.

Por otra parte, la degradación de mitocondrias dañadas, por el proceso de mitofagia, se encuentra en balance con la generación de nuevas para responder a los requerimientos energéticos de la célula y mantener la masa, tamaño y distribución mitocondriales (38, 97). De esta manera, la reducción de la masa mitocondrial puede deberse a la disminución en la biogénesis de este orgánulo (120). En correspondencia a esto, nuestros resultados revelaron la disminución de factores maestros en la biogénesis mitocondrial, PGC-1 α y NRF1, así como en los marcadores de masa mitocondrial VDAC y ANT. Además, de manera interesante, se ha demostrado que la señalización por TGF- β induce directamente alteraciones mitocondriales (98, 121), favoreciendo de esta manera un círculo vicioso en el desarrollo de la fibrosis renal.

Finalmente, la masa mitocondrial también es regulada por la remoción de ese orgánulo por un proceso especializado de autofagia denominado mitofagia (122). La mitofagia mediada por PINK1 y Parkin es el mecanismo más común para la remoción de mitocondrias dañadas y con cambios de potencial de membrana. En este proceso las mitocondrias son fragmentadas con ayuda de Drp1 hasta poder ser encapsuladas por un autofagosoma (122, 123). Particularmente, en el modelo de OUU, este tipo de mitofagia parece ser controversial, ya que en ratones se ha descrito que los niveles de Parkin disminuyen, pero también que la delección de los genes de Parkin o de PINK1 resultan en un mayor daño, acentuando la fibrosis mediada por TGF- β (18). En contraste con estos hallazgos, nuestros resultados revelan que no hay cambios significativos en los niveles de PINK1 y Parkin en la mitocondria; sin embargo, en la MET se observaron cuerpos autofágicos en las muestras de los riñones obstruidos, además de observar incremento en marcadores de autofagia, sugiriendo que este proceso se está induciendo de

forma independiente a PINK1 y Parkin. Recientemente se han descrito otros tipos de mitofagia independientes a PINK1 y Parkin como las inducidas por MUL1, ARIH1, BNIP3L, TRAF2 y FUNDC1 (53, 55-57); sin embargo, en la OUU no se ha reportado que la mitofagia pueda ser regulada por alguna de estas proteínas, abriendo un nuevo campo de exploración de vías no canónicas de la mitofagia. Otro hallazgo interesante, es que la expresión de la molécula P62 y la disminución del cociente LC3 II/I indican un flujo autofágico deficiente (124, 125), el cual pudiera deberse a una disfunción lisosomal, como se ha informado en la nefropatía diabética (126); sin embargo, más estudios son necesarios para explorar el flujo autofágico durante la OUU.

CONCLUSIÓN

Las alteraciones mitocondriales ocurren de manera temprana y sostenida en el modelo de OUU y anteceden al establecimiento del proceso fibrótico (Figura 15).

