



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

**MECANISMOS DE PROTECCIÓN DE LA ISOLIQURITIGENINA EN LA
TOXICIDAD RENAL INDUCIDA POR CISPLATINO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. TANIA GÓMEZ SIERRA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

Dr. José Pedraza Chaverri

Facultad de Química, UNAM

COMITÉ TUTOR:

Dra. Diana Barrera Oviedo

Facultad de Medicina, UNAM

Dra. Rebeca López Marure

Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX.

2022



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

**MECANISMOS DE PROTECCIÓN DE LA ISOLIQURITIGENINA EN LA
TOXICIDAD RENAL INDUCIDA POR CISPLATINO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. TANIA GÓMEZ SIERRA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

Dr. José Pedraza Chaverri
Facultad de Química, UNAM

COMITÉ TUTOR:

Dra. Diana Barrera Oviedo
Facultad de Medicina, UNAM

Dra. Rebeca López Marure
Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX.

2022

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN ACADÉMICA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
OFICIO FCIE/DAIP/011/2022
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente.

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **22 de noviembre de 2021** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la estudiante **GÓMEZ SIERRA TANIA** con número de cuenta **303047975** con la tesis titulada: "**Mecanismos de protección de la isoliquiritigenina en la toxicidad renal inducida por cisplatino**", realizada bajo la dirección del (la) **DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI**:

Presidente: **DRA. LAURA GABRIELA SÁNCHEZ LOZADA**
Vocal: **DRA. YOLANDA IRASEMA CHIRINO LÓPEZ**
Vocal: **DR. ARTURO EDGAR ZENTENO GALINDO**
Vocal: **DR. RENÉ DE JESÚS CÁRDENAS VÁZQUEZ**
Secretario: **DRA. REBECA LÓPEZ MARURE**

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 15 de febrero de 2022

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

**Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de México (UNAM),
por permitirme realizar mis estudios de doctorado.**

**Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para
la realización de mis estudios de doctorado en el Programa en Ciencias Biológicas,
UNAM.**

**Este proyecto fue financiado por el CONACYT (A1-S7495), el Programa de Apoyo a
Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT, IN202219), la
Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM y el Programa de
Apoyo a la Investigación y al Posgrado (PAIP, 5000-9105).**

**A mi tutor principal el Dr. José Pedraza Chaverri por su orientación y apoyo durante
la realización de mis estudios de doctorado en el laboratorio 315 del edificio F,
Departamento de Biología de la Facultad de Química de la UNAM.**

**Al Comité Tutorial conformado por la Dra. Diana Barrera Oviedo y la Dra. Rebeca
López Marure por asesorar el desarrollo de este trabajo.**

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Al Dr. José Pedraza Chaverri por permitirme trabajar en su laboratorio y ser una pieza fundamental en mi formación profesional.

Al M. en C. Omar Noel Medina Campos por su asesoramiento técnico y las pláticas en el laboratorio.

Al M. en C. José Dolores Solano Becerra por su asesoramiento técnico en el cultivo celular.

A la Dra. Estefany Ingrid Medina Reyes por su apoyo y asesoramiento técnico en las inmunocitoquímicas.

Al M. en C. Pedro Rojas Morales por su apoyo técnico para la obtención de las muestras del modelo *in vivo*.

A mis compañeras y compañeros de laboratorio por todas las experiencias, hazañas, alegrías y frustraciones que compartimos.

DEDICATORIAS PERSONALES

A mis padres y a mi hermana por su apoyo y amor incondicional. Han sido y serán un ejemplo e inspiración en mi vida.

A Bolo, mi fiel y paciente compañero de cuatro patitas.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

ABREVIATURAS

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 Cisplatino (CP)	4
1.1.1 Mecanismos de toxicidad del CP	5
1.2 Especies reactivas y estrés oxidante	9
1.3 Estrés de retículo endoplásmico (RE).....	11
1.3.1 Estrategias para regular el estrés del retículo endoplásmico (RE) en enfermedades renales.....	15
1.4 Isoliquiritigenina (IsoLQ)	20
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	22
3. HIPÓTESIS	23
4. OBJETIVOS	23
4.1 Objetivos generales.....	23
4.2 Objetivos específicos	23
5. DISEÑO EXPERIMENTAL	24
5.1 Modelo <i>in vitro</i>	24
5.1.1 Primera etapa.....	24
5.1.2 Segunda etapa.....	24
5.2 Modelo <i>in vivo</i>	25
6. MÉTODOS	27
6.1 Reactivos.....	27
6.2 Cultivo celular.....	27

6.3 Viabilidad celular.....	28
6.4 Extracción de fracciones totales de proteínas para western blot.....	28
6.5 Evaluación del estrés de RE.....	28
6.5.1 Expresión de proteínas por western blot	28
6.5.2 Expresión de proteínas por inmunocitoquímica.....	29
6.6 Evaluación del estrés oxidante.....	29
6.6.1 Producción de especies reactivas de oxígeno (ERO).....	29
6.6.2 Marcadores de estrés oxidante	30
6.6.2.1 Medición de la relación GSH/GSSG.....	30
6.6.2.2 Contenido de tioles totales.....	30
6.6.2.3 Medición del contenido de malondialdehído (MDA).....	30
6.6.3 Actividad de enzimas antioxidantes	30
6.6.3.1 Catalasa (CAT).....	30
6.6.3.2 Glutación peroxidasa (GPx).....	30
6.6.3.3 Glutación reductasa (GR).....	31
6.6.3.4 Glutación S-transferasa (GST).....	31
6.6.3.5 Superóxido dismutasa (SOD).....	31
6.7 Evaluación de la función renal en plasma.....	31
6.7.1 Creatinina	31
6.7.2 Nitrógeno ureico en sangre (BUN, blood urea nitrogen).....	31
6.7.3 Actividad de glutación peroxidasa (GPx).....	31
6.8 Análisis estadístico	32
7. RESULTADOS	32
7.1 Determinación de la concentración media inhibitoria (IC ₅₀) del CP y de la IsoLQ ...	32

7.2 Determinación de la concentración protectora de la IsoLQ y el tiempo de pre-tratamiento contra la toxicidad inducida por el CP en las células LLC-PK1	33
7.3 El pre-tratamiento con la IsoLQ induce estrés de RE.....	35
7.4 El pre-tratamiento con la IsoLQ aumenta el estrés de RE y activa la vía de PERK en la toxicidad inducida por el CP en células LLC-PK1	36
7.5 La hormesis inducida por la IsoLQ atenúa el estrés oxidante en las células LLC-PK1 tratadas con el CP	40
7.5.1 La NOS es la fuente de producción de las ERO en las células LLC-PK1 pre-tratadas con la IsoLQ y con el CP en un estudio de curso temporal	41
7.6 El pre-tratamiento con la IsoLQ disminuye el daño renal en la nefrotoxicidad inducida por el CP en ratas	42
7.7 El pre-tratamiento con la IsoLQ no induce estrés de RE en la nefrotoxicidad inducida por CP en ratas	43
7.8 El pre-tratamiento con la IsoLQ previene la disminución del sistema antioxidante y atenúa el estrés oxidante en la toxicidad renal inducida por el CP en ratas.....	44
8. DISCUSIÓN.....	46
9. CONCLUSIONES.....	54
10. PERSPECTIVAS	54
11. REFERENCIAS	55
ANEXO 1	76
ANEXO 2	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de las principales vías involucradas en la nefrotoxicidad inducida por cisplatino (CP).....	8
Figura 2. Estrés de retículo endoplásmico (RE) y la vía de señalización de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR).....	14
Figura 3. Estructura química de la isoliquiritigenina (IsoLQ).....	20
Figura 4. Estrategia general de experimentación en el modelo <i>in vitro</i>	25
Figura 5. Esquema de tratamiento en el modelo <i>in vivo</i>	26
Figura 6. Concentración media inhibitoria en las células LLC-PK1. A) Tratamiento con cisplatino (CP) durante 24 h.	32
Figura 7. Curva hormética de dosis-respuesta de la isoliquiritigenina (IsoLQ) en células tratadas 24 h con el cisplatino (CP).....	33
Figura 8. El pre-tratamiento con la isoliquiritigenina (IsoLQ) atenúa la disminución de la viabilidad celular ocasionada por el cisplatino (CP).	34
Figura 9. Imágenes en campo claro de las células LLC-PK1 pre-tratadas 6 h con la isoliquiritigenina (IsoLQ) 25 μ M y posteriormente con el cisplatino (CP) por 24 h.	35
Figura 10. El pre-tratamiento con la isoliquiritigenina (IsoLQ) induce el estrés de retículo endoplásmico (RE) en las células LLC-PK1.....	36
Figura 11. Estrés de retículo endoplásmico (RE) en células LLC-PK1. A) Tratamiento con el cisplatino (CP) 40 μ M.	37
Figura 12. La vía de la proteína cinasa del retículo endoplásmico activada por ARN de doble cadena se activa en las células LLC-PK1.....	39
Figura 13. La activación del activador del factor de transcripción 4 (ATF4) es temporal en la toxicidad inducida por el cisplatino (CP) en las células LLC-PK1.....	40
Figura 14. La óxido nítrico sintasa (NOS) es la principal fuente de producción de las especies reactivas de oxígeno (ERO) en las células LLC-PK1 pre-tratadas 8 h con la isoliquiritigenina (IsoLQ) y subsecuentemente con el cisplatino (CP).....	42

Figura 15. Efecto del pre-tratamiento con la isoliquiritigenina (IsoLQ) en el peso corporal y marcadores de daño renal en la toxicidad inducida por cisplatino (CP).	43
Figura 16. El pre-tratamiento con la isoliquiritigenina (IsoLQ) no induce estrés de retículo endoplásmico (RE).	44
Figura 17. El pre-tratamiento con la isoliquiritigenina (IsoLQ) disminuye el estrés oxidante en la nefrotoxicidad inducida por cisplatino (CP) en ratas.....	45
Figura 18. Esquema integrativo del modelo <i>in vitro</i>	51
Figura 19. Esquema integrativo del modelo <i>in vivo</i>	53
Figura 20. Expresión de proteínas de la vía de PERK.....	76
Figura 21. Efecto del co-tratamiento con la isoliquiritigenina (IsoLQ) en el peso corporal y marcadores de daño renal en la toxicidad inducida por el cisplatino (CP).....	77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Inhibición del estrés de RE en modelos experimentales de daño renal.	16
Tabla 2. Efecto hormético al estrés de RE en modelos experimentales de daño renal.	18
Tabla 3. Hormesis inducida por el pre-tratamiento con isoliquiritigenina (IsoLQ) sobre el estrés oxidante en células LLC-PK1 después del tratamiento con cisplatino (CP).	41

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ATF4	Activador del factor de transcripción 4, del inglés Activating Transcription Factor 4
ATF6	Activador del factor de transcripción 4, del inglés Activating Transcription Factor 6
ATP	Adenosín trifosfato
BUN	Nitrógeno de urea en sangre, del inglés Blood Urea Nitrogen
CAT	Catalasa
CHOP	Proteína homóloga potenciadora de la unión a CCAAT
CP	Cisplatino
Ctr-1	Transportador de cobre 1

DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño, del inglés Damage-Associated Molecular Pattern
DMEM	Medio eagle modificado por Dulbecco, del inglés Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DPI	Difenileneodonio
EEM	Error estándar de la media
eIF2α	Factor de iniciación eucariota 2 alfa
EGCG	Epigallocatequina 3-galato
ERAD	Sistema de degradación asociada al retículo endoplásmico, del inglés Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation
ERC	Enfermedad renal crónica
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FDA	Diacetato de fluoresceína, del inglés Fluorescein diacetate
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GRP78	Proteína regulada por glucosa de 78 kDa
GRP94	Proteína regulada por glucosa de 94 kDa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
GST	Glutación S-transferasa
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
IC₅₀	Concentración media inhibitoria
IRA	Insuficiencia renal aguda
IRE1α	Proteína cinasa dependiente de inositol alfa, del inglés Inositol-Requiring kinase/Endonucleases
IsoLQ	Isoliquiritigenina
JNK	Cinasa N-terminal c-Jun
MDA	Malondialdehído
L-NAME	N-nitro-L-arginina metil éster
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NO\cdot	Óxido nítrico

N₂O₃	Trióxido de dinitrógeno
NOS	Óxido nítrico sintasa
NOX	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa
Nrf2	Factor nuclear eritroide 2, del inglés Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2
OCT-2	Transportador de cationes orgánicos 2
¹O₂	Oxígeno singulete
O₂⁻	Anión superóxido
HO[•]	Radical hidroxilo
H₂DCFDA	Diacetato de diclorodihidrofluoresceína
ONOO⁻	Anión peroxinitrito
ORP150	Proteína regulada por oxígeno 150
4-PBA	Ácido 4-fenilbutírico
PDI	Proteína disulfuro isomerasa
PERK	Proteína cinasa del retículo endoplásmico activada por ARN de doble cadena, del inglés Protein kinase activated by double-stranded RNA(PKR)-like ER Kinase
RE	Retículo endoplásmico
RO[•]	Radical alcoxilo
ROO[•]	Radical peroxilo
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SERCA	Bomba ATPasa de calcio del retículo sarco/endoplásmico
SFB	Suero fetal bovino
SOD	Superóxido dismutasa
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRAF2	Receptor del factor de necrosis tumoral 2
UDCA	Ácido ursodesoxicólico
UPR	Respuesta a proteínas no plegadas, del inglés Unfolded Protein Response
XBP1	Proteína de unión a la caja X1

RESUMEN

El cisplatino (CP) es un fármaco antineoplásico que induce nefrotoxicidad como efecto secundario. El estrés oxidante y el estrés de retículo endoplásmico (RE) son algunos de los mecanismos de daño involucrados en la nefrotoxicidad inducida por el CP. La isoliquiritigenina (IsoLQ) es un flavonoide con propiedades antioxidantes e inductor de estrés de RE en células cancerosas. Los estudios *in vitro* e *in vivo* han revelado que la hormesis mediada por el estrés de RE es citoprotectora; por lo tanto, los antioxidantes naturales y los inductores de estrés de RE se han utilizado para prevenir la lesión renal. Este estudio tiene como objetivo explorar si el pre-tratamiento con la IsoLQ induce estrés de RE, produce hormesis y atenúa el estrés oxidante para proteger a las células epiteliales renales de cerdo (LLC-PK1) y al riñón de rata en la toxicidad inducida por CP.

Durante la primera etapa del estudio en el modelo *in vitro*, se determinaron la concentración protectora y el tiempo de pre-tratamiento de la IsoLQ en la toxicidad inducida por el CP. En la segunda etapa del modelo *in vitro*, se evaluó el efecto del pre-tratamiento con la IsoLQ sobre la viabilidad celular, el estrés de RE y el estrés oxidante. El pre-tratamiento con la IsoLQ en células tratadas con el CP induce la expresión de las proteínas reguladas por glucosa de 78 y 94 kDa (GRP78 y GRP94, respectivamente), el activador del factor de transcripción 4 (ATF4) y la beclina-1 y atenúa la muerte celular inducida por el CP. Además, disminuye producción de las especies reactivas de oxígeno (ERO) y previene la disminución de la relación glutatión/glutatión disulfuro (GSH/GSSG), los niveles de tioles libres y la actividad de la glutatión reductasa (GR). Estos datos sugieren que el pre-tratamiento con la IsoLQ tiene un efecto protector moderado sobre la toxicidad inducida por el CP en las células LLC-PK1, a través de la hormesis mediada por el estrés de RE, así como por las propiedades antioxidantes de la IsoLQ.

Por otro lado, en el modelo murino el pre-tratamiento con la IsoLQ disminuyó el incremento en los niveles de creatinina plasmática y el nitrógeno de urea en sangre (BUN) causados por el CP. No se observan cambios en la expresión proteica de GRP78 y GRP94 en la corteza renal. Por lo tanto, se sugiere realizar un aislamiento de cada sección de la nefrona, para observar los cambios en la expresión proteica de estas chaperonas en el

glomérulo, túbulo distal y túbulo proximal. Sin embargo, el pre-tratamiento con la IsoLQ previene la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes GR y glutatión peroxidasa (GPx) y atenúa la lipoperoxidación en la corteza renal. Estos datos sugieren que el efecto protector de la IsoLQ con la dosis y esquema de tratamiento utilizado en el modelo *in vivo* está relacionado con sus propiedades antioxidantes.

ABSTRACT

Cisplatin (CP) is an antineoplastic drug that induces nephrotoxicity as a side effect, among others. Oxidative stress and endoplasmic reticulum (ER) stress are some of the damage mechanisms involved in CP-induced nephrotoxicity. Isoliquiritigenin (IsoLQ) is a flavonoid with antioxidant properties and an inducer of ER stress in cancer cells. *In vitro* and *in vivo* studies have revealed that ER stress-mediated hormesis is cytoprotective; therefore, natural antioxidants and stress inducers of ER have been used to prevent kidney injury. This study aims to explore whether IsoLQ pre-treatment induces ER stress, produces hormesis and attenuates oxidative stress to protect porcine renal epithelial cells (LLC-PK1) and rat kidney against CP-induced toxicity.

During the first stage of the study in the *in vitro* model, the protective concentration and pre-treatment time of IsoLQ against CP-induced toxicity were determined. In the second stage of the *in vitro* model, the effect of IsoLQ pre-treatment on cell viability, ER stress and oxidative stress was evaluated. IsoLQ pre-treatment in cells treated with CP induces the expression of glucose-regulated proteins 78 and 94 kDa (GRP78 and GRP94, respectively), the activating transcription factor 4 (ATF4) and beclin-1 and attenuates the CP-induced cell death. In addition, it reduces the production of reactive oxygen species (ROS) and prevents the decrease in glutathione/glutathione disulfide ratio (GSH/GSSG), free thiols levels and glutathione reductase activity (GR). These data suggest that IsoLQ pre-treatment has a moderate protective effect on CP-induced toxicity in LLC-PK1 cells, through ER stress-mediated hormesis, as well as the antioxidant properties of IsoLQ.

On the other hand, in the murine model, IsoLQ pre-treatment decreased the increased in plasma creatinine and blood urea nitrogen (BUN) caused by CP. No changes were observed in protein expression of GRP78 and GRP94 in renal cortex. Therefore, it is suggested to

perform an isolation of each section of the nephron, to observe changes in protein expression of GRP78 and GRP94 in glomerulus, distal and proximal tubules. However, IsoLQ pre-treatment prevents the decrease in the activity of the antioxidant enzymes GR and glutathione peroxidase (GPx) and attenuates lipoperoxidation in renal cortex. These data suggest that the protective effect of IsoLQ with the dose and treatment scheme used in the *in vivo* model is attributed to its antioxidant properties.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cisplatino (CP)

El *cis*-diaminodicloroplatino II (cisplatino, CP) es un fármaco antineoplásico utilizado para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer: cabeza, cuello, vejiga, pulmón, estómago, útero y testículos. El uso clínico del CP fue aprobado por la Administración de Medicamentos y Alimentos (Food and Drug Administration) desde 1978 para su uso clínico, sin embargo, induce efectos colaterales relevantes, por ejemplo, la nefrotoxicidad (Einhorn & Donohue, 2002; Hu et al., 2014). Algunos estudios han indicado que aproximadamente del 25-35% de los pacientes tratados con el CP desarrollan daño renal (dos Santos et al., 2012; Miller et al., 2010; Sancho-Martínez et al., 2012). Sin embargo, un estudio del 2015 describió que el 68% de los pacientes con cáncer de cabeza y cuello tratados con el CP y la radioterapia desarrollaron insuficiencia renal aguda (IRA), independientemente del tratamiento con líquidos y con manitol, utilizados habitualmente como terapia adyuvante (Bhat et al., 2015). Actualmente, el tratamiento con el CP de la mayoría de los pacientes con cáncer es administrado en dosis bajas de manera repetitiva, en lugar de una dosis alta, para evitar el daño renal (Sharp & Siskind, 2017). Aunque este enfoque puede prevenir la IRA, la administración continua del CP genera un aumento progresivo de inflamación que produce enfermedad renal crónica (ERC) y con ello el desarrollo de fibrosis (Okada et al., 2017; Sharp et al., 2016; Sharp & Siskind, 2017).

La administración terapéutica del CP se realiza por vía intravenosa y se distribuye en el riñón, hígado e intestinos. Este fármaco es eliminado vía urinaria por filtración glomerular y secreción tubular y se acumula en las células renales, particularmente en los túbulos proximales y distales (Arany & Safirstein, 2003). El daño renal se caracteriza por el incremento en los niveles de nitrógeno de urea en sangre (BUN, blood urea nitrogen), creatinina sérica, glucosuria y proteinuria y la disminución de la tasa de filtración glomerular (Miller et al., 2010).

El CP ingresa a la célula a través de los transportadores de cationes orgánicos 2 (OCT-2) y el de cobre 1 (Ctr-1), localizados principalmente en las membranas de las células del túbulo proximal (Arany & Safirstein, 2003; Miller et al., 2010; Pabla & Dong, 2008; Yao et al.,

2007). En el interior de las células, se bioactiva al hidrolizarse los átomos de cloro, formando un compuesto electrófilo, el cual reacciona con macromoléculas y subsecuentemente, induce daño celular (Miller et al., 2010; Pascoe & Roberts, 1974).

El mecanismo de nefrotoxicidad por el CP se ha estudiado en los últimos cincuenta años y se han identificado múltiples blancos moleculares, los cuales se describen brevemente a continuación.

1.1.1 Mecanismos de toxicidad del CP

Unión con ácido desoxirribonucleico (ADN) y alteración en la expresión génica

Al bioactivarse el CP, el compuesto electrófilo resultante forma enlaces covalentes con las purinas (posición N₇), produciendo principalmente entrecruzamiento intracatenario y en menor frecuencia intercatenario. El CP y las bases de ADN pueden formar monoadductos, en los que un solo ligando de cloruro se reemplaza por una molécula de agua. Los aductos bifuncionales se forman al cerrarse el anillo de los aductos monofuncionales con otra base de ADN (adenina o guanina) o reemplazando el segundo ligando de cloro y luego cerrando el anillo. El entrecruzamiento genera una distorsión en la estructura del ADN que altera los mecanismos de reparación de ADN, deteniendo su replicación e induciendo la muerte celular (Ghosh, 2019; Volarevic et al., 2019).