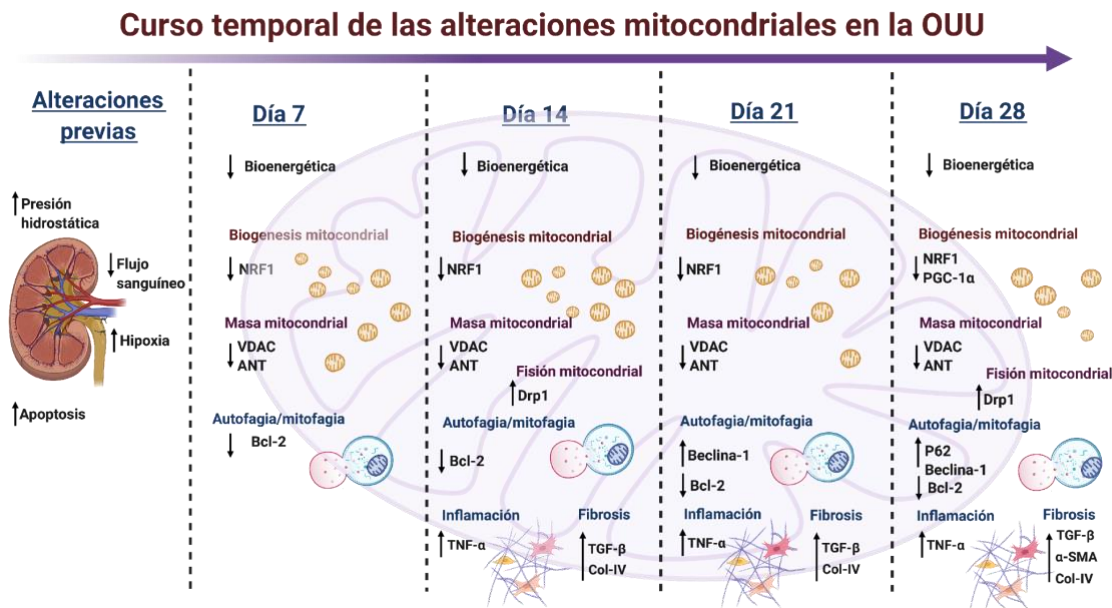


Figura 15. Alteraciones mitocondriales temporales en la progresión de la obstrucción unilateral del uréter (OUU). Factor nuclear respiratorio 1 (NRF1), coactivador 1 alfa del receptor activado por proliferador de peroxisomas (PGC-1α), canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), translocador de adenín-nucleótidos (ANT), proteína 1 parecida a dinamina (Drp1), proteína linfoma 2 de células B (Bcl-2), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), factor de crecimiento transformante beta (TGF-β), colágeno tipo IV (Col-IV), actina alfa de músculo liso (α-SMA). Figura creada en Biorender.

REFERENCIAS

1. Webster AC, Nagler EV, Morton RL, Masson P. Chronic Kidney Disease. *Lancet*. 2017;389(10075):1238-52.
2. Chen TK, Knicely DH, Grams ME. Chronic Kidney Disease Diagnosis and Management: A Review. *JAMA*. 2019;322(13):1294-304.
3. Nishida H, Kurahashi T, Saito Y, Otsuki N, Kwon M, Ohtake H, et al. Kidney fibrosis is independent of the amount of ascorbic acid in mice with unilateral ureteral obstruction. *Free Radic Res*. 2014;48(9):1115-24.
4. Chung SD, Lai TY, Chien CT, Yu HJ. Activating Nrf-2 signaling depresses unilateral ureteral obstruction-evoked mitochondrial stress-related autophagy, apoptosis and pyroptosis in kidney. *PLoS One*. 2012;7(10):e47299.
5. Forbes MS, Thornhill BA, Minor JJ, Gordon KA, Galarreta CI, Chevalier RL. Fight-or-flight: murine unilateral ureteral obstruction causes extensive proximal tubular degeneration, collecting duct dilatation, and minimal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012;303(1):F120-9.
6. Xu Y, Ruan S, Wu X, Chen H, Zheng K, Fu B. Autophagy and apoptosis in tubular cells following unilateral ureteral obstruction are associated with mitochondrial oxidative stress. *Int J Mol Med*. 2013;31(3):628-36.
7. Guo H, Bi X, Zhou P, Zhu S, Ding W. NLRP3 Deficiency Attenuates Renal Fibrosis and Ameliorates Mitochondrial Dysfunction in a Mouse Unilateral Ureteral Obstruction Model of Chronic Kidney Disease. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:8316560.
8. Kendall RT, Feghali-Bostwick CA. Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. *Front Pharmacol*. 2014;5:123.
9. Martinez-Klimova E, Aparicio-Trejo OE, Gomez-Sierra T, Jimenez-Urbe AP, Bellido B, Pedraza-Chaverri J. Mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress in the promotion of fibrosis in obstructive nephropathy induced by unilateral ureteral obstruction. *Biofactors*. 2020;46(5):716-33.
10. Chiang CK, Hsu SP, Wu CT, Huang JW, Cheng HT, Chang YW, et al. Endoplasmic reticulum stress implicated in the development of renal fibrosis. *Mol Med*. 2011;17(11-12):1295-305.
11. Kang HM, Ahn SH, Choi P, Ko YA, Han SH, Chinga F, et al. Defective fatty acid oxidation in renal tubular epithelial cells has a key role in kidney fibrosis development. *Nat Med*. 2015;21(1):37-46.
12. Zhang Y, Sun Y, Ding G, Huang S, Zhang A, Jia Z. Inhibition of Mitochondrial Complex-1 Prevents the Downregulation of NKCC2 and ENaCalpha in Obstructive Kidney Disease. *Sci Rep*. 2015;5:12480.
13. Garcia IM, Altamirano L, Mazzei L, Fornes M, Molina MN, Ferder L, et al. Role of mitochondria in paricalcitol-mediated cytoprotection during obstructive nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012;302(12):F1595-605.
14. Ke Q, Yuan Q, Qin N, Shi C, Luo J, Fang Y, et al. UCP2-induced hypoxia promotes lipid accumulation and tubulointerstitial fibrosis during ischemic kidney injury. *Cell Death Dis*. 2020;11(1):26.

15. Chevalier RL, Forbes MS, Thornhill BA. Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. *Kidney Int.* 2009;75(11):1145-52.
16. Martinez-Klimova E, Aparicio-Trejo OE, Tapia E, Pedraza-Chaverri J. Unilateral Ureteral Obstruction as a Model to Investigate Fibrosis-Attenuating Treatments. *Biomolecules.* 2019;9(4).
17. Liu H, Li W, He Q, Xue J, Wang J, Xiong C, et al. Mass Spectrometry Imaging of Kidney Tissue Sections of Rat Subjected to Unilateral Ureteral Obstruction. *Sci Rep.* 2017;7:41954.
18. Li S, Lin Q, Shao X, Zhu X, Wu J, Wu B, et al. Drp1-regulated PARK2-dependent mitophagy protects against renal fibrosis in unilateral ureteral obstruction. *Free Radic Biol Med.* 2020;152:632-49.
19. Ogobuiro I, Tuma F. *Physiology, Renal.* StatPearls. Treasure Island (FL)2021.
20. Koepfen BM, Stanton BA. *Renal physiology.* Sixth edition. ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2019. x, 211 pages p.
21. Pollak MR, Quaggin SE, Hoenig MP, Dworkin LD. The glomerulus: the sphere of influence. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2014;9(8):1461-9.
22. Schlondorff D, Banas B. The mesangial cell revisited: no cell is an island. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(6):1179-87.
23. Holechek MJ. Glomerular filtration: an overview. *Nephrol Nurs J.* 2003;30(3):285-90; quiz 91-2.
24. Curthoys NP, Moe OW. Proximal tubule function and response to acidosis. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2014;9(9):1627-38.
25. Subramanya AR, Ellison DH. Distal convoluted tubule. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2014;9(12):2147-63.
26. Danziger J, Zeidel ML. Osmotic homeostasis. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2015;10(5):852-62.
27. Shrimanker I, Bhattarai S. *Electrolytes.* StatPearls. Treasure Island (FL)2021.
28. Martini AG, Danser AHJ. Juxtaglomerular Cell Phenotypic Plasticity. *High Blood Press Cardiovasc Prev.* 2017;24(3):231-42.
29. Hamm LL, Nakhoul N, Hering-Smith KS. Acid-Base Homeostasis. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2015;10(12):2232-42.
30. Elliott S, Pham E, Macdougall IC. Erythropoietins: a common mechanism of action. *Exp Hematol.* 2008;36(12):1573-84.
31. Suresh S, Rajvanshi PK, Noguchi CT. The Many Facets of Erythropoietin Physiologic and Metabolic Response. *Front Physiol.* 2019;10:1534.
32. Sizar O, Khare S, Goyal A, Bansal P, Givler A. Vitamin D Deficiency. *StatPearls.* Treasure Island (FL)2021.
33. Dusso AS. Renal vitamin D receptor expression and vitamin D renoprotection. *Kidney Int.* 2012;81(10):937-9.
34. Kumar R, Vallon V. Reduced renal calcium excretion in the absence of sclerostin expression: evidence for a novel calcium-regulating bone kidney axis. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(10):2159-68.
35. Kumar R, Tebben PJ, Thompson JR. Vitamin D and the kidney. *Arch Biochem Biophys.* 2012;523(1):77-86.