El entrecruzamiento intracatenario activa a p53, regulador de la transcripción de proteínas proapoptóticas, involucradas tanto en las vías intrínsecas y extrínsecas de la apoptosis. Además, p53 promueve la expresión del gen que codifica la proteína p53-modulador de apoptosis regulado al alza (PUMA), que interrumpe la interacción del linfoma de células B extragrande (Bcl-xL) y proteínas X (Bax) asociadas a Bcl-2, lo que conduce a la formación de poros y liberación de proteínas implicadas en la apoptosis, como el citocromo c (Jiang et al., 2006; Nakano & Vousden, 2001; Tsuruya et al., 2008; S. Zhu et al., 2015). Otra de las proteínas inducidas por p53 es la proteína con dominio de muerte (PIDD), que participa en la activación de caspasa-2, proteína que desencadena la liberación del factor inductor de apoptosis y endonucleasa G de mitocondrias (Seth et al., 2005; Zhu et al., 2015). Es importante destacar que el daño al ADN inducido por el CP también provoca la apoptosis independiente de p53, por ejemplo, este fenómeno conduce a la activación de c-Abl y p73 (Zhu et al., 2015).

Estrés oxidante y nitrante

La producción de las especies reactivas de oxígeno (ERO), la disminución del sistema antioxidante, la oxidación de lípidos y la modificación de proteínas generan estrés oxidante y nitrante. En el interior de las células, la enzima glutatión S-transferasa (GST) cataliza la unión del CP con el glutatión (GSH) y, consecuentemente causa la disminución de éste en la célula y altera el sistema antioxidante. Los aductos del CP con el GSH forman tioles que reaccionan con macromoléculas como lípidos y proteínas, a través de la enzima γ -glutamyltranspeptidasa y aminodipeptidasa, expresadas en la superficie de las células del túbulo proximal. Finalmente, el aumento en la producción de óxido nítrico (NO^{*}) y de las ERO, conducen a la formación de especies reactivas de nitrógeno, que a su vez inducen la nitración de proteínas e inactivación de enzimas contribuyendo al daño renal (Chirino & Pedraza-Chaverri, 2009; dos Santos et al., 2012; Miller et al., 2010; Townsend et al., 2003; Wainford et al., 2008).

Daño mitocondrial

El CP disminuye los niveles de GSH mitocondrial y con ello altera el sistema antioxidante de este orgánulo (Santos et al., 2008). Además, el CP se une al ADN mitocondrial lo cual provoca la disminución en la expresión de proteínas del sistema de transporte de electrones, altera la respiración mitocondrial y aumenta la producción de las ERO (Marullo et al., 2013). A su vez, el aumento de la producción de las ERO puede dañar los complejos respiratorios, incrementando el daño y promoviendo la muerte celular (Zsengellér et al., 2012). Además del daño al ADN mitocondrial, el CP altera la bioenergética mitocondrial, la cual está relacionada con la necrosis renal (Ozaki et al., 2013) y disminuye la oxidación de ácidos grasos regulando a la baja la actividad del receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR); éste es un factor de transcripción que modula la expresión de enzimas implicadas en el metabolismo de los ácidos grasos, la principal fuente de energía en los túbulos proximales (Portilla et al., 2002).

Estrés de retículo endoplásmico (RE)

Las ERO producidas y los tioles reactivos generados a partir del GSH, alteran la homeostasis proteica en el RE. Las proteínas desplegadas o mal-plegadas acumuladas en el lumen del RE, activan la respuesta a proteínas no plegadas (UPR) que desencadena la

muerte celular a través de la apoptosis mediada por el estrés de RE (Foufelle & Fromenty, 2016b; Liu & Baliga, 2005; Oh et al., 2016; Peyrou & Cribb, 2007; Sharp et al., 2016). Es importante destacar que el aumento en la producción de las ERO está involucrada en la activación de caspasa-12, lo que conduce a la activación de las caspasas 3 y 9 y consecuentemente la apoptosis (Liu & Baliga, 2005). Además, el estrés de RE potencia el estrés oxidante, por mecanismos como la liberación de calcio del RE, que es captado por las mitocondrias, resultando en la apertura del poro de transición mitocondrial, liberación de citocromo c, respiración inadecuada y aumento en la producción de las ERO (Cao & Kaufman, 2013). El calcio es capaz de activar la cinasa sensible al calcio CaMKII, que estimula la producción de las ERO mediada por la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NOX) (Li et al., 2010).

Inflamación

El daño celular inducido por el CP favorece la liberación de citocinas y quimiocinas, también conocidos como patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). El CP induce la fosforilación y posterior traslocación al núcleo del factor nuclear kappa B (NF- κ B), una vez activado promueve la transcripción de otros DAMPs como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y citocinas inflamatorias (interleucina 1, 6 y 18), generando un estado inflamatorio que favorece la producción de las ERO, exacerbando el daño renal. Además, los DAMPs activan los receptores de tipo Toll (TLRs) en las células del parénquima renal, que a su vez activa la vía de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) p38, incrementando la producción de TNF- α e inflamación en los riñones (Miller et al., 2010; Volarevic et al., 2019).

La inflamación tiene un papel fundamental en el desarrollo de la ERC (Sharp & Siskind, 2017), cuando es inducida por el CP produce la activación de fibroblastos en miofibroblastos que secretan componentes de la matriz extracelular que conducen a la formación de cicatrices fibrosas, alteración fina de la estructura renal, colapso de la parénquima y pérdida de la función renal, que caracterizan la ERC (Yu et al., 2016).

La nefrotoxicidad inducida por el CP como se evidencia en la **Figura 1**, implica una variedad de interacciones complejas entre los mecanismos descritos anteriormente, aún no

se conoce con exactitud la contribución de cada vía en el daño renal inducido, sin embargo, el estrés oxidante tiene un papel fundamental, debido a que el CP aumenta la producción de las ERO y con ello promueve la apoptosis, la inflamación y aumenta el daño mitocondrial y el estrés de RE.

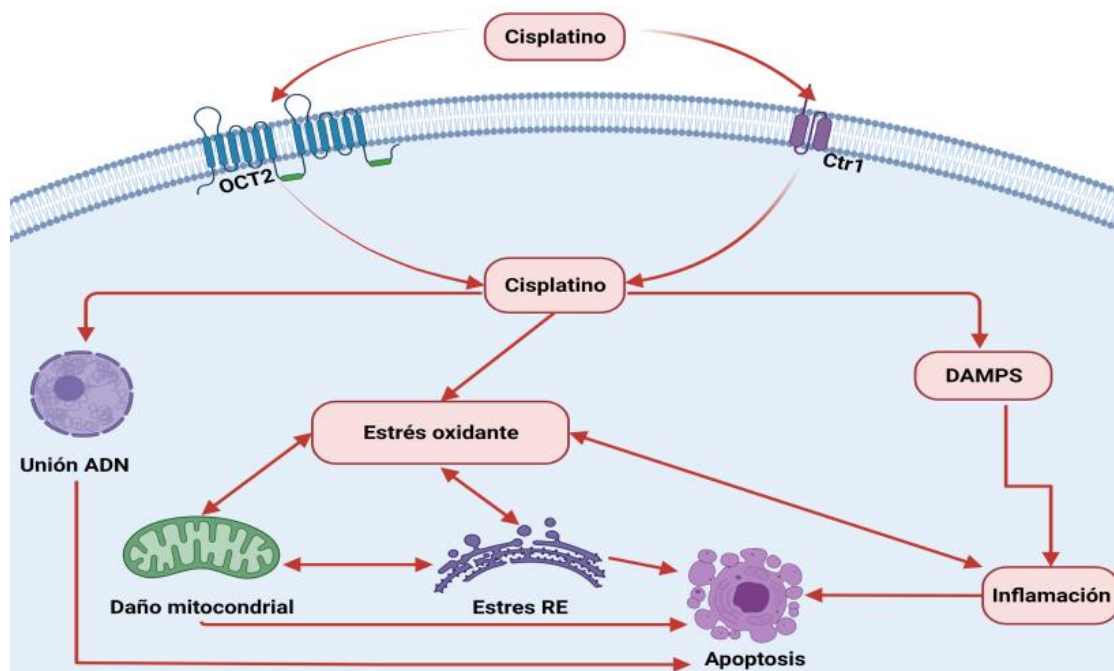


Figura 1. Esquema de las principales vías involucradas en la nefrotoxicidad inducida por cisplatino (CP). El CP ingresa a la célula a través de los transportadores OCT-2 y Ctr-1. En el interior de las células se bioactiva y se une al ADN, favoreciendo la liberación de DAMPs e induciendo estrés oxidante, daño mitocondrial, estrés de RE, inflamación y apoptosis. Figura elaborada con Biorender.com. **Abreviaturas:** ADN: ácido desoxirribonucleico; Ctr-1: transportador de cobre 1; CP: cisplatino; DAMPs; patrones moleculares asociados a daño; RE: retículo endoplásmico; OCT-2: transportador de cationes orgánicos 2.

A partir del conocimiento de las principales vías involucradas en la nefrotoxicidad inducida por el CP, se han desarrollado tratamientos dirigidos con compuestos naturales o sintéticos para prevenirla. En los estudios preclínicos se han demostrado diferentes efectos protectores de antioxidantes presentes en la dieta (Gómez-Sierra et al., 2018; Oršolić & Car, 2014). En particular, estos compuestos no sólo disminuyen el estrés oxidante sino también se dirigen a otros componentes celulares que están involucrados en la

nefrotoxicidad inducida por el CP. Se ha descrito que estos antioxidantes no interfieren con el efecto antineoplásico del CP, incluso algunos de ellos lo potencian en modelos animales (Baribeau et al., 2014; Nessa et al., 2011; Nur et al., 2017; Oršolić & Car, 2014; Puchsaka et al., 2016). Aunque existe una gran evidencia derivada de los estudios preclínicos, se han realizado pocos estudios clínicos que empleen antioxidantes como terapia adyuvante. En uno de estos estudios, los pacientes tomaron comprimidos de licopeno (25 mg) cada 12 h, 24 h antes y 72 h después del tratamiento con el CP y evaluaron la creatinina sérica, el BUN y la tasa de filtración glomerular al día 3 y 21 de la administración del CP. En este grupo de pacientes los marcadores de daño renal evaluados son similares a los del grupo de pacientes tratados con un régimen estándar de hidratación para prevenir el daño renal. Por lo tanto, estas observaciones sugieren que la administración de licopeno previene el daño renal inducido por el CP (Mahmoodnia et al., 2017). En otro estudio clínico, los pacientes recibieron un suplemento que contiene vitaminas (1000 mg de vitamina C y 400 mg de vitamina E) una semana antes y tres semanas después del último ciclo de quimioterapia con CP. Los niveles plasmáticos de vitaminas aumentaron en los pacientes antes de la quimioterapia y posteriormente disminuyeron con el tratamiento con el CP, aunque se mantienen más altos que los niveles de los pacientes no tratados, lo cual refleja que el estado de defensa antioxidante está relacionado con la toxicidad inducida por CP. Finalmente, en los pacientes tratados con el suplemento se observó una menor reducción de la función renal (Weijl et al., 2004).

1.2 Especies reactivas y estrés oxidante

Las ERO se clasifican en radicales y no radicales (Phaniendra et al., 2015). Los radicales son las especies que contienen al menos un electrón desapareado en su estructura, son inestables y tienen una vida media corta, algunos ejemplos son el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo (HO^{\cdot}), alcoxilo (RO^{\cdot}), peroxilo (ROO^{\cdot}), NO^{\cdot} y dióxido de nitrógeno (NO_2^{\cdot}). Las especies no radicales se pueden formar a partir de los radicales libres como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), algunos ejemplos de estas especies son ácido hipocloroso ($HOCl$), ozono (O_3), oxígeno singulete (1O_2), ácido nitroso (HNO_2), trióxido de dinitrógeno (N_2O_3), catión nitrilo (NO_2^+), peróxidos orgánicos ($ROOH$) y anión peroxinitrito ($ONOO^-$) (Konigsberg, 2008; Phaniendra et al., 2015).

La reactividad de estas especies es una característica intrínseca de cada una de ellas (Konigsberg, 2008), al mantenerse en concentraciones bajas o moderadas, estas especies participan en procesos como el sistema de transporte de electrones, ciclo de Krebs, β -oxidación, actividad de deshidrogenasas, síntesis de prostaglandinas, fagocitosis, plegamiento de proteínas y el sistema citocromo P450 (Forrester et al., 2018; Pizzino et al., 2017). Sin embargo, el exceso de especies reactivas causa daño a biomoléculas como el ADN, lípidos y proteínas lo cual genera disfunción metabólica (Phaniendra et al., 2015; Pizzino et al., 2017). Las especies reactivas se producen de manera natural por enzimas como las lipoxigenasas, NOX, óxido nítrico sintasa (NOS) y xantina oxidasa en la mitocondria, el RE, los peroxisomas y los lisosomas por la reducción parcial del oxígeno (Forrester et al., 2018; Phaniendra et al., 2015; Small et al., 2012)

Una de las especies reactivas que reaccionan con el ADN es el HO \cdot , el cual reacciona con los azúcares y las bases de purina y pirimidina y forma aductos como el ácido 3'-fosfoglicólico, 8-hidroxidesoxiguanosina, 8-hidroxidesoxiadenosina y 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina (Dizdaroglu et al., 2002; Konigsberg, 2008; Phaniendra et al., 2015; Pizzino et al., 2017). Otras especies reactivas que dañan el ADN son el ONOO \cdot , $^1\text{O}_2$ y N $_2\text{O}_3$ (Konigsberg, 2008). Con respecto al daño en lípidos, la lipoperoxidación se inicia cuando un radical libre extrae un hidrógeno del grupo metileno de un ácido graso, formando un radical lipídico el cual reacciona con el oxígeno molecular y forma el ROO \cdot , éste genera hidroperóxidos y finalmente forman malondialdehído (MDA) y 4-hidroxi-nonenal. La lipoperoxidación disminuye la fluidez de la membrana e inactiva enzimas y receptores unidos a ésta afectando su permeabilidad (Konigsberg, 2008; Phaniendra et al., 2015; Pizzino et al., 2017).

El daño a proteínas se induce por especies reactivas como el O $_2^{\cdot-}$, HO \cdot , RO \cdot , ROO \cdot , H $_2\text{O}_2$, $^1\text{O}_2$ y ONOO \cdot (Dean et al., 1997). Las especies reactivas oxidan los aminoácidos de las proteínas generando desnaturalización y pérdida de su función (enzimas, receptores, transportadores). Los marcadores utilizados para evaluar la oxidación de proteínas es la presencia de grupos carbonilo, *o*-tirosina y 3-nitrotirosina (Phaniendra et al., 2015).

El estrés oxidante se define como el desequilibrio entre la producción de especies reactivas y los antioxidantes celulares a favor de los oxidantes (Halliwell, 2007). Para correlacionar la intensidad y el grado de afectación en la salud, el proceso de estrés oxidante puede dividirse en tres etapas de evolución: adaptación, agudo y crónico (Halliwell, 2007; Small et al., 2012).

- 1) Adaptación: Es la respuesta de la célula para equilibrar daño oxidante mediante procesos de sobreexpresión génica y la activación enzimática.
- 2) Agudo: El daño oxidante está mediado por las ERO menos reactivas como el $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 , moléculas que en concentraciones y actividades controladas tienen una importante participación fisiológica. Al generarse $O_2^{\cdot-}$ en una alta proporción, reacciona con el NO^{\cdot} formando el $ONOO^-$ que puede afectar las características de procesos intracelulares vitales como el control del tono vascular, apoptosis, crecimiento y diferenciación celular.
- 3) Crónico: El daño oxidante está mediado en su totalidad por el HO^{\cdot} . Se manifiesta por la modificación de biomoléculas con la consecuente liberación de moléculas altamente reactivas, amplificando y propagando el daño que se manifiesta en células y tejidos.

El estrés oxidante se ha involucrado en numerosas patologías como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, hepáticas, renales, diabetes mellitus. La comprensión del papel de éste en cada una de las patologías resulta de interés debido a que puede ser un blanco terapéutico.

1.3 Estrés de retículo endoplásmico (RE)

El RE es un sistema membranoso complejo y un sitio importante para la homeostasis de proteínas, también conocida como proteostasis (síntesis, plegamiento, modificación, transporte y degradación de proteínas), así como para la síntesis y distribución de lípidos y esteroides, síntesis de hidratos de carbono, almacenamiento y señalización de calcio (Agellon & Michalak, 2017; Cao & Kaufman, 2013; Nademi & Dickhout, 2019; Schwarz & Blower, 2016; Sicari et al., 2020). Además, el RE proporciona funciones especializadas en algunos sistemas celulares, como soporte de la excitación-contracción en los músculos

(retículo sarcoplásmico), reacciones de biotransformación de agentes xenobióticos (RE liso), soporte de funciones secretoras de proteínas (RE rugoso) y activación de células de los sistemas inmunitarios y nerviosos (Agellon & Michalak, 2017; Almanza et al., 2019; Halperin et al., 2014; Schönthal, 2012; Shi et al., 2016; Xu et al., 2016).

Para realizar las funciones mencionadas anteriormente, el RE tiene una membrana integral multifuncional y chaperonas lumbales, enzimas plegables y moléculas sensoras como las proteínas reguladas por glucosa de 78 kDa y 94 kDa (GRP78 y GRP94, respectivamente), lectinas (calreticulina, calnexina), proteína disulfuro isomerasas (PDI), receptor de inositol-1,4,5-trifosfato (InsP3)/canal de liberación de calcio, receptores de rianodina (RYR), bomba ATPasa de calcio del retículo sarco/endoplásmico (SERCA) y las proteínas de la molécula de interacción estromal (STIM) de los sensores de calcio asociados al RE (Agellon & Michalak, 2017; Berridge, 2002; Coe & Michalak, 2009; Sicari et al., 2020).

Existen factores intrínsecos y extrínsecos como mutaciones genéticas, errores en la transcripción y traducción, hipoxia, estrés oxidante, estrés hídrico y térmico, y anomalías en la regulación del calcio provocadas por la isquemia, hipoglucemia, metales pesados, agentes quimioterapéuticos o antibióticos, que alteran las funciones del RE y en consecuencia inducen estrés de RE (Almanza et al., 2019; Song et al., 2017). Para restaurar la homeostasis del RE y eliminar las proteínas mal plegadas, se activa la UPR. La UPR es una vía de señalización adaptativa constituida por tres sensores de proteínas transmembrana: proteína cinasa del RE activada por ácido ribonucleico (ARN) de doble cadena (PERK), proteína cinasa dependiente de inositol alfa (IRE1 α) y el activador del factor de transcripción 6 (ATF6) (**Figura 2**) (Almanza et al., 2019; Gao et al., 2014; Inagi, 2009; Sano & Reed, 2013; Xu et al., 2016; Zeeshan et al., 2016). En células no estresadas, estas proteínas transmembranales están asociadas con GRP78 y se encuentran inactivas. Sin embargo, cuando ocurre estrés de RE, GRP78 se disocia de PERK, IRE1 α y ATF6, y esto activa la UPR. El objetivo principal de la UPR es mantener la homeostasis celular y restaurar las funciones del RE como la síntesis, transporte y plegamiento de proteínas, síntesis de lípidos y esteroides, así como promover la respuesta antioxidante y la autofagia (Almanza et al., 2019; Braakman & Hebert, 2013; Schönthal, 2012; Schwarz & Blower, 2016). Por el contrario, si el estrés de RE es crónico o la homeostasis celular no se puede

restaurar, la UPR promueve la apoptosis (Almanza et al., 2019; Mollereau, 2013; Song et al., 2017).

Una de las vías de señalización de la UPR es PERK, una proteína cinasa transmembrana de tipo I. Esta proteína tiene que dimerizarse y autofosforilarse para ser activada, y posteriormente fosforila el factor de iniciación eucariota 2 alfa (eIF2 α), una subunidad reguladora del componente de iniciación de la traducción (complejo eIF2), disminuyendo la síntesis global de proteínas. Además, p-eIF2 α induce la expresión del activador del factor de transcripción 4 (ATF4), relacionado con la transcripción de chaperonas, la expansión del RE, el metabolismo de los aminoácidos, la respuesta antioxidante y la autofagia. Sin embargo, la activación sostenida de PERK/p-eIF2 α /ATF4 induce la activación de la proteína homóloga potenciadora de la unión a CCAAT (CHOP) relacionada con el proceso apoptótico (Almanza et al., 2019; Dufey et al., 2014; Hiramatsu et al., 2015; Schönthal, 2012; Urra et al., 2013).

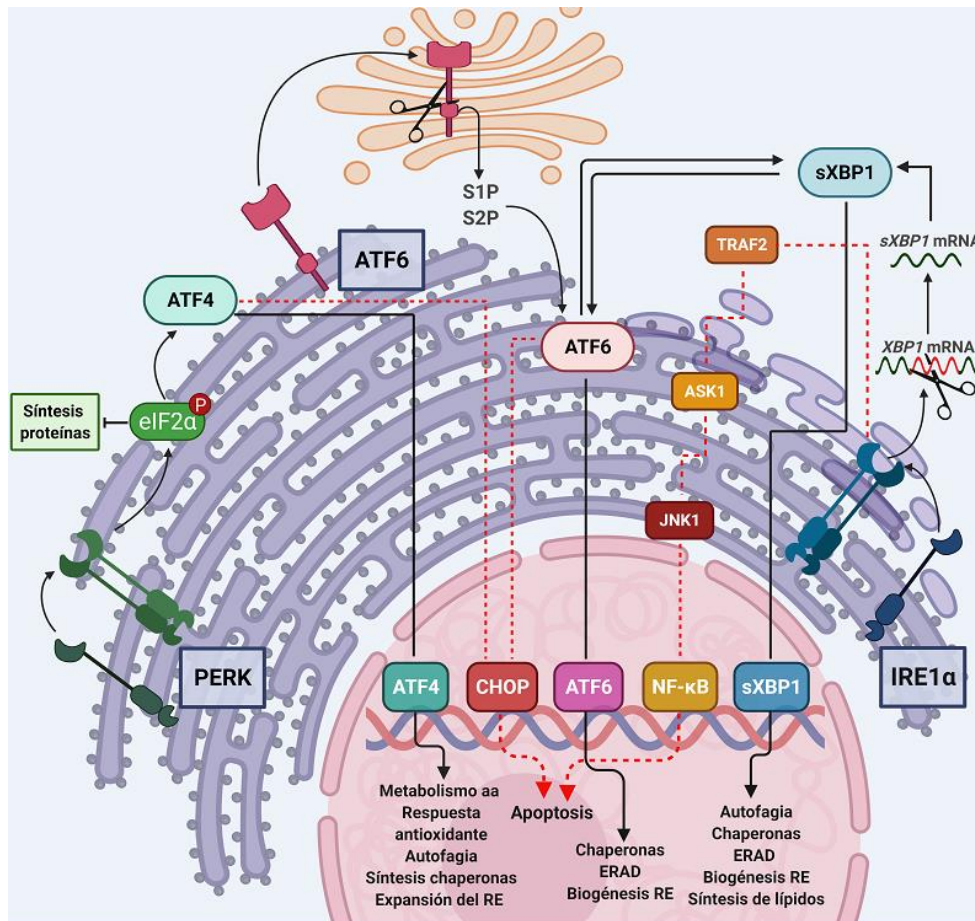


Figura 2. Estrés de retículo endoplásmico (RE) y la vía de señalización de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR). Cuando se produce estrés de RE, la chaperona GRP78 se disocia de las tres proteínas transmembranales del RE para activar la UPR. La UPR es una vía de señalización adaptativa constituida por PERK, IRE1 α y ATF6. Cada vía de señalización de la UPR tiene una función especializada; las flechas negras indican los efectos de la UPR en una etapa de estrés de RE agudo, mientras que las flechas rojas indican los efectos de la UPR en la etapa de estrés de RE crónico. Figura elaborada con Biorender.com **Abreviaturas:** aa: aminoácidos; ASK1: cinasa 1 reguladora de la señal de apoptosis; ATF4: activador del factor de transcripción 4; ATF6: activador del factor de transcripción 6; CHOP: proteína homóloga potenciadora de la unión a CCAAT; ERAD: degradación asociada al RE; eIF2 α : factor de iniciación eucariota 2 alfa; IRE α : proteína transmembrana cinasa/endonucleasa alfa que requiere inositol; GRP78: proteína regulada por glucosa de 78 kDa; JNK: cinasa N-terminal c-Jun; NF- κ B: factor nuclear kappa B; PERK: proteína cinasa del RE activada por ARN de doble cadena; S1P y S2P: proteasa 1 y 2; TRAF2: factor 2 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral; sXBP1: proteína 1 de unión a caja X empalmada.

La segunda vía de señalización la UPR es IRE1 α (**Figura 2**). La IRE1 α tiene actividades de serina/treonina cinasa y endorribonucleasa (RNasa) en el espacio citosólico y se dimeriza y autofosforila para activar y eliminar la secuencia no codificante del gen de la proteína 1 de unión a la caja X (XBP1), que regula el plegamiento, el tráfico de proteínas, la degradación asociada al RE (ERAD), autofagia, biogénesis del RE y biosíntesis de lípidos. Sin embargo, si el estrés de RE es crónico y la activación de IRE1 α persiste, la proteína asociada con el factor 2 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (TRAF2) forma un complejo con IRE1 α , induciendo la activación de la cinasa 1 reguladora de la señal de apoptosis (ASK1), la cinasa N-terminal c-Jun (JNK) y el factor nuclear kappa B (NF- κ B), que desencadenan la muerte celular (Almanza et al., 2019; Dufey et al., 2014; Hiramatsu et al., 2015; Schönthal, 2012; Tsang et al., 2010; Urrea et al., 2013).

Finalmente, la tercera vía de señalización de la UPR es el ATF6 (**Figura 2**). Es una proteína transmembrana de tipo II. Cuando el ATF6 se disocia de GRP78, ésta se transloca al aparato de Golgi, donde las proteasas 1 y 2 (S1P y S2P) liberan un fragmento de aminoácidos de la porción N-terminal del ATF6 para activar un dominio de unión al ADN.

El ATF6 escindido se transloca al núcleo, induciendo la expresión de chaperonas, componentes de ERAD, así como la secreción de proteínas y la biogénesis del RE. Además, el ATF6 induce la expresión de GRP78, XBP1 y CHOP (Almanza et al., 2019; Dufey et al., 2014; Hiramatsu et al., 2015; Song et al., 2017; Urra et al., 2013).

El estrés de RE y la activación de la UPR conducen a la modulación de diferentes vías celulares: en primera instancia, la UPR actúa dentro de la célula para permitir la recuperación y/o adaptación al estrés de RE. Sin embargo, la UPR cambiará del modo de supervivencia a la apoptosis, si la UPR se ve abrumada y el estrés sigue sin resolverse, quizás debido a la exposición continua o cíclica, o la expresión de factores estresantes y proteínas (Almanza et al., 2019; Hiramatsu et al., 2015; Schönthal, 2012; Tsang et al., 2010).

1.3.1 Estrategias para regular el estrés del retículo endoplásmico (RE) en enfermedades renales

El estrés de RE se ha detectado en enfermedades renales como glomeruloesclerosis, glomerulonefritis, isquemia, nefropatía diabética, nefrotoxicidad y enfermedad renal crónica. El RE mantiene la proteostasis, que es esencial para la homeostasis celular (Hasegawa & Inagi, 2020; Inagi et al., 2014; Nademi & Dickhout, 2019). Sin embargo, si las células tienen niveles elevados de síntesis de proteínas durante demasiado tiempo podrían experimentar hipoxia, falta de adenosín trifosfato (ATP), nutrientes en exceso o limitados, niveles de calcio desregulados, perturbación en la homeostasis redox y autofagia deficiente. Además, existen agentes químicos que interactúan con la función del RE y alteran la proteostasis, se acumulan proteínas mal plegadas/desplegadas o aberrantes que inducen estrés de RE (Cybulsky, 2010, 2017; Gallazzini & Pallet, 2018; Ke et al., 2017).

Para estudiar a la UPR, se han utilizado fármacos, compuestos naturales y condiciones ambientales como inductores o inhibidores del estrés de RE. La inhibición del estrés de RE se utiliza generalmente para prevenir la apoptosis causada por la sobreexpresión de CHOP (Almanza et al., 2019; Schönthal, 2012). Los inhibidores comúnmente utilizados son chaperonas químicas como el ácido 4-fenilbutírico (4-PBA), el N-óxido de trimetilamina, el ácido tauroursodesoxicólico y el ácido ursodesoxicólico (UDCA) (Cortez & Sim, 2014;

Cunard & Sharma, 2011; Schönthal, 2012), valproato y litio (inductores de chaperonas), salubrinal, (inhibidor de p-eIF2 α) y exendina-4 (activador de SERCA) (Cunard & Sharma, 2011; Schönthal, 2012). En la **Tabla 1** se presentan ejemplos de las estrategias experimentales utilizadas en modelos *in vitro* e *in vivo* de daño renal para inhibir el estrés de RE.

Tabla 1. Inhibición del estrés de RE en modelos experimentales de daño renal.

Modelo experimental y tratamiento utilizado para inhibir el estrés de RE	Principales resultados
Ratones macho pre-tratados con epigallocatequina 3-galato (EGCG) 100 mg/kg, i.p 30 min antes de la administración de CP 20 mg/kg, i.p.	El CP induce la expresión de GRP78 y caspasa-12. El uso de EGCG atenúa la expresión de GRP78, caspasa-12, el daño tubular y la apoptosis (Chen et al., 2015).
Ratones macho diabéticos (<i>db/db</i>) administrados con UDCA 40 mg/kg/d, i.g o 4-PBA 100 mg/kg/d, i.g durante 12 semanas.	En los riñones de los ratones, se observa un aumento en la expresión de p-PERK, p-IRE1 α , ATF6, XBP1s, CHOP y caspasa-12. El uso de UDCA y 4-PBA disminuye la expresión de los marcadores antes mencionados, las alteraciones histológicas y también mejora la sensibilidad a la insulina (Cao et al., 2016).
Ratas macho diabéticas tratadas con α -mangostina 6 mg/kg, i.p durante 12 d.	La α -mangostina en los riñones de las ratas diabéticas disminuye la expresión proteica de GRP78, p-PERK y ATF4 y reduce la apoptosis mediada por el estrés de RE (CHOP y caspasa-12) (Liu et al., 2018).
Células renales de humano (HEK-293) co-tratadas con CP 20 μ M e hidrato de morina 10 o 20 μ M por 24 h.	El CP disminuye la viabilidad celular e induce la expresión de GRP78, IRE1 α , PERK, p-eIF2 α y CHOP. El uso del hidrato de morina previene la disminución de la viabilidad celular y atenúa la expresión de las proteínas mencionadas anteriormente de manera dependiente de la dosis.
Ratones macho tratados con hidrato de	En el modelo <i>in vivo</i> , el hidrato de morina disminuye los

morina 20 o 40 mg/kg, i.p, 1 h después de la administración de CP 30 mg/kg, i.p.	marcadores de daño renal y la expresión de GRP78, IRE1 α , PERK, p-eIF2 α , caspasa 12 y CHOP, de manera dosis-dependiente (Singh et al., 2018).
Ratas macho con cálculos renales administrados con 4-PBA 100 mg/kg/d, i.g durante 4 semanas.	La administración de 4-PBA disminuye la expresión de proteínas de GRP78, PERK, eIF2 α , CHOP y caspasa-12 y mejora la función renal, disminuye los depósitos de cristales y las anomalías histopatológicas. Además, el 4-PBA redujo la producción de vacuolas autofágicas y disminuyó el número de células apoptóticas (Sun et al., 2020).

Abreviaturas: 4-PBA: ácido 4-fenilbutirato; UDCA: ácido ursodesoxicólico; ATF4: activador del factor de transcripción 4; ATF6: activador del factor de transcripción 6; CP: cisplatino; EGCG: epigallocatequina 3-galato; GRP78: proteína relacionada con glucosa de 78 kDa; CHOP: proteína homóloga potenciadora de la unión a CCAAT; RE: retículo endoplásmico; eIF2 α : factor de iniciación eucariota 2 alfa; IRE α : proteína transmembrana cinasa/endonucleasa alfa que requiere inositol; PERK: proteína cinasa del RE activada por ARN de doble cadena; XBP1: proteína 1 de unión a caja X.

Otra de las estrategias empleadas para la regulación del estrés de RE es la inducción previa de éste a niveles bajos o moderados con la finalidad de activar la UPR y estimular la capacidad de la célula para distribuir los recursos biológicos para mantener la homeostasis. Esta inducción previa es un mecanismo adaptativo conocido como hormesis o pre-acondicionamiento que podría ayudar a defender a la célula de una amplia gama de agentes estresantes para prevenir su muerte (Calabrese, 2008; Calabrese & Baldwin, 1997; Mattson, 2008; Peyrou & Cribb, 2007; Zimmermann et al., 2014). Los inductores farmacológicos del estrés del RE comúnmente utilizados son taspigargina (inhibidor de SERCA), tunicamicina (inhibe la glicosilación de proteínas), ionomicina (altera la homeostasis del calcio), ditiotreitól y 2-mercaptoetanol (reduce la formación de puentes disulfuro en proteínas) (Cunard & Sharma, 2011; Schönthal, 2012, 2013). Además de los compuestos farmacológicos, los compuestos naturales como los polifenoles también pueden regular el estrés de RE. El efecto de estos compuestos difieren en las células y dependen de la dosis (Farooqi et al., 2015; Liu et al., 2016). La mayoría de ellos son generalmente seguros y se

han utilizado en un esquema de pre-tratamiento o co-tratamiento para diversas enfermedades. En la **Tabla 2** se presentan ejemplos de las estrategias experimentales utilizadas en modelos *in vitro* e *in vivo* de daño renal para inducir el estrés de RE.

Tabla 2. Efecto hormético al estrés de RE en modelos experimentales de daño renal.

Tratamiento utilizado para inducir el estrés de RE	Principales resultados
Células hepáticas (HepG2, H4IIE) y renales (LLC-PK1) tratadas con tunicamicina (0-10 µg/mL) durante 24 h y después se expusieron a diferentes citotoxinas.	La tunicamicina induce la expresión de GRP78, GRP94, calreticulina y PDI. El pre-tratamiento con tunicamicina disminuye la muerte en las tres líneas celulares tratados con los citotóxicos (Bedard et al., 2004).
Células renales (LLC-PK1, NRK-52E y HEK293), pre-tratadas 24 h con tunicamicina o tapsigargina y posteriormente con agentes nefrotóxicos.	El pre-tratamiento con los inductores aumenta la expresión de GRP78 y GRP94 y previene la muerte celular en las tres líneas celulares causada por el CP, gentamicina, ciclosporina, <i>p</i> -aminofenol, paraquat, glioxilato o ciclosporina A (Peyrou & Cribb, 2007).
Ratas macho administradas con tunicamicina (0.3 mg/kg, i.p) o tapsigargina (0.2 mg/kg, i.p) 4 días antes de la inducción de glomerulonefritis.	El pre-tratamiento con los inductores aumenta la expresión de GRP78, ORP150, PERK, eIF2α y disminuye la proteinuria, así como las alteraciones histológicas en la glomerulonefritis inducida (Inagi et al., 2008).
Ratones macho pre-tratados con tunicamicina (1.5 mg/kg, i.p) 2 días antes de la isquemia y reperfusión renal.	El pre-tratamiento aumenta la expresión de GRP78 y XBP1. Además, disminuye la creatinina plasmática, la dilatación tubular y la muerte celular epitelial tanto en la corteza como en la médula renal (Prachasilchai et al., 2008).
Ratas macho pre-acondicionadas a la isquemia y reperfusión (2 ciclos de 5 min cada uno) y posteriormente	El pre-acondicionamiento aumenta la expresión de GRP78, PERK, ATF4 y TRAF-2. Estos aumentos son mayores que en el grupo control, pero menores que en el grupo sin pre-

realizaron isquemia (60 min) y reperfusión (120 min).	acondicionamiento. Esta isquemia y reperfusión previa también mejora la depuración de creatinina, la reabsorción de sodio y disminuye el estrés oxidante (Mahfoudh-Boussaid et al., 2012).
Ratones macho pre-tratados con tunicamicina (1 mg/kg, i.p) 2 días antes de la isquemia y reperfusión renal.	La tunicamicina disminuye los niveles de BUN, creatinina plasmática, la dilatación tubular y la descamación celular. Estos efectos están relacionados con el aumento en la expresión de GRP78, IRE1 α , PERK, p-eIF2 α y también con la autofagia inducida por el estrés de RE (Chandrika et al., 2015).

Abreviaturas: ATF4: activador del factor de transcripción 4; BUN: nitrógeno de urea en sangre; CP: cisplatino; GRP78: proteína relacionada con la glucosa de 78 kDa; GRP94 proteína relacionada con la glucosa de 94 kDa; RE: retículo endoplásmico; eIF2 α : factor de iniciación eucariota 2 alfa; IRE α : proteína transmembrana cinasa/endonucleasa alfa que requiere inositol; ORP150: proteína regulada por oxígeno 150; PDI: proteína disulfuro isomerasa; PERK: proteína cinasa del RE activada por ARN de doble cadena; XBP1: proteína 1 de unión a caja X; TRAF2: factor 2 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral.

Los inhibidores e inductores farmacológicos y naturales del estrés de RE se han utilizado para comprender la participación e importancia de la UPR en varios modelos experimentales de enfermedades. Sin embargo, la pregunta principal es si el estrés de RE debe inhibirse o inducirse como parte del tratamiento de algunas enfermedades. Antes de responder a esta pregunta, es necesario conocer el mecanismo patogénico y la implicación del estrés de RE en cada enfermedad. Ambas estrategias podrían representar un arma de doble filo según el entorno celular y el tipo de célula. Sin embargo, su estudio podría revelar puntos de control críticos en la célula que le permitan adaptarse y promover su supervivencia. Con base en lo anterior, podría ser posible decidir qué estrategia (inhibición o inducción del estrés de RE) será más beneficiosa para el tratamiento de la enfermedad.

1.4 Isoliquiritigenina (IsoLQ)

La 4,2',4' trihidroxichalcona, también conocida como isoliquiritigenina (IsoLQ) es un flavonoide (**Figura 3**) proveniente de las raíces y rizomas del licorice (*Glycyrrhiza glabra*), echalote (*Allium ascalonicum*) y frijol de soya (*Glycine max*) (Qiao et al., 2014). La IsoLQ a través de las reacciones de fase I se biotransforma a liquiritigenina y compuestos glucoronidados y posteriormente, se forman conjugados de sulfato y de GSH a través de las reacciones de fase II. Los diferentes productos de biotransformación de la IsoLQ se han detectado en el plasma, hígado, estómago, intestino delgado, intestino grueso, riñón, corazón, músculo, tejido adiposo, pulmones y cerebro de rata (Lee et al., 2013; Qiao et al., 2014).

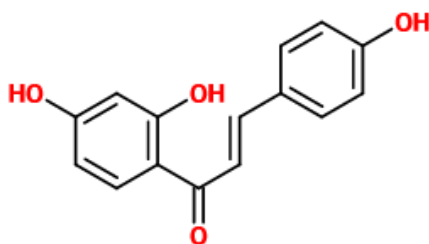


Figura 3. Estructura química de la isoliquiritigenina (IsoLQ).

La IsoLQ es utilizada como medicina herbolaria principalmente en Asia, por sus propiedades estrogénicas, anti-inflamatorias, anti-microbianas, anti-tumorales y antioxidantes (Lee et al., 2013; Sun et al., 2013; Wang et al., 2017). La actividad antioxidante de la IsoLQ es directa e indirecta, debido a que atrapa las ERO como el $O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} , H_2O_2 y el 1O_2 (Wang et al., 2017) e induce la expresión de enzimas citoprotectoras de fase II como la GST, quinona oxidoreductasa 1 y la hemoxigenasa 1 (Moreno-Londoño et al., 2017; Orlikova et al., 2011). Además, inhibe la expresión de la xantina oxidasa, óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), ciclooxigenasa, lipoxigenasa y prostaglandina E2 (Moreno-Londoño et al., 2017).

La actividad antitumoral de la IsoLQ se ha estudiado en líneas celulares de cáncer cervical (Chen et al., 2019; Chen et al., 2017), mama (Peng et al., 2020; Wang et al., 2021), hígado (Wang et al., 2021), pulmón (Wang et al., 2021), estómago (F. Huang et al., 2020), vejiga (Si et al., 2017; Moreno-Londoño et al., 2017), colon (Wang et al., 2021) y próstata

(Kanazawa et al., 2003), en estos estudios se ha descrito que la IsoLQ disminuye la viabilidad celular y el ciclo celular de manera dependiente de la dosis. Además, la IsoLQ aumenta la producción de las ERO, la actividad de las caspasas 3 y 9, e induce la apoptosis y la expresión de GRP78, p-PERK, p-eIF2 α y caspasa 12 (Si et al., 2017; Zhou et al., 2013). Este efecto antitumoral de la IsoLQ también se demostró en ratones inoculados con células de cáncer de colon, estos animales además fueron administrados con CP y se observa que la combinación de la IsoLQ con el CP reduce el tamaño del tumor en la misma proporción que lo hace el CP sólo y además previene parcialmente el daño por CP disminuyendo la actividad de aspartato aminotransferasa, la alanina aminotransferasa, y evitando el incremento en la creatinina sérica, el BUN y los niveles de MDA en hígado y riñón (Lee et al., 2008). Lo anterior resulta de gran interés debido a que la actividad de este compuesto es dependiente de la dosis y su actividad difiere para las células cancerosas y no cancerosas (Farooqi et al., 2015; Liu et al., 2016). Algunos de los efectos protectores de la IsoLQ descritos en diferentes modelos de daño renal son la reducción en los niveles de creatinina plasmática, BUN y las alteraciones histológicas, así como la disminución de la producción de las ERO, la fosforilación de NF- κ B y la expresión de interleucina 6, interleucina 1-beta, TNF- α y la inducción del factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) y la hemoxigenasa 1 (Hu et al., 2017; Huang et al., 2020; Moreno-Londoño et al., 2017; Rui-zhi et al., 2022).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

El CP es un fármaco antineoplásico ampliamente utilizado en el tratamiento del cáncer, sin embargo, su uso está limitado porque los pacientes tratados desarrollan daño renal como uno de los efectos secundarios. El estrés oxidante tiene un papel fundamental en la nefrotoxicidad inducida por el CP, debido a que promueve la apoptosis, inflamación y aumenta el daño mitocondrial y el estrés de RE.

Una de las vías de señalización que ha generado interés en los últimos años es la del estrés de RE, debido a que forma un ciclo de daño con el estrés oxidante y a que la UPR tiene efectos de supervivencia como respuesta adaptativa, sin embargo si el estrés es intenso y no es corregido, las células promueven su apoptosis (Schönthal, 2012; Shi et al., 2016; Song et al., 2017).

La regulación de la UPR se ha utilizado en diferentes modelos experimentales de daño renal para prevenir la muerte celular. Una de las estrategias empleadas es el efecto hormético al estrés de RE, el cual consiste en la exposición aguda de un compuesto farmacológico o natural como los antioxidantes para activar la UPR y generar una adaptación en la célula ante este estímulo, de modo que, al presentarse un estrés crónico, se favorece la sobrevivencia celular.

Algunos de los compuestos naturales como los antioxidantes inducen estrés de RE y tienen efectos citotóxicos en células cancerosas y citoprotectores en otros tipos celulares. La IsoLQ es un antioxidante que induce estrés de RE en células cancerosas, favorece la muerte celular de éstas y tiene efectos protectores en otros órganos como el riñón, los cuales podrían estar asociados al estrés de RE, sin embargo, esto aún no se ha evaluado. El estudio y comprensión de los mecanismos de protección de la IsoLQ en el riñón podrían proporcionar otros enfoques terapéuticos para ser utilizados como coadyuvantes en el tratamiento con CP.

3. HIPÓTESIS

El pre-tratamiento con la IsoLQ en células epiteliales renales de cerdo (LLC-PK1) y en ratas inducirá estrés de RE y generará un efecto hormético en la toxicidad inducida por el CP, disminuyendo el daño celular a través de la activación de la vía de PERK de la UPR y de la respuesta antioxidante.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivos generales

1. Evaluar si el pre-tratamiento con la IsoLQ en las células LLC-PK1 induce estrés de RE, produce hormesis y atenúa el estrés oxidante en la toxicidad inducida por el CP.
2. Evaluar si el pre-tratamiento en ratas con la IsoLQ tiene un efecto protector en la insuficiencia renal aguda inducida por el CP a través de sus propiedades antioxidantes y como regulador del estrés de RE.

4.2 Objetivos específicos

1. Determinar el tiempo de pre-tratamiento y la concentración en el que la IsoLQ atenúe la disminución de la viabilidad celular en la toxicidad inducida por el CP e induzca estrés de RE en las células LLC-PK1 para determinar las condiciones experimentales de trabajo.
2. Evaluar la expresión de las chaperonas GRP78 y GRP94 como marcadores de estrés de RE y la activación de la vía de PERK en las células LLC-PK1 para determinar algunas de las vías implicadas en el mecanismo de protección de la IsoLQ.
3. Evaluar el estrés oxidante en las células LLC-PK1 para determinar el efecto del pre-tratamiento de la IsoLQ en la toxicidad inducida por el CP.
4. Utilizar un esquema de pre-tratamiento con la IsoLQ en ratas para determinar la dosis en la que la IsoLQ disminuya los marcadores de daño renal en plasma en la toxicidad inducida por el CP.
5. Evaluar la expresión de las chaperonas GRP78 y GRP94 como marcadores de estrés de RE en la corteza renal de ratas para determinar el papel de la IsoLQ en el estrés de RE.