36. Wang Z, Ying Z, Bosy-Westphal A, Zhang J, Schautz B, Later W, et al. Specific metabolic rates of major organs and tissues across adulthood: evaluation by mechanistic model of resting energy expenditure. *Am J Clin Nutr.* 2010;92(6):1369-77.
37. Veltri KL, Espiritu M, Singh G. Distinct genomic copy number in mitochondria of different mammalian organs. *J Cell Physiol.* 1990;143(1):160-4.
38. Bhargava P, Schnellmann RG. Mitochondrial energetics in the kidney. *Nat Rev Nephrol.* 2017;13(10):629-46.
39. Zhan M, Brooks C, Liu F, Sun L, Dong Z. Mitochondrial dynamics: regulatory mechanisms and emerging role in renal pathophysiology. *Kidney Int.* 2013;83(4):568-81.
40. Schulz S, Lichtmanegger J, Schmitt S, Leitzinger C, Eberhagen C, Einer C, et al. A protocol for the parallel isolation of intact mitochondria from rat liver, kidney, heart, and brain. *Methods Mol Biol.* 2015;1295:75-86.
41. Benard G, Faustin B, Passerieux E, Galinier A, Rocher C, Bellance N, et al. Physiological diversity of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006;291(6):C1172-82.
42. Prasai K. Regulation of mitochondrial structure and function by protein import: A current review. *Pathophysiology.* 2017;24(3):107-22.
43. Distler AM, Kerner J, Hoppel CL. Proteomics of mitochondrial inner and outer membranes. *Proteomics.* 2008;8(19):4066-82.
44. Kuhlbrandt W. Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biol.* 2015;13:89.
45. van der Bliek AM, Sedensky MM, Morgan PG. Cell Biology of the Mitochondrion. *Genetics.* 2017;207(3):843-71.
46. Scarpulla RC, Vega RB, Kelly DP. Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. *Trends Endocrinol Metab.* 2012;23(9):459-66.
47. Ploumi C, Daskalaki I, Tavernarakis N. Mitochondrial biogenesis and clearance: a balancing act. *FEBS J.* 2017;284(2):183-95.
48. Falkenberg M. Mitochondrial DNA replication in mammalian cells: overview of the pathway. *Essays Biochem.* 2018;62(3):287-96.
49. Mokranjac D, Neupert W. The many faces of the mitochondrial TIM23 complex. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1797(6-7):1045-54.
50. Goo CK, Lim HY, Ho QS, Too HP, Clement MV, Wong KP. PTEN/Akt signaling controls mitochondrial respiratory capacity through 4E-BP1. *PLoS One.* 2012;7(9):e45806.
51. Wang L, Lu G, Shen HM. The Long and the Short of PTEN in the Regulation of Mitophagy. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:299.
52. Palikaras K, Tavernarakis N. Mitochondrial homeostasis: the interplay between mitophagy and mitochondrial biogenesis. *Exp Gerontol.* 2014;56:182-8.
53. Bakula D, Scheibye-Knudsen M. MitophAging: Mitophagy in Aging and Disease. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:239.
54. Bayne AN, Trempe JF. Mechanisms of PINK1, ubiquitin and Parkin interactions in mitochondrial quality control and beyond. *Cell Mol Life Sci.* 2019;76(23):4589-611.
55. Killackey SA, Philpott DJ, Girardin SE. Mitophagy pathways in health and disease. *J Cell Biol.* 2020;219(11).

56. Villa E, Marchetti S, Ricci JE. No Parkin Zone: Mitophagy without Parkin. *Trends Cell Biol.* 2018;28(11):882-95.
57. Praharaj PP, Naik PP, Panigrahi DP, Bhol CS, Mahapatra KK, Patra S, et al. Intricate role of mitochondrial lipid in mitophagy and mitochondrial apoptosis: its implication in cancer therapeutics. *Cell Mol Life Sci.* 2019;76(9):1641-52.
58. Andersen MJ, Agarwal R. Etiology and management of hypertension in chronic kidney disease. *Med Clin North Am.* 2005;89(3):525-47.
59. Romagnani P, Remuzzi G, Glassock R, Levin A, Jager KJ, Tonelli M, et al. Chronic kidney disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2017;3:17088.
60. Panizo S, Martinez-Arias L, Alonso-Montes C, Cannata P, Martin-Carro B, Fernandez-Martin JL, et al. Fibrosis in Chronic Kidney Disease: Pathogenesis and Consequences. *Int J Mol Sci.* 2021;22(1).
61. Bello AK, Levin A, Tonelli M, Okpechi IG, Feehally J, Harris D, et al. Assessment of Global Kidney Health Care Status. *JAMA.* 2017;317(18):1864-81.
62. Ucer AC, Benito-Martin A, Izquierdo MC, Sanchez-Nino MD, Sanz AB, Ramos AM, et al. Unilateral ureteral obstruction: beyond obstruction. *Int Urol Nephrol.* 2014;46(4):765-76.
63. Chevalier RL. Pathogenesis of renal injury in obstructive uropathy. *Curr Opin Pediatr.* 2006;18(2):153-60.
64. Dhondup T, Kittanamongkolchai W, Vaughan LE, Mehta RA, Chhina JK, Enders FT, et al. Risk of ESRD and Mortality in Kidney and Bladder Stone Formers. *Am J Kidney Dis.* 2018;72(6):790-7.
65. Oefelein MG. Prognostic significance of obstructive uropathy in advanced prostate cancer. *Urology.* 2004;63(6):1117-21.
66. Hewitson TD, Ono T, Becker GJ. Small animal models of kidney disease: a review. *Methods Mol Biol.* 2009;466:41-57.
67. Eming SA, Wynn TA, Martin P. Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration. *Science.* 2017;356(6342):1026-30.
68. Weiskirchen R, Weiskirchen S, Tacke F. Organ and tissue fibrosis: Molecular signals, cellular mechanisms and translational implications. *Mol Aspects Med.* 2019;65:2-15.
69. Djudjaj S, Boor P. Cellular and molecular mechanisms of kidney fibrosis. *Mol Aspects Med.* 2019;65:16-36.
70. Heldin CH, Moustakas A. Signaling Receptors for TGF-beta Family Members. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016;8(8).
71. Distler JHW, Gyorfi AH, Ramanujam M, Whitfield ML, Konigshoff M, Lafyatis R. Shared and distinct mechanisms of fibrosis. *Nat Rev Rheumatol.* 2019;15(12):705-30.
72. Moustakas A, Heldin CH. Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci.* 2005;118(Pt 16):3573-84.
73. Ranganathan P, Agrawal A, Bhushan R, Chavalmane AK, Kalathur RK, Takahashi T, et al. Expression profiling of genes regulated by TGF-beta: differential regulation in normal and tumour cells. *BMC Genomics.* 2007;8:98.
74. Eirin A, Lerman A, Lerman LO. The Emerging Role of Mitochondrial Targeting in Kidney Disease. *Handb Exp Pharmacol.* 2017;240:229-50.