6. Evaluar el estrés oxidante en la corteza renal de ratas para determinar el efecto del pre-tratamiento de la IsoLQ en la toxicidad inducida por el CP.

5. DISEÑO EXPERIMENTAL

5.1 Modelo *in vitro*

El diseño experimental del modelo *in vitro* se divide en dos etapas, en la **Figura 4** se presenta la estrategia general de experimentación y se describe brevemente a continuación.

5.1.1 Primera etapa

El objetivo del conjunto de experimentos de la primera etapa fue determinar la potencial concentración protectora de la IsoLQ y el tiempo de pre-tratamiento contra la toxicidad inducida por el CP en las células LLC-PK1. Las células se trataron con el CP (10-80 μM) o con la IsoLQ (5-80 μM) durante 24 h para calcular la concentración inhibitoria media (IC_{50}) de cada uno de estos compuestos. Posteriormente, las células se pre-trataron con la IsoLQ (5-80 μM) durante 6 u 8 h y a continuación se incubaron con una concentración superior a la IC_{50} del CP (35 o 40 μM) durante 24 h para evaluar la curva dosis-respuesta hormética de viabilidad celular. Finalmente, se seleccionaron dos concentraciones de IsoLQ dentro de la zona hormética (15 y 25 μM) y una concentración superior a la IC_{50} del CP (40 μM) para evaluar el potencial efecto protector de la IsoLQ sobre la viabilidad celular.

Por otro lado, las células se pre-trataron con la IsoLQ 25 μM (concentración más alta dentro de la zona hormética) en un estudio de curso temporal (2-24 h) para evaluar la expresión proteica de GRP78 y GRP94.

5.1.2 Segunda etapa

Con base en los resultados de la primera etapa, las células LLC-PK1 se pre-trataron con la IsoLQ 25 μM durante 8 h y posteriormente se incubaron, en un estudio de curso temporal, con CP 40 μM para evaluar el estrés de RE (16 y 24 h) y el estrés oxidante (16 y 24 h). En la **Figura 4** se presenta la estrategia general de experimentación.

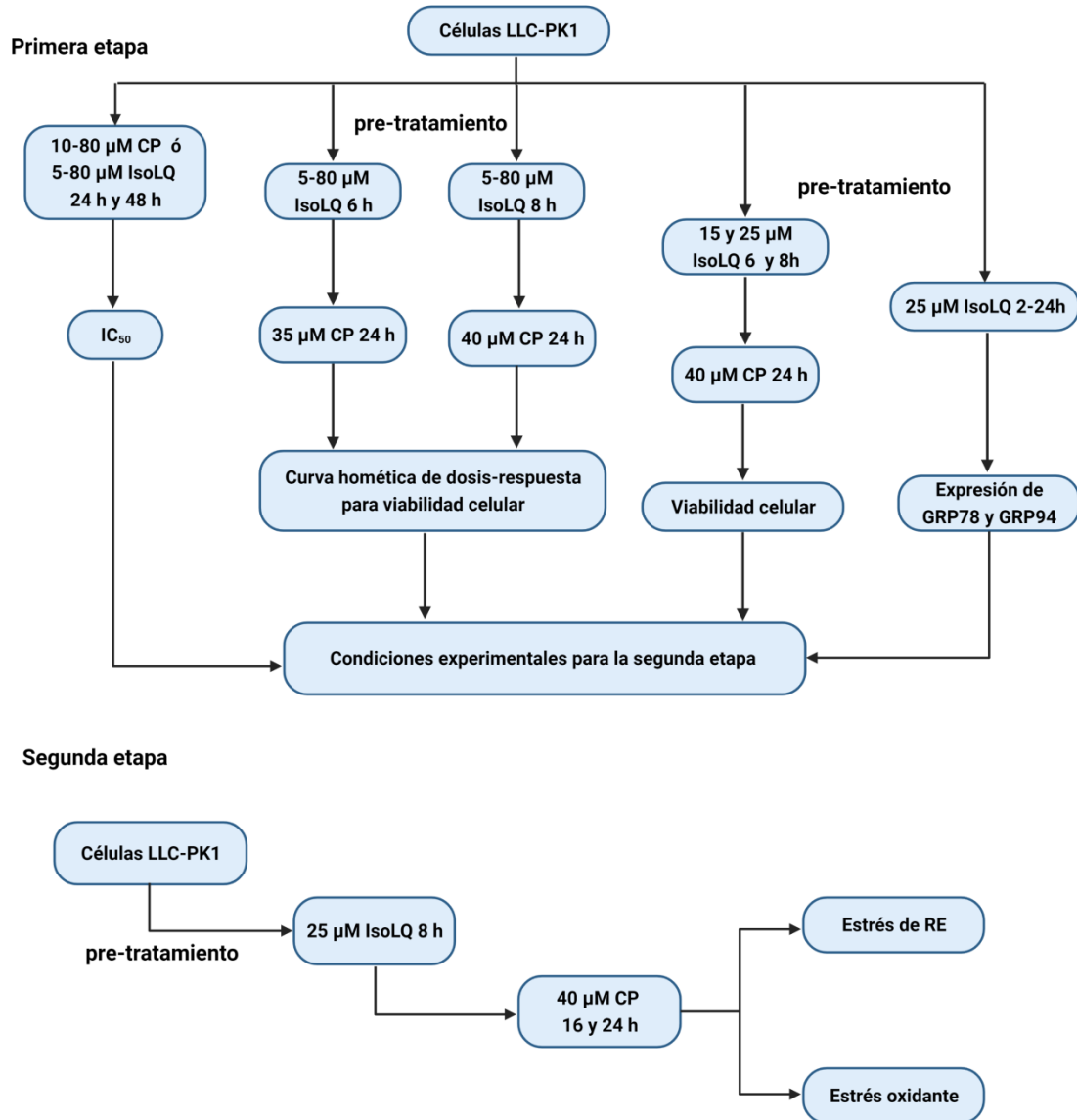


Figura 4. Estrategia general de experimentación en el modelo *in vitro*.

Abreviaturas: CP: cisplatino; IC₅₀: concentración media inhibitoria IsoLQ: isoliquiritigenina; GRP78: proteína relacionada con la glucosa de 78 kDa; GRP94 proteína relacionada con la glucosa de 94 kDa; RE: retículo endoplásmico.

5.2 Modelo *in vivo*

En el modelo *in vivo* se utilizaron ratas macho Wistar con un peso inicial de 200-220 g. Durante el estudio los animales se mantuvieron en condiciones controladas de luz/oscuridad (12 h \times 12 h), con alimento y agua *ad libitum*. El diseño experimental fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio

(CICUAL), de la Facultad de Química, UNAM (OFICIO/FQ/CICUAL/366/19) y se llevaron a cabo las disposiciones que establece la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 en el cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Los animales se dividieron en cuatro grupos experimentales, el esquema de administración se describe a continuación y se presenta en la **Figura 5**:

- Grupo Control: administración de una mezcla de solución salina isotónica 0.9% y etanol 70% en proporción 1:3 (vehículo, i.p) durante 3 días.
- Grupo IsoLQ: administración de la IsoLQ (2.5 mg/kg, i.p en vehículo) durante 3 días.
- Grupo CP: dosis única del CP (7.5 mg/kg, i.p en solución salina isotónica al 0.9%) en el día 3 del estudio y administración de vehículo en los días 1 y 2.
- Grupo IsoLQ+CP: durante 3 días se les administró la IsoLQ (2.5 mg/kg, i.p en vehículo). En el día 3, se les administró el CP (7.5 mg/kg, i.p en solución salina isotónica al 0.9%) una hora después de la administración de la IsoLQ.

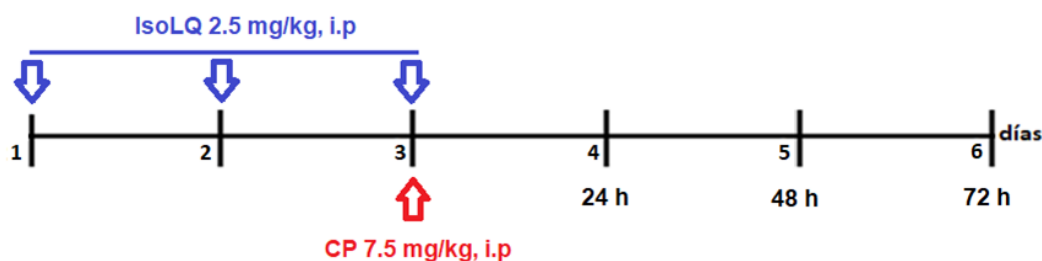


Figura 5. Esquema de tratamiento en el modelo *in vivo*.

Abreviaturas: CP: cisplatino; i.p: intraperitoneal; IsoLQ: isoliquiritigenina.

En el día 6 del estudio (72 h después de la administración de CP), los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p) para obtener la sangre a través de la aorta utilizando una jeringa y una aguja calibre #18 con heparina. Las muestras de sangre se centrifugaron durante 10 min a 3,000 g para obtener el plasma y se almacenaron a -70°C hasta su análisis. Además, se removieron ambos riñones y se almacenaron a -70°C hasta su análisis.

6. MÉTODOS

6.1 Reactivos

Las células LLC-PK1 fueron obtenidas de American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). La IsoLQ fue adquirida de Scientific (Union City, NJ, USA). Los siguientes reactivos: albúmina sérica bovina, CP, 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno, dimetil sulfóxido, cloruro de difeniliodonio (DPI), ácido 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoico), diacetato de fluoresceína (FDA), glicerofosfato, GSH, GSSG, GR, N-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME), NADPH, 4-nonilfenol-polietylenglicol, coctel de inhibidores de proteasas, deoxicolato de sodio, dodecil sulfato de sodio (SDS), fluoruro de sodio, pirofosfato de sodio, ortovanadato de sodio, ácido sulfosalicílico, trietanolamina, tris-clorhidrato, azul de tripano, tritón X-100, tween 20, 2-vinilpiridina, así como los anticuerpos anti- α -tubulina (cat. T9026), anti-GRP94 (cat. G4420), anti-PERK (cat. P0074) fueron adquiridos de Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). El fosfato dipotásico, la sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético, el cloruro de potasio, el bifosfato de potasio, el cloruro de sodio, el bicarbonato de sodio y el fosfato de sodio dibásico se adquirieron de J.T. Baker (Xalostoc, Edo. Mex, Mex). El reactivo de Bradford se adquirió de Bio-Rad (Hercules, CA, USA). El medio eagle modificado por Dulbecco (DMEM) alto en glucosa, el suero fetal bovino (SFB) y la penicilina/estreptomina fueron de Biowest (Riverside, MO, USA). El TrypLE Express se adquirió de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). El diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA) fue de Molecular Probes (Eugene, OR, USA). El anticuerpo anti-GRP78 (cat. SC-3768), anti-ATF4 (cat. SC-200) y anti-CHOP (cat. SC-575) se adquirieron de Santa Cruz Biotechnology Inc. (Dallas, TX, USA). El anticuerpo anti-beclina 1 (cat. MAB5295) se adquirió de R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Los anticuerpos secundarios fluorescentes anti-conejo 800CW y anti-ratón 680RD fueron de LI-COR Biosciences (Lincoln, NE, USA). Los demás reactivos utilizados fueron de calidad analítica y estaban disponibles comercialmente.

6.2 Cultivo celular

Las células epiteliales renales de cerdo (LLC-PK1) se cultivaron en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5% a 37 °C en medio de cultivo DMEM alto en glucosa suplementado con 10% de SFB, 0.33% de NaHCO₃ y 1% de penicilina/estreptomina. Las

células se subcultivaron con TrypLE Express al alcanzar un 90% de confluencia. Se utilizaron números de pases del 8 al 33 de las células LLC-PK1 para realizar los experimentos en medio DMEM alto en glucosa suplementado con 1% de SFB y 1% de penicilina/estreptomicina.

6.3 Viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó con el FDA. En una microplaca de 96 pozos se sembraron 28,125 células/cm² y se dejaron adherir por 24 h en medio DMEM alto en glucosa con 1% de SFB. Posteriormente, se realizaron los tratamientos y transcurrido el tiempo se retiró el medio DMEM alto en glucosa a las células, se lavaron con PBS 1x, se les adicionó medio DMEM alto en glucosa sin SFB con 12 µM de FDA y se dejaron incubar en oscuridad durante 5 min a 37°C (Clarke et al., 2001). Nuevamente, se les retiró el medio, se llevó a cabo un lavado con PBS 1x y finalmente, se determinó la fluorescencia con un lector de microplacas a longitudes de onda de excitación y emisión de 485 y 520 nm, respectivamente. Los resultados se expresaron como porcentaje de deacetilación con respecto al control (sin tratamientos).

6.4 Extracción de fracciones totales de proteínas para western blot

Las células LLC-PK1 se lisaron y los tejidos se homogeneizaron con amortiguador de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA) (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, desoxicolato de sodio al 0,5%, NP-40 al 1%, SDS al 0,1%, NaF 25 mM, Na₄P₂O₇ 1 mM, Na₃VO₄ 1 mM, cóctel de inhibidor de proteasa y glicerofosfato 0.5 mM). Los lisados y homogenados se agitaron durante 30 min a 4°C y posteriormente se centrifugaron a 12,000 g durante 10 min a 4 °C, el sobrenadante se recolectó y se almacenó a -70 °C hasta su uso. El contenido de proteína total se determinó mediante el ensayo de Bradford (Bradford, 1976).

6.5 Evaluación del estrés de RE

6.5.1 Expresión de proteínas por western blot

Las proteínas se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)-SDS y se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno y se bloquearon durante una hora con leche desnatada al 5%. Las membranas se dejaron incubando durante la noche a 4

°C con los anticuerpos primarios contra GRP78 (1:1,000), GRP94 (1:1,000), ATF4 (1:1,000) o α -tubulina (1:8,000). Posteriormente, las membranas se lavaron y se incubaron con los anticuerpos secundarios apropiados durante dos horas. Las proteínas de interés se detectaron con el sistema de imágenes infrarrojas LI-COR Odyssey Sa (Lincoln, NE, EUA). El análisis de imágenes se realizó con la versión 5.2 del software Image Studio Lite.

6.5.2 Expresión de proteínas por inmunocitoquímica

En una microplaca de 12 pozos se colocó un cubreobjetos estéril y se sembraron 480,000 células/cm² y se dejaron adherir por 24 h en medio DMEM con 1% de SFB. Posteriormente, se realizaron los tratamientos y transcurrido el tiempo se retiró el medio DMEM a las células, se lavaron con PBS 1x y se fijaron con paraformaldehído al 4% por 40 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo las células se permeabilizaron con PBS 1x-tritón al 0.5% por 7 min, se realizaron tres lavados de 5 min con PBS 1x y se bloquearon con albúmina sérica bovina al 1% durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron tres lavados de 5 min con PBS 1x y se incubaron durante toda la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios contra ATF4 (1:1,000), beclina-1 (1:1,000), PERK (1:1,000) y CHOP (1:1,000). Después de la incubación, se retiró el anticuerpo y se realizaron tres lavados de 5 min con PBS 1x y se incubaron con los anticuerpos secundarios durante 2 h a temperatura ambiente. Finalmente, se retiraron los cubreobjetos de la microplaca y se colocaron en un portaobjetos. La intensidad de la fluorescencia y las imágenes se visualizaron y determinaron en un Cytation 5 Cell Imagen Reader (Biotek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA).

6.6 Evaluación del estrés oxidante

6.6.1 Producción de especies reactivas de oxígeno (ERO)

Después de los tratamientos celulares, se eliminó el DMEM y las células se lavaron con PBS 1x seguido de incubación con H₂DCFDA 10 μ M durante 30 min a 37 °C en la oscuridad. La intensidad de la fluorescencia se visualizó y se determinó en un Cytation 5 Cell Imagen Reader (Biotek Instruments, Inc.,) a longitudes de onda de excitación y emisión de 485 y 520 nm, respectivamente. La intensidad de fluorescencia relativa de las células tratadas se expresó como porcentaje del control (sin tratamientos).

Para determinar las fuentes de las ERO intracelulares, las células LLC-PK1 se pre-trataron con IsoLQ durante 8 h, seguido del CP durante 16 o 24 h. A los 30 minutos antes del final de los tratamientos con el CP, el inhibidor de NOX (DPI 10 μ M) y el inhibidor de NOS (L-NAME 1 mM) se añadieron por separado a los cultivos celulares. Finalmente, se retiró el medio de crecimiento y se realizó la medición de las ERO como se describió anteriormente.

6.6.2 Marcadores de estrés oxidante

6.6.2.1 Medición de la relación GSH/GSSG

El estado redox, expresado como la relación GSH/GSSG, se determinó siguiendo el método descrito por Rahman et al., 2006. El contenido de proteínas totales se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976).

6.6.2.2 Contenido de tioles totales

Los tioles totales se determinaron a través de una reacción acoplada con el ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (Ellman, 1959). El contenido de proteína total se determinó mediante el ensayo de Bradford (Bradford, 1976). Los resultados se expresaron como nmol/mg de proteína.

6.6.2.3 Medición del contenido de malondialdehído (MDA)

El MDA forma un cromóforo con el 1-metil-2-fenolindol el cual es detectado a 586 nm. Los resultados se expresaron como nmol MDA/mg proteína (Gérard-Monnier et al., 1998).

6.6.3 Actividad de enzimas antioxidantes

6.6.3.1 Catalasa (CAT)

Se evaluó la actividad de la enzima mediante la determinación de la concentración del H₂O₂ a 240 nm durante 30 s. Se utilizó la constante de reacción de primer orden (*k*) como la unidad de actividad enzimática de la CAT. Los resultados se expresaron como *k*/ mg proteína (Aebi, 1984).

6.6.3.2 Glutación peroxidasa (GPx)

Se determinó indirectamente a través de una reacción acoplada con la GR y el NADPH. Los resultados se expresaron en U/mg proteína, donde U es la cantidad de enzima que oxida un μ mol de NADPH por minuto (Lawrence & Burk, 1976).

6.6.3.3 Glutación reductasa (GR)

La actividad de la GR se determinó midiendo la desaparición de NADPH a 340 nm. Los resultados se expresaron como U/mg proteína, donde U equivale a un mol de NADPH oxidado por minuto (Carlberg & Mannervik, 1975).

6.6.3.4 Glutación S-transferasa (GST)

Esta enzima conjuga al GSH con el 1-cloro-2,4-dinitrobenceno y dicho conjugado absorbe a 340 nm. La actividad se expresó como U/mg proteína, donde U es la cantidad de 1-cloro-2,4-dinitrobenceno conjugado expresado en nmol por minuto (Habig et al., 1974).

6.6.3.5 Superóxido dismutasa (SOD)

La SOD neutraliza los O_2^- generados por el sistema xantina-xantina oxidasa, los cuales reducen al azul de nitrotetrazolio generando formazán, el cual se absorbe a 560 nm. La actividad se expresó como U/mg proteína, donde U corresponde a la cantidad de azul de nitrotetrazolio reducido expresado en nmol (Sun et al., 1988).

6.7 Evaluación de la función renal en plasma

6.7.1 Creatinina

La determinación se realizó mediante un ensayo colorimétrico basado en la reacción de Jaffé (Slot, 1965), empleando un estuche comercial. La creatinina reacciona con el picrato alcalino formando un complejo rojizo que absorbe a 492 nm. Los resultados se expresaron como mg creatinina/dL.

6.7.2 Nitrógeno ureico en sangre (BUN, blood urea nitrogen)

Se determinó empleando un estuche comercial. La urea presente en la muestra reacciona con *o*-ftalaldehído en medio ácido originando un complejo colorido que absorbe a 510 nm. Los resultados se expresaron en mg/dL.

6.7.3 Actividad de glutación peroxidasa (GPx)

Se determinó indirectamente a través de una reacción acoplada con la GR y el NADPH. Los resultados se expresaron en U/mL, donde U corresponde a la cantidad de la enzima que oxida un μ mol de NADPH por minuto (Lawrence & Burk, 1976).

6.8 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como valor promedio \pm error estándar de la media (EEM). El análisis estadístico se realizó para cada determinación utilizando el software Prism 6.0 (GraphPad) comparando las medias a través de un análisis de varianza (ANOVA, del inglés analysis of variance) de una vía seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey. Para los cursos temporales de los Western blot se realizó una *t* de student con respecto al control. Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

7. RESULTADOS

Modelo *in vitro* primera etapa

7.1 Determinación de la concentración media inhibitoria (IC₅₀) del CP y de la IsoLQ

Las células LLC-PK1 se trataron con el CP (10-80 μM) durante 24 y 48 h. En la **Figura 6A** se observa que a las 24 h el CP 10 μM no fue citotóxico, mientras que las concentraciones superiores a 20 μM causaron citotoxicidad. La concentración media inhibitoria (IC₅₀) calculada fue $29.4 \pm 3.8 \mu\text{M}$ a las 24 h. En la **Figura 6B** se observa que el efecto tóxico del CP aumenta con el tiempo ya que a las 48 h se requiere una menor concentración ($12.4 \pm 2.0 \mu\text{M}$) para disminuir el 50% de la viabilidad celular, evidenciando el daño del CP hacia los túbulos proximales, su principal blanco.

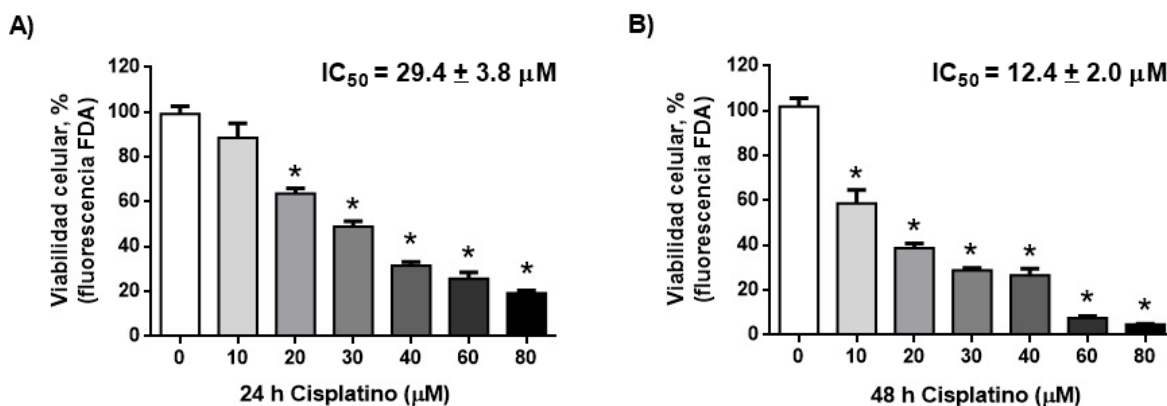


Figura 6. Concentración media inhibitoria en las células LLC-PK1. A) Tratamiento con cisplatino (CP) durante 24 h. B) Tratamiento con CP durante 48 h. $n=3$ experimentos independientes (9-12 datos). Datos promedio \pm EEM. * $p < 0.05$ vs control (vehículo).