75. Irazabal MV, Torres VE. Reactive Oxygen Species and Redox Signaling in Chronic Kidney Disease. *Cells*. 2020;9(6).
76. Tang C, Cai J, Yin XM, Weinberg JM, Venkatachalam MA, Dong Z. Mitochondrial quality control in kidney injury and repair. *Nat Rev Nephrol*. 2021;17(5):299-318.
77. Galloway CA, Lee H, Nejjari S, Jhun BS, Yu T, Hsu W, et al. Transgenic control of mitochondrial fission induces mitochondrial uncoupling and relieves diabetic oxidative stress. *Diabetes*. 2012;61(8):2093-104.
78. Zhan M, Usman IM, Sun L, Kanwar YS. Disruption of renal tubular mitochondrial quality control by Myo-inositol oxygenase in diabetic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(6):1304-21.
79. Ayanga BA, Badal SS, Wang Y, Galvan DL, Chang BH, Schumacker PT, et al. Dynamin-Related Protein 1 Deficiency Improves Mitochondrial Fitness and Protects against Progression of Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(9):2733-47.
80. Dugan LL, You YH, Ali SS, Diamond-Stanic M, Miyamoto S, DeClevés AE, et al. AMPK dysregulation promotes diabetes-related reduction of superoxide and mitochondrial function. *J Clin Invest*. 2013;123(11):4888-99.
81. Nakatani Y, Inagi R. Epigenetic Regulation Through SIRT1 in Podocytes. *Curr Hypertens Rev*. 2016;12(2):89-94.
82. Hasegawa K, Wakino S, Simic P, Sakamaki Y, Minakuchi H, Fujimura K, et al. Renal tubular Sirt1 attenuates diabetic albuminuria by epigenetically suppressing Claudin-1 overexpression in podocytes. *Nat Med*. 2013;19(11):1496-504.
83. Wu Y, Wang L, Wang X, Wang Y, Zhang Q, Liu W. Renalase contributes to protection against renal fibrosis via inhibiting oxidative stress in rats. *Int Urol Nephrol*. 2018;50(7):1347-54.
84. Cheng X, Zheng X, Song Y, Qu L, Tang J, Meng L, et al. Apocynin attenuates renal fibrosis via inhibition of NOXs-ROS-ERK-myofibroblast accumulation in UUO rats. *Free Radic Res*. 2016;50(8):840-52.
85. Noh MR, Woo CH, Park MJ, In Kim J, Park KM. Ablation of C/EBP homologous protein attenuates renal fibrosis after ureteral obstruction by reducing autophagy and microtubule disruption. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2018;1864(5 Pt A):1634-41.
86. Ding H, Bai F, Cao H, Xu J, Fang L, Wu J, et al. PDE/cAMP/Epac/C/EBP-beta Signaling Cascade Regulates Mitochondria Biogenesis of Tubular Epithelial Cells in Renal Fibrosis. *Antioxid Redox Signal*. 2018;29(7):637-52.
87. Sugimoto MA, Sousa LP, Pinho V, Perretti M, Teixeira MM. Resolution of Inflammation: What Controls Its Onset? *Front Immunol*. 2016;7:160.
88. Ueha S, Shand FH, Matsushima K. Cellular and molecular mechanisms of chronic inflammation-associated organ fibrosis. *Front Immunol*. 2012;3:71.
89. Campbell CT, Kolesar JE, Kaufman BA. Mitochondrial transcription factor A regulates mitochondrial transcription initiation, DNA packaging, and genome copy number. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1819(9-10):921-9.
90. Fontecha-Barriuso M, Martin-Sanchez D, Martinez-Moreno JM, Monsalve M, Ramos AM, Sanchez-Nino MD, et al. The Role of PGC-1alpha and Mitochondrial Biogenesis in Kidney Diseases. *Biomolecules*. 2020;10(2).
91. Humphreys BD. Mechanisms of Renal Fibrosis. *Annu Rev Physiol*. 2018;80:309-26.