La IC₅₀ calculada de la IsoLQ es de 35.7 ± 4.4 μM y 34 ± 1.0 μM a las 24 y 48 h, respectivamente. La disminución en la viabilidad celular podría estar asociada con la inducción de estrés de RE, sin embargo, el valor de la IC₅₀ de la IsoLQ se mantiene, indicando que es menos citotóxica que el CP para los túbulos proximales.

7.2 Determinación de la concentración protectora de la IsoLQ y el tiempo de pre-tratamiento contra la toxicidad inducida por el CP en las células LLC-PK1

Con base en un estudio previo del laboratorio, las células se pre-trataron durante 6 y 8 h con la IsoLQ (10-80 μM) para evaluar la viabilidad celular a las 24 h de la adición del CP 35 y 40 μM para determinar cuál es el tiempo y concentración en donde se aumente significativamente la viabilidad celular. La **Figura 7** muestra la típica relación hormética en forma de J invertida, donde las concentraciones de la IsoLQ entre 5 y 30 μM atenúan la muerte celular inducida por el CP, mientras que las concentraciones de la IsoLQ superiores a 35 μM aumentan la muerte celular inducida por el CP. Las concentraciones de la IsoLQ de 15 y 25 μM atenúan la disminución de la viabilidad celular de forma estadísticamente significativa y se encuentran en la zona hormética (respuesta biológica favorable).

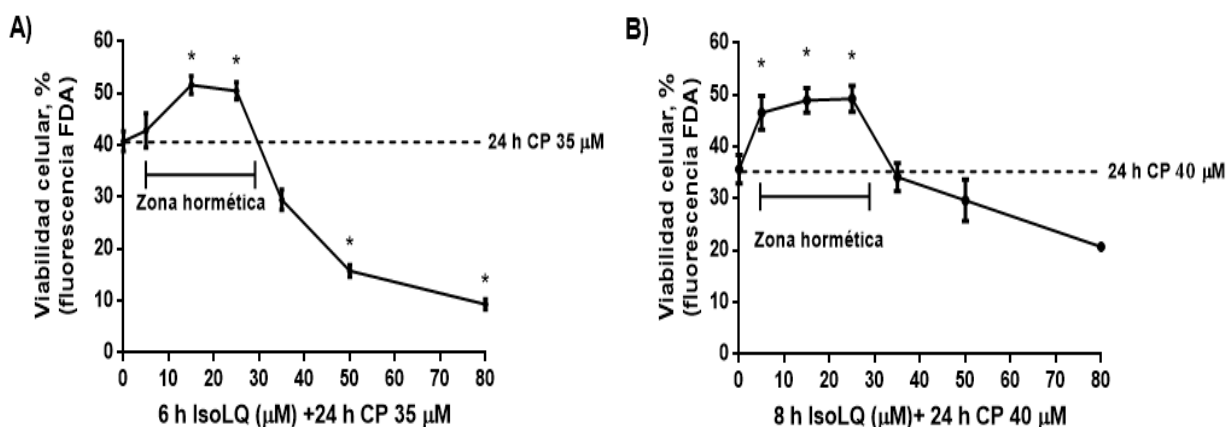


Figura 7. Curva hormética de dosis-respuesta de la isoliquiritigenina (IsoLQ) en células tratadas 24 h con el cisplatino (CP). A) 6 h de pre-tratamiento con la IsoLQ. B) 8 h de pre-tratamiento con la IsoLQ. n=3-4 experimentos independientes (9-12 datos). Datos promedio ± EEM. *p<0.05 vs CP 24 h.

Con base en los resultados anteriores, el CP a 40 μM causa más del 50% de la muerte celular, mientras que los datos de la **Figura 7** indican que la IsoLQ a 15 y 25 μM están

dentro de la zona hormética (atenúan la disminución de la viabilidad celular). Por lo tanto, se utilizaron estas concentraciones y la más alta del CP, para aumentar el reto tóxico a la célula. El pre-tratamiento de 6 y 8 h con la IsoLQ a 15 y 25 μM reveló efectos citoprotectores contra el CP a 40 μM (**Figura 8**). Lo anterior resulta de gran interés, debido a que si se continúa aumentando el reto tóxico con el CP (**Figura 9**), se observa que la IsoLQ tiene efectos protectores en las células LLC-PK1, lo cual sería de gran utilidad por la diversidad de dosis que se utilizan en el tratamiento con el CP.

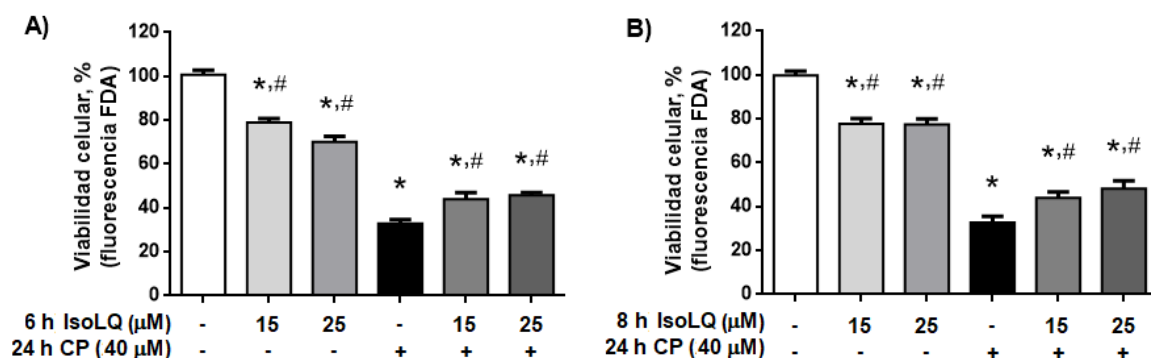


Figura 8. El pre-tratamiento con la isoliquiritigenina (IsoLQ) atenúa la disminución de la viabilidad celular ocasionada por el cisplatino (CP). A) 6 h de pre-tratamiento con la IsoLQ. B) 8 h de pre-tratamiento con la IsoLQ. n=3 experimentos independientes (9 datos). Datos promedio \pm EEM. * $p < 0.05$ vs control (sin tratamiento), # $p < 0.05$ vs CP.

Las células pre-tratadas únicamente con la IsoLQ 25 μM tienen una morfología parecida a los controles (monocapa y alargadas) (**Figura 9**), mientras que el tratamiento con el CP disminuye el número de células de manera dependiente de la dosis y además pierden su forma, sin embargo, al combinarse con la IsoLQ se atenúan estas alteraciones. Las imágenes de campo claro son consistentes con los datos de viabilidad celular presentados anteriormente.

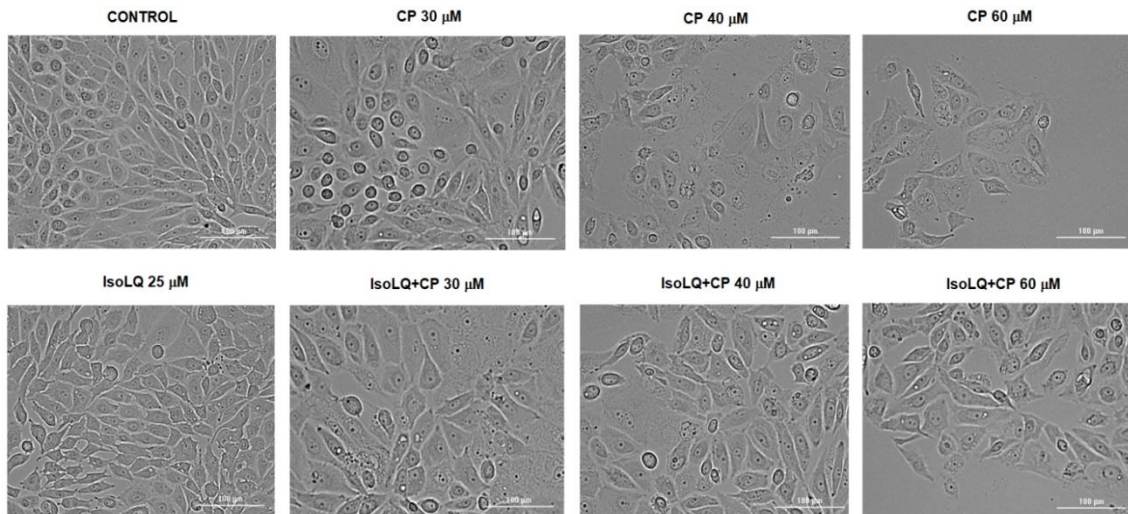


Figura 9. Imágenes en campo claro de las células LLC-PK1 pre-tratadas 6 h con la isoliquiritigenina (IsoLQ) 25 μM y posteriormente con el cisplatino (CP) por 24 h. Objetivo 20x.

Adicionalmente, se aumentaron los tiempos de pre-tratamiento a 12, 18 y 24 h con la IsoLQ, para determinar si se observaba un mayor efecto en la viabilidad celular, sin embargo, los resultados indican que los pre-tratamientos mayores a 12 h con IsoLQ y el posterior tratamiento con el CP exacerbaban el daño (datos no presentados), es probable que exista un efecto pro-oxidante, sin embargo, se tendrían que evaluar los marcadores correspondientes para corroborarlo.

7.3 El pre-tratamiento con la IsoLQ induce estrés de RE

De acuerdo con los datos presentados en la **Figura 8**, el pre-tratamiento con la IsoLQ a 15 y 25 μM atenúan la muerte celular inducida por el CP, por lo que las células se trataron con la concentración más alta de la IsoLQ (25 μM) utilizada previamente para determinar el estrés de RE. En la **Figura 10** se observa que la expresión de GRP94 aumenta a partir de las 4 h de tratamiento con la IsoLQ (25 μM), mientras que para la chaperona GRP78 se observa un aumento significativo desde las 6 h de tratamiento, obteniéndose un efecto máximo a las 8 y 24 h de tratamiento con la IsoLQ.

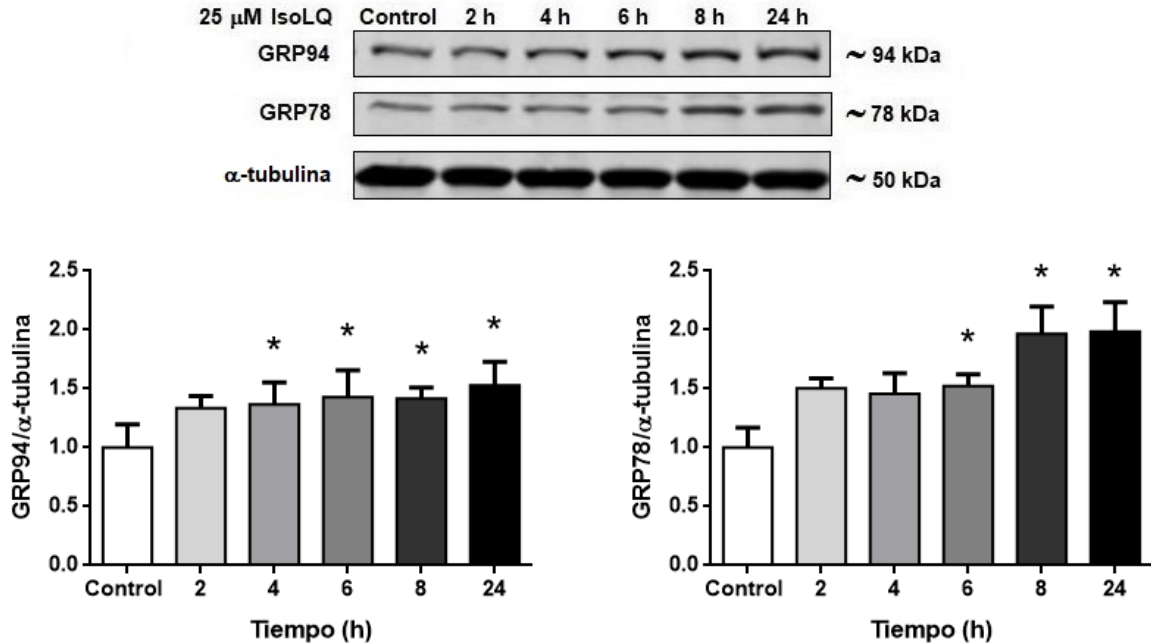


Figura 10. El pre-tratamiento con la isoliquiritigenina (IsoLQ) induce el estrés de retículo endoplásmico (RE) en las células LLC-PK1. $n=3$ experimentos independientes. Datos promedio \pm EEM. * $p < 0.05$ vs control (sin IsoLQ, tiempo 0 h). **Abreviaturas:** GRP78: proteína relacionada con la glucosa de 78 kDa; GRP94: proteína relacionada con la glucosa de 94 kDa.

Modelo *in vitro* segunda etapa

7.4 El pre-tratamiento con la IsoLQ aumenta el estrés de RE y activa la vía de PERK en la toxicidad inducida por el CP en células LLC-PK1

Con base en los resultados de viabilidad celular, así como en las expresiones de GRP78 y GRP94 obtenidas de los experimentos de la primera etapa, el protocolo experimental se diseñó de la siguiente manera: las células se pre-trataron con la IsoLQ 25 μ M durante 8 h (efecto más alto sobre la viabilidad celular y las expresiones de las GRPs) y luego con 40 μ M de CP (concentración más alta evaluada en la curva de hormesis) en un estudio de curso temporal. Después del pre-tratamiento durante 8 h con la IsoLQ 25 μ M y la exposición con el CP 40 μ M durante 16 y 24 h, la expresión de GRP78 y GRP94 aumenta en las células LLC-PK1 (**Figura 11B**). Es notorio que la expresión de estos acompañantes en este esquema de tratamiento dual es mayor que en el tratamiento con la IsoLQ o el CP solo (**Figuras 10 y 11A**, respectivamente).

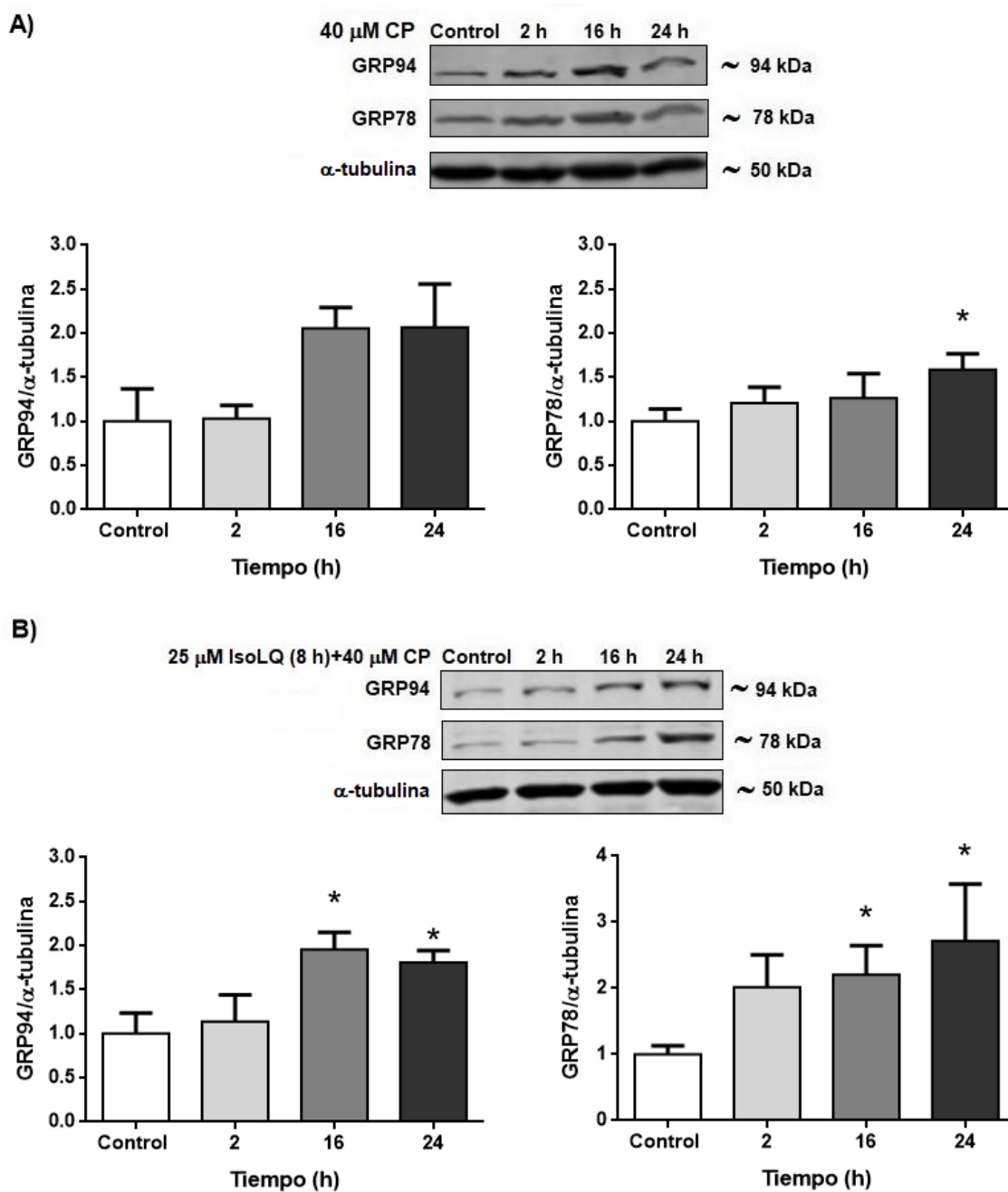


Figura 11. Estrés de retículo endoplásmico (RE) en células LLC-PK1. A) Tratamiento con el cisplatino (CP) 40 μ M. B) 8 h de pre-tratamiento con la isoliquiritigenina (IsoLQ) 25 μ M y el CP 40 μ M. n=3 experimentos independientes. Datos promedio \pm EEM. *p<0.05 vs control (sin CP, tiempo 0 h). **Abreviaturas:** GRP78: proteína relacionada con la glucosa de 78 kDa; GRP94 proteína relacionada con la glucosa de 94 kDa

Adicionalmente, para determinar si la vía de PERK se activa en este modelo experimental se evaluó la expresión de ATF4 (**Figura 12**). En las células tratadas 8 h con la IsoLQ se observa un aumento, aunque éste no es significativo, mientras que las células tratadas 16 h con el CP y las pre-tratadas 8 h con la IsoLQ y posteriormente tratadas 16 h con el CP, se observa un aumento significativo en la expresión de ATF4 (**Figura 12A y B**), esta misma tendencia se observa en la **Figura 13A**, sin embargo, la activación parece ser temporal debido a que no persiste hasta las 24 h de exposición con el CP (**Figura 13B**).

La activación de ATF4 está relacionada con la inducción de autofagia, por ello se evaluó la expresión de beclina-1 (**Figura 12A**), en las células tratadas 16 h con el CP se observa una mayor expresión de beclina-1 que en las células pre-tratadas 8 h con la IsoLQ y posteriormente tratadas 16 h con el CP (**Figura 12C**) lo cual sugiere que se está induciendo la nucleación de la vesícula y probablemente se está llevando a cabo la autofagia, sin embargo se tendrían que determinar otras proteínas para evaluar si existe alguna alteración en el flujo autofágico en este modelo experimental.

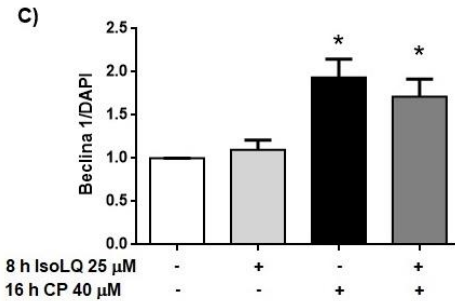
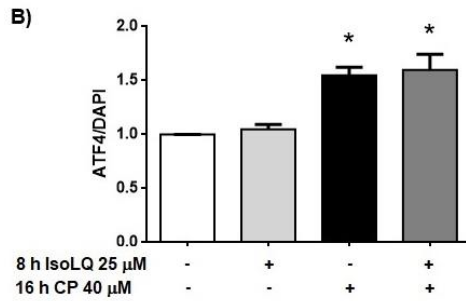
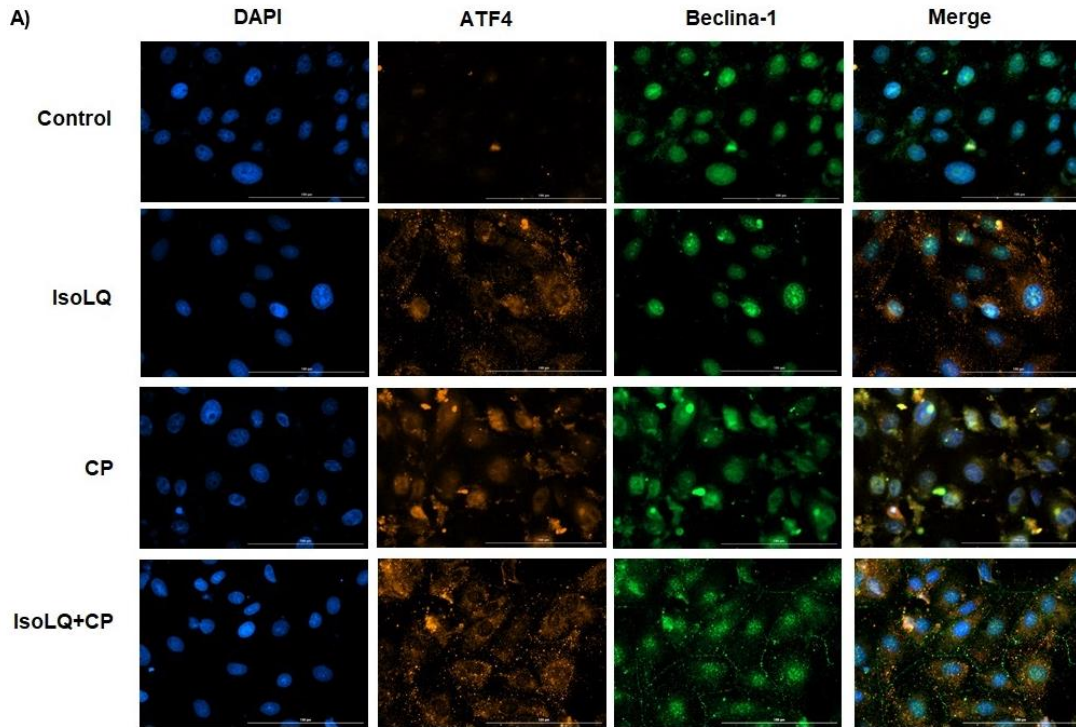


Figura 12. La vía de la proteína cinasa del retículo endoplásmico activada por ARN de doble cadena se activa en las células LLC-PK1. A) Imágenes de las inmunocitoquímicas Objetivo 40 x. B) Cuantificación del activador del factor de transcripción 4 (ATF4). C) Cuantificación de beclina-1. n=3 experimentos independientes. Datos promedio \pm EEM. * $p < 0.05$ vs control. Abreviaturas: ATF4: activador del factor de transcripción 4; CP: cisplatino; IsoLQ: isoliquiritigenina.