92. Pimentel JL, Jr., Montero A, Wang S, Yosipiv I, el-Dahr S, Martinez-Maldonado M. Sequential changes in renal expression of renin-angiotensin system genes in acute unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int.* 1995;48(4):1247-53.
93. Chevalier RL, Thornhill BA, Gomez RA. EDRF modulates renal hemodynamics during unilateral ureteral obstruction in the rat. *Kidney Int.* 1992;42(2):400-6.
94. Purkerson ML, Klahr S. Prior inhibition of vasoconstrictors normalizes GFR in postobstructed kidneys. *Kidney Int.* 1989;35(6):1305-14.
95. Topcu SO, Celik S, Erturhan S, Erbagci A, Yagci F, Ucak R. Verapamil prevents the apoptotic and hemodynamic changes in response to unilateral ureteral obstruction. *Int J Urol.* 2008;15(4):350-5.
96. Jensen AM, Norregaard R, Topcu SO, Frokiaer J, Pedersen M. Oxygen tension correlates with regional blood flow in obstructed rat kidney. *J Exp Biol.* 2009;212(19):3156-63.
97. Aparicio-Trejo OE, Tapia E, Sanchez-Lozada LG, Pedraza-Chaverri J. Mitochondrial bioenergetics, redox state, dynamics and turnover alterations in renal mass reduction models of chronic kidney diseases and their possible implications in the progression of this illness. *Pharmacol Res.* 2018;135:1-11.
98. Casalena G, Daehn I, Bottinger E. Transforming growth factor-beta, bioenergetics, and mitochondria in renal disease. *Semin Nephrol.* 2012;32(3):295-303.
99. Dendooven A, Ishola DA, Jr., Nguyen TQ, Van der Giezen DM, Kok RJ, Goldschmeding R, et al. Oxidative stress in obstructive nephropathy. *Int J Exp Pathol.* 2011;92(3):202-10.
100. Wyczanska M, Lange-Sperandio B. DAMPs in Unilateral Ureteral Obstruction. *Front Immunol.* 2020;11:581300.
101. Shen Y, Miao NJ, Xu JL, Gan XX, Xu D, Zhou L, et al. N-acetylcysteine alleviates angiotensin II-mediated renal fibrosis in mouse obstructed kidneys. *Acta Pharmacol Sin.* 2016;37(5):637-44.
102. Souza AC, Bocharov AV, Baranova IN, Vishnyakova TG, Huang YG, Wilkins KJ, et al. Antagonism of scavenger receptor CD36 by 5A peptide prevents chronic kidney disease progression in mice independent of blood pressure regulation. *Kidney Int.* 2016;89(4):809-22.
103. Kamijo-Ikemori A, Sugaya T, Obama A, Hiroi J, Miura H, Watanabe M, et al. Liver-type fatty acid-binding protein attenuates renal injury induced by unilateral ureteral obstruction. *Am J Pathol.* 2006;169(4):1107-17.
104. Li J, Qu X, Ricardo SD, Bertram JF, Nikolic-Paterson DJ. Resveratrol inhibits renal fibrosis in the obstructed kidney: potential role in deacetylation of Smad3. *Am J Pathol.* 2010;177(3):1065-71.
105. Bhatia D, Capili A, Choi ME. Mitochondrial dysfunction in kidney injury, inflammation, and disease: Potential therapeutic approaches. *Kidney Res Clin Pract.* 2020;39(3):244-58.
106. Qin J, Peng ZZ, Li Q, Wen R, Tao LJ. Renal Fibrosis and Mitochondrial Damage. *Chin Med J (Engl).* 2018;131(22):2769-72.
107. Szeto HH. Pharmacologic Approaches to Improve Mitochondrial Function in AKI and CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28(10):2856-65.