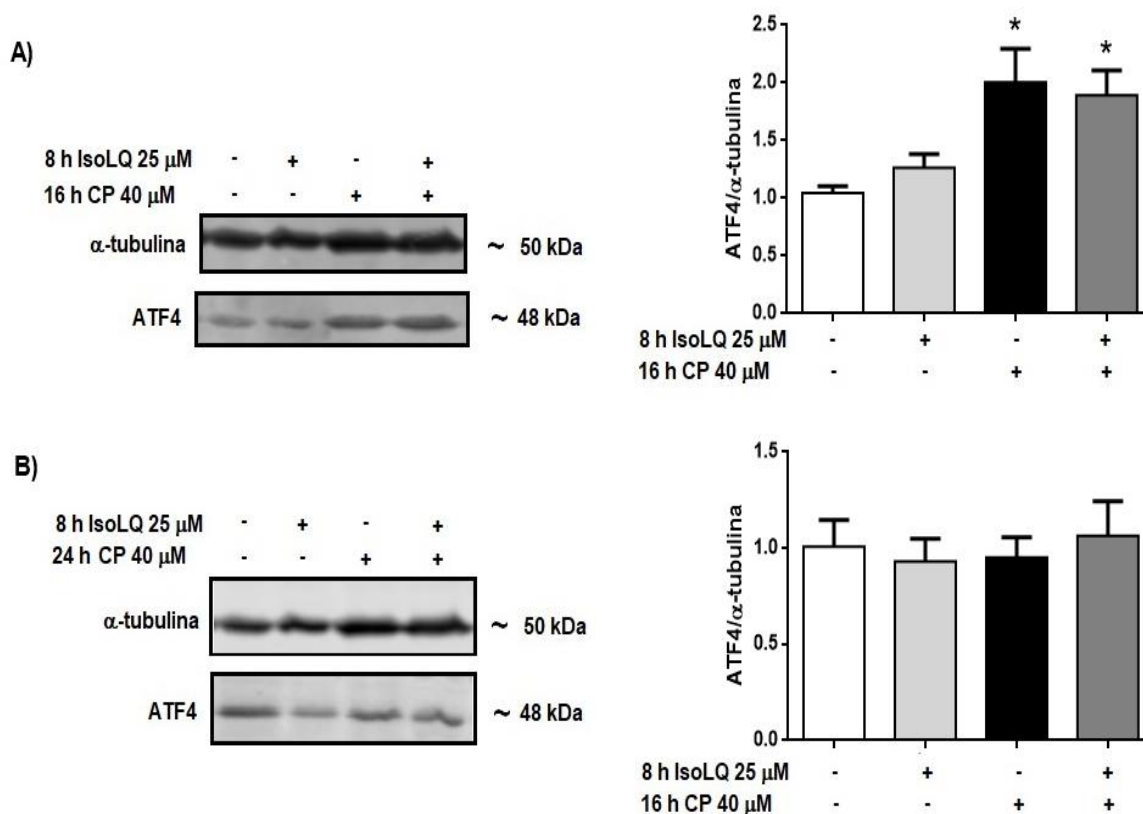


Figura 13. La activación del activador del factor de transcripción 4 (ATF4) es temporal en la toxicidad inducida por el cisplatino (CP) en las células LLC-PK1. A) 16 h de exposición con el CP 40 μ M. B) 24 h de exposición con el CP 40 μ M. n=3 experimentos independientes. Datos promedio \pm EEM. *p<0.05 vs control. Abreviaturas: CP: cisplatino; IsoLQ: isoliquiritigenina.

7.5 La hormesis inducida por la IsoLQ atenúa el estrés oxidante en las células LLC-PK1 tratadas con el CP

Las células LLC-PK1 se pre-trataron con la IsoLQ 25 μ M durante 8 h y luego con el CP 40 μ M durante 16 y 24 h, como se describe para la segunda etapa del diseño experimental. El pre-tratamiento con la IsoLQ 25 μ M disminuye la producción de las ERO en \sim 37 y \sim 26% después de la exposición durante 16 y 24 h de CP 40 μ M, respectivamente, y atenúa la disminución en la relación GSH/GSSG, los tioles libres y la actividad de la GR 24 h después exposición al CP (**Tabla 3**).

Tabla 3. Hormesis inducida por el pre-tratamiento con la isoliquiritigenina (IsoLQ) sobre el estrés oxidante en células LLC-PK1 después del tratamiento con el cisplatino (CP).

Grupo	Control	25 μ M IsoLQ (8 h)	40 μ M CP		25 μ M IsoLQ (8 h)+40 μ M CP	
	0 h	0 h	16 h	24 h	16 h	24 h
Producción ERO (%)	100.4 \pm 4.5	100.1 \pm 6.7 ^{*,#}	236.5 \pm 36.2 [*]	206.8 \pm 24.5 [*]	147.9 \pm 18.2 ^{*,**}	152.3 \pm 24.5 [*]
GSH/GSSG	5.92 \pm 0.35	ND	1.67 \pm 0.19 [*]	1.49 \pm 0.16 [*]	2.14 \pm 0.13 [*]	3.22 \pm 0.44 ^{*,#}
Tioles totales (nmol/mg proteína)	143.9 \pm 2.9	138.1 \pm 13.6 [#]	115.1 \pm 3.6	85.1 \pm 4.6 [*]	148.9 \pm 27.1	204.9 \pm 28.7 [#]
Actividad GR (U/mg proteína)	0.015 \pm 0.001	0.014 \pm 0.001 [#]	0.010 \pm 0.001 [*]	0.006 \pm 0.001 [*]	0.011 \pm 0.001 [*]	0.014 \pm 0.001 [#]

Datos promedio \pm EEM, n=3. *p<0.05 vs. control (sin IsoLQ y CP), **p<0.05 vs. CP 16 h, #p<0.05 vs. CP 24 h. ND, no determinado. **Abreviaturas:** CP: cisplatino; IsoLQ: isoliquiritigenina; ERO: especies reactivas de oxígeno; GSH/GSSG: glutatión/glutatión disulfuro; GR: glutatión reductasa.

7.5.1 La NOS es la fuente de producción de las ERO en las células LLC-PK1 pre-tratadas con la IsoLQ y con el CP en un estudio de curso temporal

Para determinar las fuentes de las ERO intracelulares, se utilizó DPI, un inhibidor de la NOX, o L-NAME, un inhibidor de la NOS. El DPI no disminuye la producción de las ERO en ninguno de los grupos de las células tratadas, mientras que el uso de L-NAME disminuyó la producción de las ERO a las 16 h en las células tratadas con la IsoLQ y el CP a los mismos niveles del grupo control, y este efecto permanece hasta las 24 h (**Figura 14**) mientras que, en las células tratadas con el CP, la producción de las ERO disminuyó solo a las 16 h.

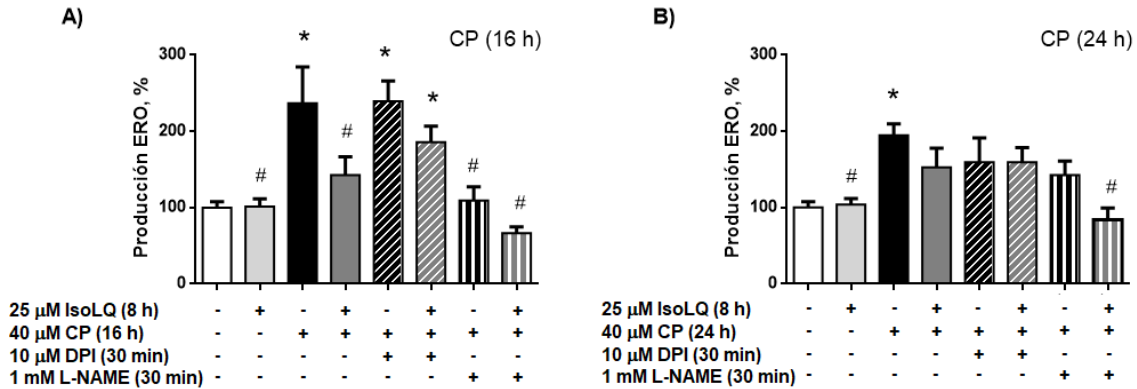


Figura 14. La óxido nítrico sintasa (NOS) es la principal fuente de producción de las especies reactivas de oxígeno (ERO) en las células LLC-PK1 pre-tratadas 8 h con la isoliquiritigenina (IsoLQ) y subsecuentemente con el cisplatino (CP). A) 16 h de exposición con el CP. B) 24 h de exposición con el CP. n=3 experimentos independientes (9-12 datos). Datos promedio \pm EEM. *p<0.05 vs. control, #p<0.05 vs. CP. Abreviaturas: DPI: cloruro de difeniliodonio; L-NAME: N-nitro-L-arginina metil éster.

Modelo *in vivo*

7.6 El pre-tratamiento con la IsoLQ disminuye el daño renal en la nefrotoxicidad inducida por el CP en ratas

En la **Figura 15A** se observa que a partir del día 4 (24 h después del tratamiento con el CP) el peso de los animales tratados con el CP disminuye en un 3.5% (\approx 8 g), siendo significativo al día 6 (72 h después del tratamiento con el CP) disminuyendo en un 18% (\approx 44 g), el cual no se restableció con el pre-tratamiento con la IsoLQ. Sin embargo, el pre-tratamiento mejora la función renal al disminuir la creatinina plasmática y el BUN (**Figura 15B y C**) y prevenir la disminución (no significativa) en la actividad de la GPx en plasma (**Figura 15D**). Adicionalmente, se realizó un esquema de co-tratamiento con diferentes dosis de IsoLQ y se evaluaron los marcadores de daño renal mencionados anteriormente. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas (**Anexo 2**), lo anterior podría indicar que este antioxidante es más efectivo en un esquema de pre-tratamiento. Algunos de los antioxidantes utilizados en la toxicidad inducida por el CP tienen efectos protectores con esquemas de pre-tratamiento en lugar de esquemas de co-tratamiento.

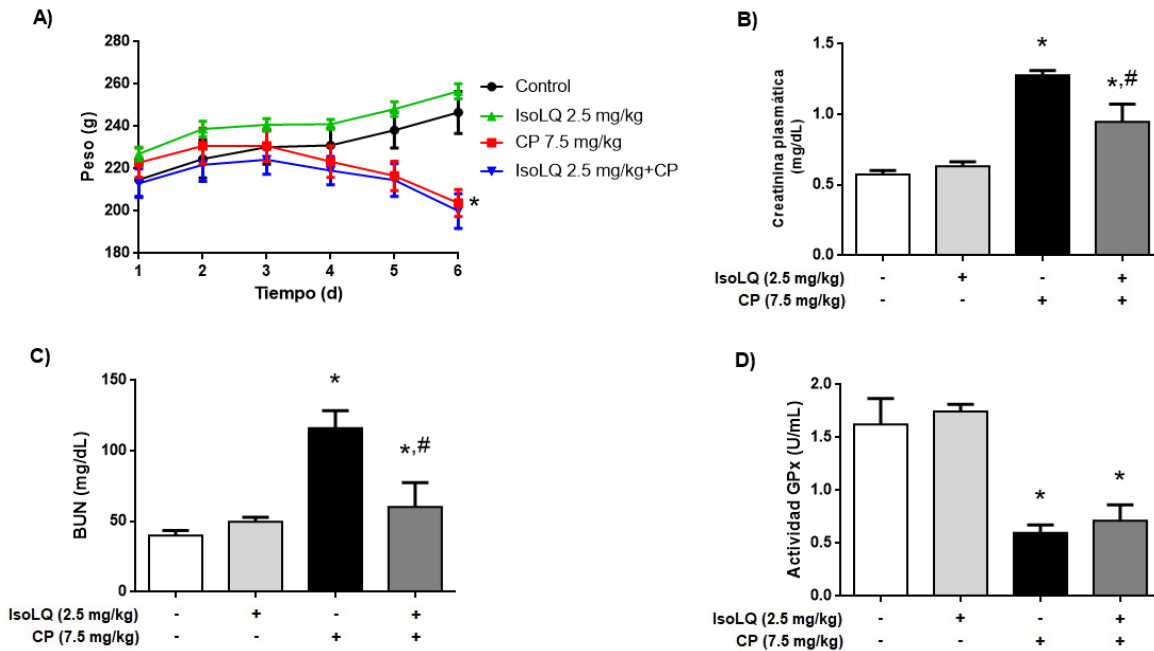


Figura 15. Efecto del pre-tratamiento con la isoliquiritigenina (IsoLQ) en el peso corporal y marcadores de daño renal en la toxicidad inducida por cisplatino (CP). A) Peso corporal. B) Creatinina plasmática. C) Nitrógeno de urea en sangre (BUN). D) Glutación Peroxidasa (GPx) en plasma. n=5-8 ratas por grupo. Datos promedio \pm EEM. * $p < 0.05$ vs control, # $p < 0.05$ vs CP.

7.7 El pre-tratamiento con la IsoLQ no induce estrés de RE en la nefrotoxicidad inducida por CP en ratas

Los polifenoles como la IsoLQ son reguladores positivos o negativos del estrés de RE, su efecto dependerá de la dosis. En la **Figura 16** no se observan cambios en la expresión de las chaperonas GRP78 y GRP94. Es probable que no se observen cambios en estos marcadores de estrés de RE porque los efectos del CP son diferenciales en la nefrona y en este caso se están evaluando en la corteza renal. Además, el estrés de RE es una respuesta dinámica, es posible que los cambios en la expresión de estas chaperonas ocurrieran en tiempos más cortos, por ejemplo 24 h después de la exposición con el CP y en este caso se evaluaron a las 72 h de la exposición con el CP.

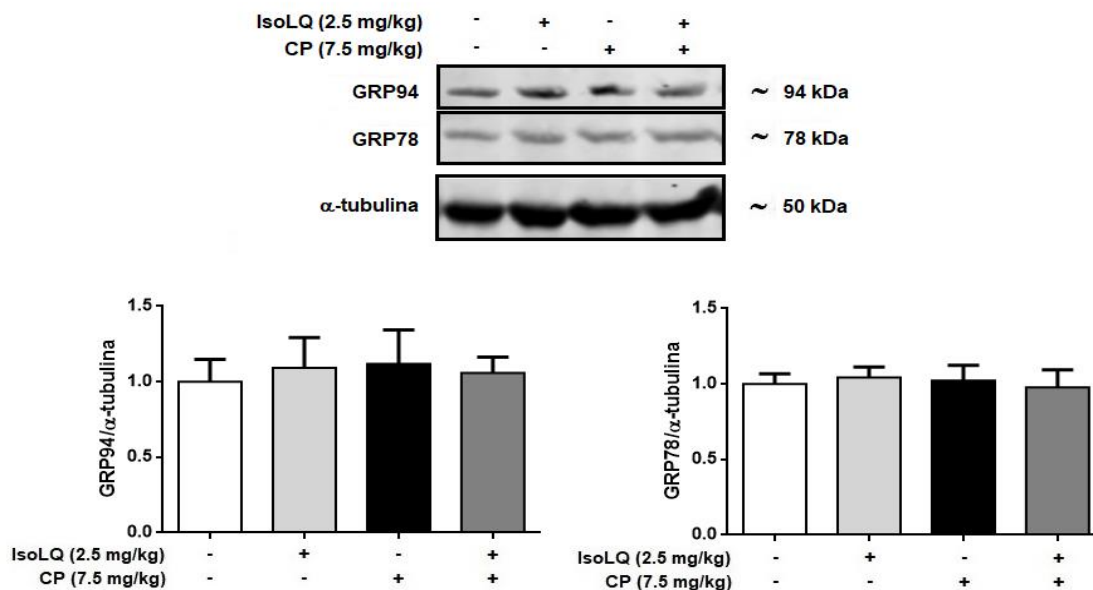


Figura 16. El pre-tratamiento con la isoliquiritigenina (IsoLQ) no induce estrés de retículo endoplásmico (RE). n=3 experimentos independientes. Datos promedio \pm EEM. **Abreviaturas:** CP: cisplatino; IsoLQ: isoliquiritigenina; GRP94: proteína relacionada con la glucosa de 94 kDa; GRP78: proteína relacionada con la glucosa de 78 kDa.

7.8 El pre-tratamiento con la IsoLQ previene la disminución del sistema antioxidante y atenúa el estrés oxidante en la toxicidad renal inducida por el CP en ratas

La IsoLQ es un antioxidante bifuncional. El pre-tratamiento con la IsoLQ (2.5 mg/kg) previene la disminución de la actividad de la GPx y la GR en la corteza renal (**Figura 17A y B**) y atenúa la lipoperoxidación (**Figura 17F**). La actividad de las enzimas GST, SOD y CAT en la corteza renal no se modifica entre los diferentes grupos experimentales (**Figura 17C, D y E**).

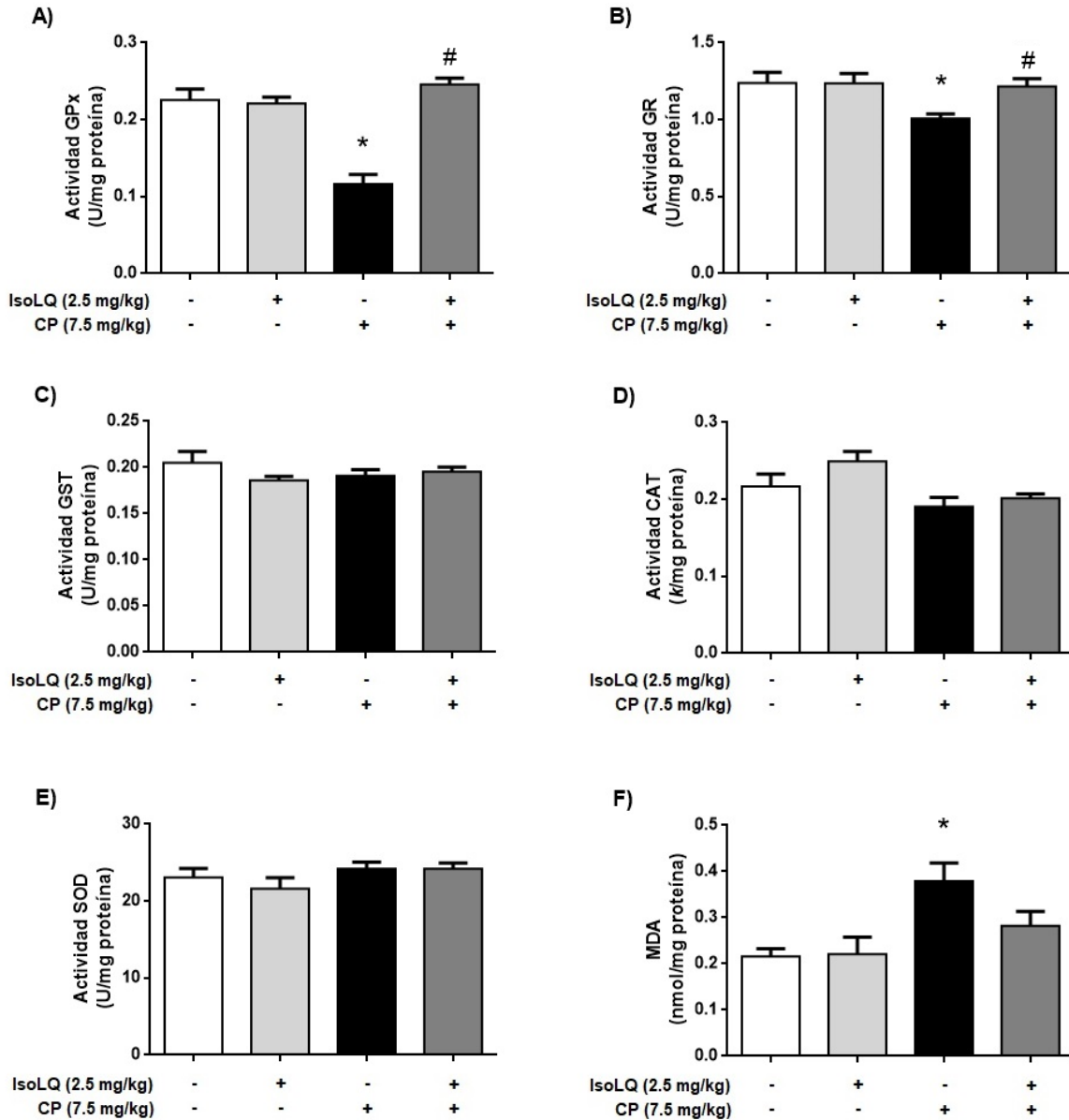


Figura 17. El pre-tratamiento con la isoliquiritigenina (IsoLQ) disminuye el estrés oxidante en la nefrotoxicidad inducida por cisplatino (CP) en ratas. A) Actividad de la glutatión peroxidasa (GPx). B) Actividad de la glutatión reductasa (GR). C) Actividad de la glutatión-S-transferasa (GST). D) Actividad de la catalasa (CAT). E) Actividad de la superóxido dismutasa (SOD). F) Contenido de malondialdehído (MDA). n=5-8 ratas por grupo. Datos promedio \pm EEM. *p<0.05 vs control, #p<0.05 vs CP.

8. DISCUSIÓN

El CP es un antineoplásico que, a pesar de inducir daño renal como efecto secundario en los pacientes tratados con este fármaco, continúa utilizándose en el tratamiento del cáncer debido a su eficacia. La nefrotoxicidad inducida por el CP implica una variedad de interacciones complejas entre la unión al ADN, la disfunción mitocondrial, el estrés de RE, el estrés oxidante y la inflamación y aunque estos mecanismos han sido ampliamente estudiados aún no se conoce con exactitud la contribución de cada uno de ellos en el daño renal inducido por el CP. A partir del conocimiento de las principales vías involucradas en la nefrotoxicidad inducida por el CP, se han desarrollado tratamientos dirigidos con antioxidantes para prevenirla. Aunque existe una gran evidencia derivada de los estudios preclínicos, los estudios clínicos son escasos, sin embargo, en éstos se ha demostrado una mejora en la función renal.