108. Schiffer TA, Friederich-Persson M. Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Kidney Hypoxia in the Development of Diabetic Nephropathy. *Front Physiol.* 2017;8:211.
109. Liu Y, Wang Y, Ding W, Wang Y. Mito-TEMPO Alleviates Renal Fibrosis by Reducing Inflammation, Mitochondrial Dysfunction, and Endoplasmic Reticulum Stress. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:5828120.
110. Burlaka I, Nilsson LM, Scott L, Holtback U, Eklof AC, Fogo AB, et al. Prevention of apoptosis averts glomerular tubular disconnection and podocyte loss in proteinuric kidney disease. *Kidney Int.* 2016;90(1):135-48.
111. Kim SM, Kim YG, Kim DJ, Park SH, Jeong KH, Lee YH, et al. Inflammasome-Independent Role of NLRP3 Mediates Mitochondrial Regulation in Renal Injury. *Front Immunol.* 2018;9:2563.
112. Zhang H, Wang Z. Effect and Regulation of the NLRP3 Inflammasome During Renal Fibrosis. *Front Cell Dev Biol.* 2019;7:379.
113. Yin XN, Wang J, Cui LF, Fan WX. Enhanced glycolysis in the process of renal fibrosis aggravated the development of chronic kidney disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2018;22(13):4243-51.
114. Ding H, Jiang L, Xu J, Bai F, Zhou Y, Yuan Q, et al. Inhibiting aerobic glycolysis suppresses renal interstitial fibroblast activation and renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2017;313(3):F561-F75.
115. Tannenbaum J, Purkerson ML, Klahr S. Effect of unilateral ureteral obstruction on metabolism of renal lipids in the rat. *Am J Physiol.* 1983;245(2):F254-62.
116. Moosavi SM, Ashtiyani SC, Hosseinkhani S, Shirazi M. Comparison of the effects of L-carnitine and alpha-tocopherol on acute ureteral obstruction-induced renal oxidative imbalance and altered energy metabolism in rats. *Urol Res.* 2010;38(3):187-94.
117. Nishi H, Higashihara T, Inagi R. Lipotoxicity in Kidney, Heart, and Skeletal Muscle Dysfunction. *Nutrients.* 2019;11(7).
118. Yang X, Okamura DM, Lu X, Chen Y, Moorhead J, Varghese Z, et al. CD36 in chronic kidney disease: novel insights and therapeutic opportunities. *Nat Rev Nephrol.* 2017;13(12):769-81.
119. Alpern RJ, Moe OW, Caplan MJ. Seldin and Giebisch's the kidney : physiology & pathophysiology. Fifth edition / ed. Amsterdam: Elsevier/AP; 2013. 2 volumes p.
120. Weinberg JM. Mitochondrial biogenesis in kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22(3):431-6.
121. Liu RM, Desai LP. Reciprocal regulation of TGF-beta and reactive oxygen species: A perverse cycle for fibrosis. *Redox Biol.* 2015;6:565-77.
122. Pickles S, Vigie P, Youle RJ. Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance. *Curr Biol.* 2018;28(4):R170-R85.
123. Montava-Garriga L, Ganley IG. Outstanding Questions in Mitophagy: What We Do and Do Not Know. *J Mol Biol.* 2020;432(1):206-30.
124. Bian A, Shi M, Flores B, Gillings N, Li P, Yan SX, et al. Downregulation of autophagy is associated with severe ischemia-reperfusion-induced acute kidney injury in overexpressing C-reactive protein mice. *PLoS One.* 2017;12(9):e0181848.

125. Huang C, Zhang Y, Kelly DJ, Tan CY, Gill A, Cheng D, et al. Thioredoxin interacting protein (TXNIP) regulates tubular autophagy and mitophagy in diabetic nephropathy through the mTOR signaling pathway. *Sci Rep.* 2016;6:29196.
126. Yuan Y, Chen Y, Peng T, Li L, Zhu W, Liu F, et al. Mitochondrial ROS-induced lysosomal dysfunction impairs autophagic flux and contributes to M1 macrophage polarization in a diabetic condition. *Clin Sci (Lond).* 2019;133(15):1759-77.