La IsoLQ es un flavonoide con propiedades antiinflamatorias, antitumorales y antioxidantes (Chen et al., 2019; Kim et al., 2008; Lee et al., 2008; Ramalingam et al., 2018; Sun et al., 2013; Wang et al., 2017) que ejerce efectos protectores en las células hepáticas y renales (Lee et al., 2008; Lee et al., 2013; Moreno-Londoño et al., 2017; Peng et al., 2015; Ramalingam et al., 2018; Wang et al., 2020). Además, se ha demostrado que IsoLQ no interfiere con la actividad antineoplásica de CP (Lee et al., 2008). Uno de los objetivos de este trabajo fue explorar si el pre-tratamiento con la IsoLQ induce estrés de RE, produce hormesis y atenúa el estrés oxidante para proteger a las células epiteliales renales de cerdo (LLC-PK1) contra la toxicidad inducida por el CP. El efecto de la IsoLQ sobre la viabilidad celular en la nefrotoxicidad inducida por el CP fue una dosis-respuesta bifásica: bajas concentraciones de la IsoLQ atenúan la disminución de la viabilidad celular, mientras las altas concentraciones de la IsoLQ la inhibieron. Este efecto se conoce como hormesis, término que se refiere a una respuesta celular biológica favorable (Bhakta-Guha & Efferth, 2015; Calabrese & Baldwin, 1997, 2001; Calabrese & Mattson, 2017; Lushchak, 2014; Mattson, 2008). Las curvas dosis-respuesta de las células pre-tratadas con la IsoLQ y posteriormente con el CP tienen la forma de J invertida y además estas curvas bifásicas tienen un intervalo denominado zona hormética donde los efectos benéficos son evidentes

(Figura 7) (Breithaupt, 2003; Calabrese & Baldwin, 1997, 2001; Lushchak, 2014). La estimulación con dosis bajas de la IsoLQ, refleja la capacidad de las células para distribuir los recursos biológicos que ayudan a defender al organismo de una amplia gama de agentes estresantes, como el CP. Este mecanismo adaptativo reduce el daño de manera más efectiva que la respuesta inducida solo por la exposición al estresante (Calabrese, 2008; Calabrese & Baldwin, 1997; Mattson, 2008; Zimmermann et al., 2014). Por lo tanto, la hormesis es más que una simple relación dosis-respuesta, es una manifestación cuantitativa y temporal de procesos reparadores que son de naturaleza adaptativa, como la UPR generada por el estrés de RE (Bhakta-Guha & Efferth, 2015; Calabrese, 2008; Calabrese & Baldwin, 1997; Calabrese & Mattson, 2017; Cox, 2012; Mollereau, 2013; Mollereau et al., 2014).

Los datos obtenidos en esta tesis muestran que el pre-tratamiento de 8 h con la IsoLQ 25 μM indujo estrés de RE y también atenuó la muerte inducida por la exposición con el CP 40 μM en las células LLC-PK1. El aumento de la expresión de las chaperonas GRP78 y GRP94 indica la inducción de estrés de RE y sugiere la activación de la UPR (Almanza et al., 2019; Cybulsky, 2017; Dufey et al., 2014; Hiramatsu et al., 2015; Kitamura, 2008; Schönthal, 2012; Urra et al., 2013). La inducción temprana de estrés de RE podría desempeñar un papel clave en la supervivencia celular, porque el estrés de RE inducido por el pre-tratamiento con la IsoLQ generó un efecto hormético para activar respuestas adaptativas como la UPR, que puede proteger contra niveles de estrés más altos como ocurre en la nefrotoxicidad inducida por el CP. En modelos *in vitro* e *in vivo* de las enfermedades renales, como la isquemia-reperfusión renal o la exposición a compuestos citotóxicos, la inducción *a priori* del estrés de RE con compuestos farmacológicos o naturales genera tolerancia contra estas agresiones (hipoxia, estrés oxidante) para inhibir la muerte celular apoptótica (Bedard et al., 2004; Cybulsky, 2017; Inagi, 2010; Kitamura, 2008; Peyrou & Cribb, 2007; Prachasilchai et al., 2008; Xu et al., 2016; Yan et al., 2018).

Es importante destacar que el aumento en la expresión de las chaperonas GRP78 y GRP94 y la inducción de estrés de RE, no implica la activación simultánea de las tres vías de la UPR, el estrés de RE es un sistema dinámico y en constante cambio, la activación de cada vía dependerá del entorno y de las necesidades de la célula para restaurar su homeostasis

(Song et al., 2017; Sureshababu et al., 2015). La vía de PERK/p-eIF2 α /ATF4 de la UPR tiene un papel fundamental en la toxicidad inducida por el CP, debido a que disminuye la síntesis de proteínas, induce la respuesta antioxidante, la autofagia y está relacionada con la función mitocondrial, orgánulo dañado por el CP (Urrea et al., 2013; Rainbolt et al., 2014; Song et al., 2017; Lebeau et al., 2018). Al evaluarse la expresión de PERK (**Anexo 2**) no se observaron cambios, aunque hay un discreto aumento en los grupos CP e IsoLQ+CP, es necesario también evaluar la forma activa (fosforilada), sin embargo el aumento de la expresión de ATF4 a las 16 h de exposición del CP (**Figura 12**) indican que la vía está activa, debido a que este factor de transcripción está por debajo de la vía de señalización de PERK (Almanza et al., 2019; Dufey et al., 2014). El ATF4 es considerado un regulador maestro ante la respuesta al estrés, debido a que su principal objetivo es promover la sobrevivencia celular, aunque también puede inducir apoptosis (Wortel et al., 2017). En el modelo experimental la inducción de ATF4 podría indicar que tiene un efecto benéfico porque es temporal, se observa únicamente a las 16 h de exposición con el CP, si ATF4 continuara expresándose podría inducir la expresión de CHOP que está relacionada con la apoptosis mediada por el estrés de RE, sin embargo a las 24 h de exposición con el CP no se observan cambios en la expresión de ATF4 y además no hay cambios en la expresión de CHOP (**Anexo 2**), es posible que la vía de PERK continúe activa a las 24 h de exposición con el CP debido a que la expresión de las chaperonas GRP78 y GRP94 se mantiene en estos tiempos, sin embargo se tendría que evaluar la expresión de PERK y eIF2 α para corroborarlo.

Los efectos directos de la inducción de ATF4 en la células LLC-PK1 serían a través del aumento en el transporte de aminoácidos y enzimas, la respuesta antioxidante y la síntesis de chaperonas (Almanza et al., 2019; Dufey et al., 2014; Wortel et al., 2017). También, el ATF4 de manera indirecta puede regular genes relacionados con la autofagia (Wortel et al., 2017), este es un proceso catabólico a través de los cuales el contenido celular se transporta a los lisosomas o endosomas para ser degradado o reciclado (Galluzzi et al., 2017; Klionsky et al., 2016; Klionsky & Emr, 2000). La autofagia es un proceso complejo en el cual están involucradas diferentes proteínas, una de ellas es beclina-1 que regula de manera coordinada la autofagia y el tráfico de membranas (Kang et al., 2011; McKnight & Yue,

2013). En las células LLC-PK1 se evaluó la expresión de beclina-1 a las 16 h de exposición con el CP (**Figura 12**), la sobreexpresión de esta proteína se relaciona con la inducción de autofagia, aunque también puede participar en procesos como apoptosis y endocitosis (McKnight & Yue, 2013). En los grupos CP e IsoLQ+CP se observa un aumento en la expresión de beclina-1, es posible que en el grupo pre-tratado con IsoLQ actúe como un mecanismo de protección, mientras que en el grupo tratado únicamente con CP podría contribuir al daño celular, porque aunque las ERO induzcan la autofagia como mecanismo de reparación y sobrevivencia, la excesiva producción de ERO causada por el CP, generan estrés oxidante e inflamación, lo cual altera el flujo autofágico y desencadena la muerte celular (Sano & Reed, 2013; Sureshbabu et al., 2015). Sin embargo, es necesario evaluar el flujo autofágico para determinar el papel de ésta en el modelo experimental.

Por otro lado, el estrés oxidante también es característico de la nefrotoxicidad inducida por el CP y es un factor importante en el desarrollo y progresión de los otros mecanismos de daño asociados, tales como disfunción mitocondrial, inflamación y estrés de RE (Cao & Kaufman, 2013; Dasari & Bernard Tchounwou, 2014; dos Santos et al., 2012; Manohar & Leung, 2018; Miller et al., 2010; Pabla & Dong, 2008). Las ERO se generan de forma natural y regulan diferentes funciones celulares (Halliwell, 2007; Small et al., 2012). Sin embargo, cantidades excesivas de las ERO pueden provocar daños a las proteínas, modificando su función y alterando la homeostasis del RE (Almanza et al., 2019; Bhandary et al., 2012; Malhotra & Kaufman, 2007; Reyes-Fermín et al., 2020). La sobreproducción de las ERO puede ser detectado por el RE, que es muy sensible a los cambios en los niveles de las ERO a través de sensores redox, como los grupos tiol de las cisteínas (Cao & Kaufman, 2013; Goligorsky, 2016; Mailloux et al., 2014; Ozgur et al., 2018; Ursini et al., 2016; Xiong et al., 2011), que provocan una acumulación de proteínas mal plegadas y consecuentemente aumentan la producción de las ERO, lo que conduce a un círculo vicioso capaz de activar la UPR, generar estrés crónico e inducir apoptosis (Cao & Kaufman, 2013; Malhotra & Kaufman, 2007; Ozgur et al., 2018; Reyes-Fermín et al., 2020; Small et al., 2012). Además, la sobreproducción de las ERO provoca una disminución en la relación GSH/GSSG y en los niveles de las enzimas antioxidantes, mientras se oxidan los lípidos, el

ADN, y proteínas (dos Santos et al., 2012; Manohar & Leung, 2018; Pabla & Dong, 2008; Peres & Cunha Júnior, 2013; Miller, 2010). En este modelo experimental, la producción de las ERO podría asociarse a la actividad de la NOS y, en consecuencia, la sobreproducción del $O_2^{\cdot-}$ que potencia el estrés oxidante. Sin embargo, la IsoLQ puede atenuar este desequilibrio oxidante debido a su capacidad de captación de las ERO (Ramalingam et al., 2018; Wang et al., 2017) y probablemente por la respuesta antioxidante inducida por la activación de la vía de PERK/p-eIF2 α /ATF4 de la UPR. En la toxicidad inducida por el CP, la disminución de la relación GSH/GSSG es característica debido a la formación de aductos con el GSH y el CP. Las especies del CP con carga positiva (sus formas activas) tienen una gran afinidad por los grupos tiol (dos Santos et al., 2012; Haynes et al., 2004; Miller et al., 2010; Pabla & Dong, 2008; Townsend, 2003) y, en consecuencia, existe una alteración en la actividad de las enzimas relacionadas con metabolismo del GSH (Haynes et al., 2004; Peres & Cunha Júnior, 2013). Además, la disminución del GSH podría estar asociada con la formación de enlaces disulfuro entre proteínas mal plegadas en una reacción acoplada con la PDI y la oxidorreductasa 1 del RE (Bhandary et al., 2012; Birk et al., 2013; Ognjanović et al., 2012; Uzilday et al., 2018; Zaaza et al., 2019).

Curiosamente, la inducción de estrés de RE también se asocia con un aumento en la biosíntesis de GSH con la finalidad de formar enlaces disulfuro entre proteínas y reciclar proteínas desplegadas. Este efecto podría explicar el aumento de tioles libres, como GSH, en células pre-tratadas con la IsoLQ (Ozgur et al., 2018; Uzilday et al., 2018). Además, ha sido descrito que el estrés de RE aumenta la actividad de enzimas antioxidantes como la GR, la GPx y la GST (Dufey et al., 2014; Ozgur et al., 2018; Uzilday et al., 2018). Probablemente, el aumento en la actividad de la GR en las células pre-tratadas con la IsoLQ se debió a este efecto, ya que la IsoLQ también es un antioxidante bifuncional capaz de inducir la expresión de enzimas citoprotectoras de fase II a través de la regulación de Nrf2 (Moreno-Londoño et al., 2017; Orlikova et al., 2011). De manera interesante, PERK fosforila directamente a Nrf2 (Cullinan et al., 2003; Huang et al., 2020; Zhu et al., 2019), induciendo la disociación de su regulador negativo Keap1 y con ello se trasloca al núcleo, lo que lleva a la transcripción de genes que codifican enzimas citoprotectoras de fase II que

mantienen la homeostasis redox y pueden contribuir a la supervivencia celular (Cullinan et al., 2003). Es necesario un estudio más profundo sobre el papel de las proteínas de la UPR y el estrés oxidante para describir y comprender los mecanismos implicados en el efecto hormético producido por la IsoLQ en las células LLC-PK1 en la toxicidad inducida por el CP. En la **Figura 18** se presenta el mecanismo de protección de la IsoLQ en la toxicidad inducida por el CP en células LLC-PK1, esto se realizó basado en las principales observaciones de este trabajo.

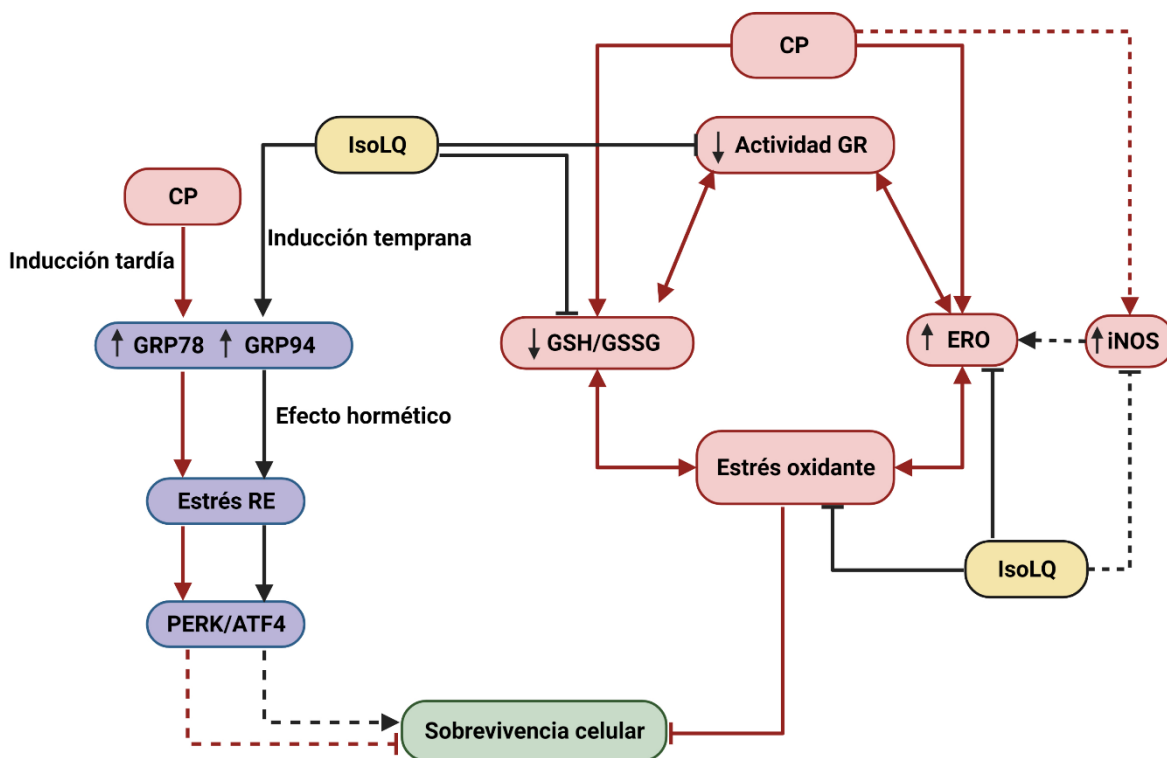


Figura 18. Esquema integrativo del modelo *in vitro*. El pre-tratamiento con la IsoLQ aumenta la expresión de GRP78 y GRP94 y consecuentemente inducen el estrés de RE, el cual activa temporalmente la vía de PERK/ATF4. El efecto hormético generado por el estrés de RE y también por las propiedades antioxidantes de la IsoLQ atenúan el estrés oxidante disminuyendo la producción de las ERO, asociadas a la actividad de la NOS, además, atenúa la reducción de la relación GSH/GSSG y la actividad de la GR. La combinación de estos efectos favorece la supervivencia celular en la toxicidad inducida por el CP en las células LLC-PK1. Las líneas punteadas indican la posible participación de esta vía. Figura elaborada con Biorender.com. **Abreviaturas:** ATF4: activador del factor de transcripción

4; CP: cisplatino; ERO: especies reactivas de oxígeno; GRP78: proteína regulada por glucosa de 78 kDa, GRP94; proteína regulada por glucosa de 94 kDa; GSH: glutatión; GSSG: glutatión disulfuro; IsoLQ: isoliquiritigenina; NOS: óxido nítrico sintasa; PERK: proteína cinasa del RE activada por RNA de doble cadena; RE: retículo endoplásmico.

En el modelo *in vitro* se demostró que el efecto protector de la IsoLQ es a través de sus propiedades antioxidantes, así como inductor de estrés de RE. Por lo cual, el segundo objetivo de este trabajo fue evaluar si el pre-tratamiento en ratas con la IsoLQ tiene un efecto protector en la insuficiencia renal aguda inducida por el CP a través de sus propiedades antioxidantes y como regulador del estrés de RE. En diferentes estudios se ha demostrado que una dosis de CP de 7.5 mg/kg p.c en ratas induce daño renal, la cual se caracteriza por el aumento en los niveles de creatinina plasmática y BUN. El pre-tratamiento con la IsoLQ en las ratas disminuyó estos marcadores de daño renal lo cual sugiere que este antioxidante podría tener efectos protectores en el riñón, es posible que sea a nivel tubular debido a que se observa un ligero aumento, aunque no es significativo, en la actividad de la GPx en plasma.

Al analizarse los marcadores de estrés oxidante, se observa que el efecto protector de la IsoLQ en el modelo *in vivo* se asocia a sus propiedades antioxidantes, debido a que restaura la actividad de la GPx y la GR (**Figura 17**) y posiblemente también los niveles de GSH, debido a que la GR es un componente esencial para mantener al GSH, el cual será utilizado por la GPx para reducir al H₂O₂ o el ROOH y con ello disminuir las ERO (Couto et al., 2016). Estas ERO pueden extraer un hidrógeno del grupo metileno de un ácido graso, formando un radical lipídico el cual reacciona con el oxígeno molecular y forma el ROO[•], éste genera hidroperóxidos y finalmente forman el MDA (Konigsberg, 2008; Phaniendra et al., 2015; Pizzino et al., 2017). Es probable que a través de las propiedades antioxidantes directas e indirectas de la IsoLQ (Wang et al., 2017) contribuyan a la disminución de la lipoperoxidación en este modelo experimental. Finalmente, es necesario explorar el papel del estrés de RE y del estrés oxidante para describir y comprender los mecanismos implicados en el mecanismo de protección producido por la IsoLQ en la toxicidad inducida

por el CP en ratas. En la **Figura 19** se presenta el mecanismo de protección de la IsoLQ en este modelo experimental, derivado de las principales observaciones de este trabajo.

Por otro lado, al analizarse los marcadores de estrés de RE como GRP78 y GRP94 en la corteza renal, no se encontraron diferencias, es posible que se requieran dosis más altas para inducir estrés de RE o que al ser una respuesta dinámica, los cambios no se observen debido a que la evaluación se realizó 72 h después de la administración del CP y de la IsoLQ (**Figura 16**). Es importante destacar que la expresión de las chaperonas se determinaron en la corteza renal, probablemente para observar cambios en la expresión de las chaperonas se tenga que realizar un aislamiento de las diferentes secciones de la nefrona, en particular de los túbulos proximales, debido a que el CP afecta esta sección en particular (Kröning et al., 1999; van Angelen et al., 2013). Con estos resultados no es posible afirmar si la IsoLQ es un regulador de estrés de RE en este modelo experimental.

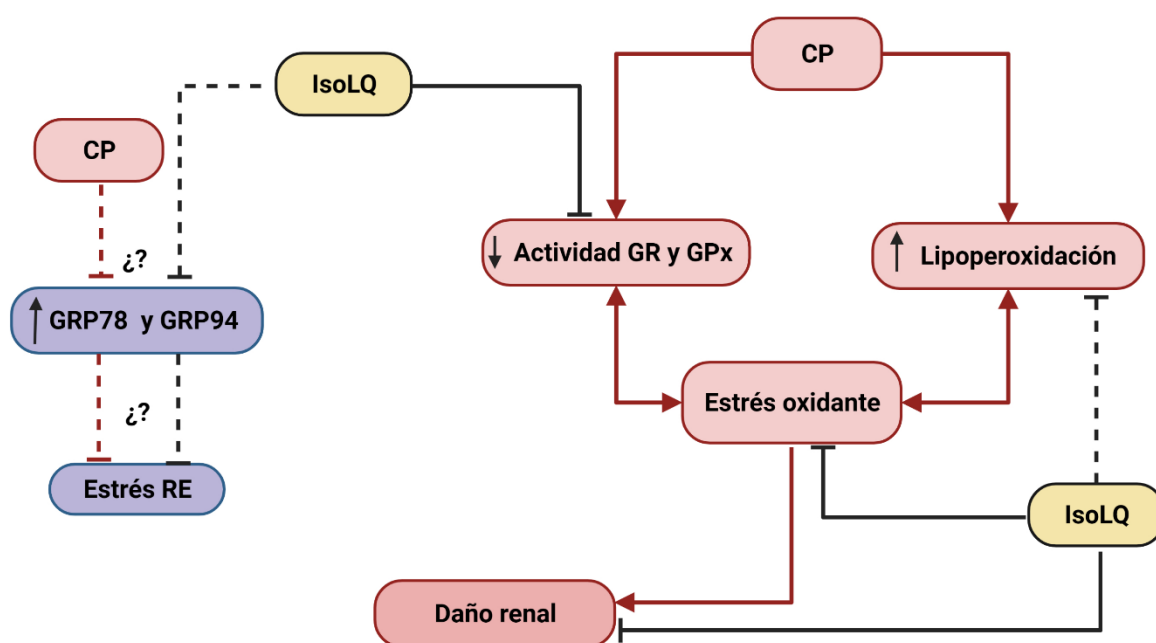


Figura 19. Esquema integrativo del modelo *in vivo*. El pre-tratamiento con la IsoLQ atenúa el daño renal al disminuir la creatinina plasmática y el BUN, además restaura la actividad de las enzimas antioxidantes GR y GPx en la corteza renal. Las líneas punteadas indican efectos sugeridos. Figura elaborada con Biorender.com. **Abreviaturas:** CP: cisplatino; GR: glutatión reductasa; GRP78: proteína regulada por glucosa de 78 kDa; GPx: glutatión peroxidasa; IsoLQ: isoliquiritigenina; RE: retículo endoplásmico.

9. CONCLUSIONES

La IsoLQ es un inductor de estrés de RE en las células LLC-PK1, la inducción temprana del estrés de RE genera un efecto hormético que activa las respuestas adaptativas de la UPR, particularmente de la vía de PERK/p-eIF2 α /ATF4 que le permiten a la célula generar tolerancia contra el daño inducido por el CP. La activación de esta vía podría estar implicada con la respuesta antioxidante de la IsoLQ debido a que el pre-tratamiento con ésta disminuye el estrés oxidante en el modelo experimental.

Los efectos protectores de la IsoLQ en el modelo *in vivo* están relacionados con sus propiedades antioxidantes al restaurar la actividad de las enzimas antioxidantes GR y GPx y atenuar la lipoperoxidación. Se requieren estudios adicionales para determinar si la IsoLQ es un regulador del estrés de RE en ratas.

10. PERSPECTIVAS

- En el modelo *in vitro* se plantea evaluar las otras vías de la UPR y el flujo autofágico para determinar la contribución de cada una de ellas en el mecanismo de daño del CP y de protección de la IsoLQ.
- Evaluar las alteraciones mitocondriales en el modelo *in vitro* para relacionarlo con el estrés de RE y determinar el impacto que tiene la mitocondria sobre el estrés de RE y viceversa.
- Realizar un pre-tratamiento con IsoLQ en las células de cáncer de vejiga y posteriormente con CP, para elaborar una curva de dosis respuesta hormética y evaluar la inducción del estrés de RE y el estrés oxidante.
- Con un esquema de pre-tratamiento con IsoLQ en ratas, realizar el aislamiento de las fracciones renales para evaluar en un curso temporal los marcadores de daño renal, el estrés oxidante y estrés de RE en la toxicidad inducida por el CP.

11. REFERENCIAS

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121–126. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05016-3)
- Agellon, L. B., & Michalak, M. (2017). The Endoplasmic Reticulum and the Cellular Reticular Network. In J. Krebs (Ed.), *Membrane Dynamics and Calcium Signaling* (Vol. 981, pp. 61–76). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-55858-5_4
- Almanza, A., Carlesso, A., Chintha, C., Creedican, S., Doultinos, D., Leuzzi, B., Luís, A., McCarthy, N., Montibeller, L., More, S., Papaioannou, A., Püschel, F., Sassano, M. L., Skoko, J., Agostinis, P., de Bellerocche, J., Eriksson, L. A., Fulda, S., Gorman, A. M., ... Samali, A. (2019). Endoplasmic reticulum stress signalling—From basic mechanisms to clinical applications. *The FEBS Journal*, 286(2), 241–278. <https://doi.org/10.1111/febs.14608>
- Arany, I., & Safirstein, R. L. (2003). Cisplatin nephrotoxicity. *Seminars in Nephrology*, 23(5), 460–464. [https://doi.org/10.1016/s0270-9295\(03\)00089-5](https://doi.org/10.1016/s0270-9295(03)00089-5)
- Baribeau, S., Chaudhry, P., Parent, S., & Asselin, É. (2014). Resveratrol Inhibits Cisplatin-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Ovarian Cancer Cell Lines. *PLoS ONE*, 9(1), e86987. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086987>
- Bedard, K., MacDonald, N., Collins, J., & Cribb, A. (2004). Cytoprotection Following Endoplasmic Reticulum Stress Protein Induction in Continuous Cell Lines. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 94(3), 124–131. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2004.pto940305.x>
- Berridge, M. J. (2002). The endoplasmic reticulum: A multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium*, 32(5–6), 235–249. <https://doi.org/10.1016/S0143416002001823>
- Bhakta-Guha, D., & Efferth, T. (2015). Hormesis: Decoding Two Sides of the Same Coin. *Pharmaceuticals*, 8(4), 865–883. <https://doi.org/10.3390/ph8040865>
- Bhandary, B., Marahatta, A., Kim, H.-R., & Chae, H.-J. (2012). An Involvement of Oxidative Stress in Endoplasmic Reticulum Stress and Its Associated Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(1), 434–456. <https://doi.org/10.3390/ijms14010434>

- Bhat, Z. Y., Cadnapaphornchai, P., Ginsburg, K., Sivagnanam, M., Chopra, S., Treadway, C. K., Lin, H.-S., Yoo, G., Sukari, A., & Doshi, M. D. (2015). Understanding the Risk Factors and Long-Term Consequences of Cisplatin-Associated Acute Kidney Injury: An Observational Cohort Study. *PLOS ONE*, *10*(11), e0142225. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142225>
- Birk, J., Meyer, M., Aller, I., Hansen, H. G., Odermatt, A., Dick, T. P., Meyer, A. J., & Appenzeller-Herzog, C. (2013). Endoplasmic reticulum: Reduced and oxidized glutathione revisited. *Journal of Cell Science*, *126*(7), 1604–1617. <https://doi.org/10.1242/jcs.117218>
- Braakman, I., & Hebert, D. N. (2013). Protein Folding in the Endoplasmic Reticulum. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *5*(5), a013201–a013201. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013201>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Breithaupt, H. (2003). Fierce creatures: Zoonoses, diseases that jump from animals to humans, are a growing health problem around the world. Understanding their causes and their effects on humans have therefore become an important topic for global public health. *EMBO Reports*, *4*(10), 921–924. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.embor949>
- Calabrese, E. J. (2008). Hormesis: why it is important to toxicology and toxicologists. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *27*(7), 1451. <https://doi.org/10.1897/07-541.1>
- Calabrese, E. J., & Baldwin, L. A. (1997). The Dose Determines the Stimulation (and Poison): Development of A Chemical Hormesis Database. *International Journal of Toxicology*, *16*(6), 545–559. <https://doi.org/10.1080/109158197226874>
- Calabrese, E. J., & Baldwin, L. A. (2001). U-Shaped Dose-Responses in Biology, Toxicology, and Public Health. *Annual Review of Public Health*, *22*(1), 15–33. <https://doi.org/10.1146/annurev.publhealth.22.1.15>

- Calabrese, E. J., & Mattson, M. P. (2017). How does hormesis impact biology, toxicology, and medicine? *Npj Aging and Mechanisms of Disease*, 3(1), 13. <https://doi.org/10.1038/s41514-017-0013-z>
- Cao, A.-L., Wang, L., Chen, X., Wang, Y.-M., Guo, H.-J., Chu, S., Liu, C., Zhang, X.-M., & Peng, W. (2016). Ursodeoxycholic acid and 4-phenylbutyrate prevent endoplasmic reticulum stress-induced podocyte apoptosis in diabetic nephropathy. *Laboratory Investigation*, 96(6), 610–622. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2016.44>
- Cao, S. S., & Kaufman, R. J. (2013). Targeting endoplasmic reticulum stress in metabolic disease. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 17(4), 437–448. <https://doi.org/10.1517/14728222.2013.756471>
- Carlberg, I., & Mannervik, E. B. (1975). Glutathione Level in Rat Brain. *250*, 4475–4480.
- Chandrika, B. B., Yang, C., Ou, Y., Feng, X., Muhoza, D., Holmes, A. F., Theus, S., Deshmukh, S., Haun, R. S., & Kaushal, G. P. (2015). Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Autophagy Provides Cytoprotection from Chemical Hypoxia and Oxidant Injury and Ameliorates Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *PLOS ONE*, 10(10), e0140025. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140025>
- Chen, B., Liu, G., Zou, P., Li, X., Hao, Q., Jiang, B., Yang, X., & Hu, Z. (2015). Epigallocatechin-3-gallate protects against cisplatin-induced nephrotoxicity by inhibiting endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Experimental Biology and Medicine*, 240(11), 1513–1519. <https://doi.org/10.1177/1535370215573394>
- Chen, C., Huang, S., Chen, C.-L., Su, S.-B., & Fang, D.-D. (2019). Isoliquiritigenin Inhibits Ovarian Cancer Metastasis by Reversing Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Molecules*, 24(20), 3725. <https://doi.org/10.3390/molecules24203725>
- Chen, H.-Y., Huang, T.-C., Shieh, T.-M., Wu, C.-H., Lin, L.-C., & Hsia, S.-M. (2017). Isoliquiritigenin Induces Autophagy and Inhibits Ovarian Cancer Cell Growth. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10), 2025. <https://doi.org/10.3390/ijms18102025>
- Chirino, Y. I., & Pedraza-Chaverri, J. (2009). Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 61(3), 223–242. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2008.09.003>

- Clarke, J. M., Gillings, M. R., Altavilla, N., & Beattie, A. J. (2001). Potential problems with fluorescein diacetate assays of cell viability when testing natural products for antimicrobial activity. *Journal of Microbiological Methods*, 46(3), 261–267. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(01\)00285-8](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(01)00285-8)
- Coe, H., & Michalak, M. (2009). Calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *General Physiology and Biophysics*, 28 Spec No Focus, F96–F103.
- Cortez, L., & Sim, V. (2014). The therapeutic potential of chemical chaperones in protein folding diseases. *Prion*, 8(2), 197–202. <https://doi.org/10.4161/pri.28938>
- Couto, N., Wood, J., & Barber, J. (2016). The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radical Biology and Medicine*, 95, 27–42. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.028>
- Cox, L. A. (2012). Hormesis for Fine Particulate Matter. *Dose-Response*, 10(2), dose-response.1. <https://doi.org/10.2203/dose-response.11-040.Cox>
- Cullinan, S. B., Zhang, D., Hannink, M., Arvisais, E., Kaufman, R. J., & Diehl, J. A. (2003). Nrf2 Is a Direct PERK Substrate and Effector of PERK-Dependent Cell Survival. *Molecular and Cellular Biology*, 23(20), 7198–7209. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.20.7198-7209.2003>
- Cunard, R., & Sharma, K. (2011). The endoplasmic reticulum stress response and diabetic kidney disease. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 300(5), F1054–F1061. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00021.2011>
- Cybulsky, A. V. (2010). Endoplasmic reticulum stress in proteinuric kidney disease. *Kidney International*, 77(3), 187–193. <https://doi.org/10.1038/ki.2009.389>
- Cybulsky, A. V. (2017). Endoplasmic reticulum stress, the unfolded protein response and autophagy in kidney diseases. *Nature Reviews Nephrology*, 13(11), 681–696. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2017.129>
- Dasari, S., & Bernard Tchounwou, P. (2014). Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 740, 364–378. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>

- Dean, R. T., Fu, S., Stocker, R., & Davies, M. J. (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochemical Journal*, 324(1), 1–18. <https://doi.org/10.1042/bj3240001>
- Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., & Rodriguez, H. (2002). Free radical-induced damage to DNA: Mechanisms and measurement 1,2 1This article is part of a series of reviews on “Oxidative DNA Damage and Repair.” The full list of papers may be found on the homepage of the journal. 2Guest Editor: Miral Dizdaroglu. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(11), 1102–1115. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00826-2](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00826-2)
- dos Santos, N. A. G., Carvalho Rodrigues, M. A., Martins, N. M., & dos Santos, A. C. (2012). Cisplatin-induced nephrotoxicity and targets of nephroprotection: An update. *Archives of Toxicology*, 86(8), 1233–1250. <https://doi.org/10.1007/s00204-012-0821-7>
- Dufey, E., Sepúlveda, D., Rojas-Rivera, D., & Hetz, C. (2014). Cellular Mechanisms of Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Health and Disease. 1. An overview. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 307(7), C582–C594. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00258.2014>
- Einhorn, L. H., & Donohue, J. (2002). Cis-diamminedichloroplatinum, vinblastine, and bleomycin combination chemotherapy in disseminated testicular cancer. 1997. *The Journal of Urology*, 167(2 Pt 2), 928–932; discussion 933.
- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82(1), 70–77. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)
- Farooqi, A. A., Li, K.-T., Fayyaz, S., Chang, Y.-T., Ismail, M., Liaw, C.-C., Yuan, S.-S. F., Tang, J.-Y., & Chang, H.-W. (2015). Anticancer drugs for the modulation of endoplasmic reticulum stress and oxidative stress. *Tumor Biology*, 36(8), 5743–5752. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3797-0>
- Forrester, S. J., Kikuchi, D. S., Hernandez, M. S., Xu, Q., & Griendling, K. K. (2018). Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. *Circulation Research*, 122(6), 877–902. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311401>

- Foufelle, F., & Fromenty, B. (2016). Role of endoplasmic reticulum stress in drug-induced toxicity. *Pharmacology Research & Perspectives*, 4(1), e00211. <https://doi.org/10.1002/prp2.211>
- Gallazzini, M., & Pallet, N. (2018). Endoplasmic reticulum stress and kidney dysfunction: Endoplasmic reticulum stress. *Biology of the Cell*, 110(9), 205–216. <https://doi.org/10.1111/boc.201800019>
- Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Levine, B., Green, D. R., & Kroemer, G. (2017). Pharmacological modulation of autophagy: Therapeutic potential and persisting obstacles. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 16(7), 487–511. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.22>
- Gao, Z., Liu, G., Hu, Z., Li, X., Yang, X., Jiang, B., & Li, X. (2014). Grape seed proanthocyanidin extract protects from cisplatin-induced nephrotoxicity by inhibiting endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Molecular Medicine Reports*, 9(3), 801–807. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.1883>
- Gérard-Monnier, D., Erdelmeier, I., Régnard, K., Moze-Henry, N., Yadan, J.-C., & Chaudière, J. (1998). Reactions of 1-Methyl-2-phenylindole with Malondialdehyde and 4-Hydroxyalkenals. Analytical Applications to a Colorimetric Assay of Lipid Peroxidation. *Chemical Research in Toxicology*, 11(10), 1176–1183. <https://doi.org/10.1021/tx9701790>
- Ghosh, S. (2019). Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorganic Chemistry*, 88, 102925. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.102925>
- Goligorsky, M. S. (2016). Oxidative Stress and the Kidney: Riding on the Curve of Hormesis. *Antioxidants & Redox Signaling*, 25(3), 117–118. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6794>
- Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 249(22), 7130–7139.
- Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 35(5), 1147–1150. <https://doi.org/10.1042/BST0351147>

- Halperin, L., Jung, J., & Michalak, M. (2014). The many functions of the endoplasmic reticulum chaperones and folding enzymes: Functions of ER Chaperones and Folding Enzymes. *IUBMB Life*, *66*(5), 318–326. <https://doi.org/10.1002/iub.1272>
- Hasegawa, S., & Inagi, R. (2020). Organelle Stress and Crosstalk in Kidney Disease. *Kidney360*, *1*(10), 1157–1164. <https://doi.org/10.34067/KID.0002442020>
- Haynes, C. M., Titus, E. A., & Cooper, A. A. (2004). Degradation of Misfolded Proteins Prevents ER-Derived Oxidative Stress and Cell Death. *Molecular Cell*, *15*(5), 767–776. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.08.025>
- Hiramatsu, N., Chiang, W.-C., Kurt, T. D., Sigurdson, C. J., & Lin, J. H. (2015). Multiple Mechanisms of Unfolded Protein Response–Induced Cell Death. *The American Journal of Pathology*, *185*(7), 1800–1808. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.03.009>
- Hu, F.-W., Yu, C.-C., Hsieh, P.-L., Liao, Y.-W., Lu, M.-Y., & Chu, P.-M. (2017). Targeting oral cancer stemness and chemoresistance by isoliquiritigenin-mediated GRP78 regulation. *Oncotarget*, *8*(55), 93912–93923. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21338>
- Hu, M.-H., Wang, L.-W., Lu, H.-J., Chu, P.-Y., Tai, S.-K., Lee, T.-L., Chen, M.-H., Yang, M.-H., & Chang, P. M.-H. (2014). Cisplatin-Based Chemotherapy versus Cetuximab in Concurrent Chemoradiotherapy for Locally Advanced Head and Neck Cancer Treatment. *BioMed Research International*, *2014*, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2014/904341>
- Huang, F., Wang, J., Xu, Y., Zhang, Y., Xu, N., & Yin, L. (2020). Discovery of novel isoliquiritigenin analogue ISL-17 as a potential anti-gastric cancer agent. *Bioscience Reports*, *40*(6), BSR20201199. <https://doi.org/10.1042/BSR20201199>
- Huang, X., Shi, Y., Chen, H., Le, R., Gong, X., Xu, K., Zhu, Q., Shen, F., Chen, Z., Gu, X., Chen, X., & Chen, X. (2020). Isoliquiritigenin prevents hyperglycemia-induced renal injuries by inhibiting inflammation and oxidative stress via SIRT1-dependent mechanism. *Cell Death & Disease*, *11*(12), 1040. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03260-9>

- Inagi, R. (2009). Endoplasmic Reticulum Stress in the Kidney as a Novel Mediator of Kidney Injury. *Nephron Experimental Nephrology*, *112*(1), e1–e9. <https://doi.org/10.1159/000210573>
- Inagi, R. (2010). Endoplasmic reticulum stress as a progression factor for kidney injury. *Current Opinion in Pharmacology*, *10*(2), 156–165. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.11.006>
- Inagi, R., Ishimoto, Y., & Nangaku, M. (2014). Proteostasis in endoplasmic reticulum—New mechanisms in kidney disease. *Nature Reviews Nephrology*, *10*(7), 369–378. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2014.67>
- Inagi, R., Kumagai, T., Nishi, H., Kawakami, T., Miyata, T., Fujita, T., & Nangaku, M. (2008). Preconditioning with Endoplasmic Reticulum Stress Ameliorates Mesangioproliferative Glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology*, *19*(5), 915–922. <https://doi.org/10.1681/ASN.2007070745>
- Jiang, M., Wei, Q., Wang, J., Du, Q., Yu, J., Zhang, L., & Dong, Z. (2006). Regulation of PUMA-alpha by p53 in cisplatin-induced renal cell apoptosis. *Oncogene*, *25*(29), 4056–4066. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209440>
- Kanazawa, M., Satomi, Y., Mizutani, Y., Ukimura, O., Kawauchi, A., Sakai, T., Baba, M., Okuyama, T., Nishino, H., & Miki, T. (2003). Isoliquiritigenin Inhibits the Growth of Prostate Cancer. *European Urology*, *43*(5), 580–586. [https://doi.org/10.1016/S0302-2838\(03\)00090-3](https://doi.org/10.1016/S0302-2838(03)00090-3)
- Kang, R., Zeh, H. J., Lotze, M. T., & Tang, D. (2011). The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, *18*(4), 571–580. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.191>
- Ke, B., Zhu, N., Luo, F., Xu, Y., & Fang, X. (2017). Targeted inhibition of endoplasmic reticulum stress: New hope for renal fibrosis. *Molecular Medicine Reports*, *16*(2), 1014–1020. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6762>
- Kim, J.-Y., Park, S. J., Yun, K.-J., Cho, Y.-W., Park, H.-J., & Lee, K.-T. (2008). Isoliquiritigenin isolated from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* inhibits LPS-induced iNOS and COX-2 expression via the attenuation of NF- κ B in RAW 264.7

- macrophages. *European Journal of Pharmacology*, 584(1), 175–184. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.01.032>
- Kitamura, M. (2008). Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in renal pathophysiology: Janus faces. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 295(2), F323–F334. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00050.2008>
- Klionsky, D. J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M. J., Abeliovich, H., Acevedo Arozena, A., Adachi, H., Adams, C. M., Adams, P. D., Adeli, K., Adhietty, P. J., Adler, S. G., Agam, G., Agarwal, R., Aghi, M. K., Agnello, M., Agostinis, P., Aguilar, P. V., Aguirre-Ghiso, J., ... Zughaier, S. M. (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*, 12(1), 1–222. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1100356>
- Klionsky, D. J., & Emr, S. D. (2000). Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science (New York, N.Y.)*, 290(5497), 1717–1721. <https://doi.org/10.1126/science.290.5497.1717>
- Konigsberg, M. (2008). *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas*. El Manual Moderno.
- Kröning, R., Katz, D., Lichtenstein, A. K., & Nagami, G. T. (1999). Differential effects of cisplatin in proximal and distal renal tubule epithelial cell lines. *British Journal of Cancer*, 79(2), 293–299. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6690047>
- Lawrence, R. A., & Burk, R. F. (1976). Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 71(4), 952–958. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(76\)90747-6](https://doi.org/10.1016/0006-291x(76)90747-6)
- Lee, C. K., Son, S. H., Park, K. K., Park, J. H. Y., Lim, S. S., & Chung, W. Y. (2008). Isoliquiritigenin Inhibits Tumor Growth and Protects the Kidney and Liver Against Chemotherapy-Induced Toxicity in a Mouse Xenograft Model of Colon Carcinoma. *Journal of Pharmacological Sciences*, 106(3), 444–451. <https://doi.org/10.1254/jphs.FP0071498>
- Lee, Y., Chin, Y.-W., Bae, J.-K., Seo, J., & Choi, Y. (2013). Pharmacokinetics of Isoliquiritigenin and Its Metabolites in Rats: Low Bioavailability Is Primarily Due

- to the Hepatic and Intestinal Metabolism. *Planta Medica*, 79(17), 1656–1665. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1350924>
- Lee, Y. K., Chin, Y. W., Bae, J. K., Seo, J. S., & Choi, Y. H. (2013). Pharmacokinetics of isoliquiritigenin and its metabolites in rats: Low bioavailability is primarily due to the hepatic and intestinal metabolism. *Planta Medica*. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1350924>
- Li, J., Wang, J. J., Yu, Q., Chen, K., Mahadev, K., & Zhang, S. X. (2010). Inhibition of reactive oxygen species by Lovastatin downregulates vascular endothelial growth factor expression and ameliorates blood-retinal barrier breakdown in db/db mice: Role of NADPH oxidase 4. *Diabetes*, 59(6), 1528–1538. <https://doi.org/10.2337/db09-1057>
- Liu, H., & Baliga, R. (2005). Endoplasmic reticulum stress-associated caspase 12 mediates cisplatin-induced LLC-PK1 cell apoptosis. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 16(7), 1985–1992. <https://doi.org/10.1681/ASN.2004090768>
- Liu, H., Yang, J., Li, L., Shi, W., Yuan, X., & Wu, L. (2016). The Natural Occurring Compounds Targeting Endoplasmic Reticulum Stress. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2016/7831282>
- Liu, T., Duan, W., Nizigiyimana, P., Gao, L., Liao, Z., Xu, B., Liu, L., & Lei, M. (2018). Alpha-mangostin attenuates diabetic nephropathy in association with suppression of acid sphingomyelinase and endoplasmic reticulum stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 496(2), 394–400. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.01.040>
- Lushchak, V. I. (2014). Dissection of the Hormetic Curve: Analysis of Components and Mechanisms. *Dose-Response*, 12(3), dose-response.1. <https://doi.org/10.2203/dose-response.13-051.Lushchak>
- Mahfoudh-Boussaid, A., Zaouali, M., Hadj-Ayed, K., Miled, A.-H., Saidane-Mosbahi, D., Rosello-Catafau, J., & Abdennebi, H. (2012). Ischemic preconditioning reduces endoplasmic reticulum stress and upregulates hypoxia inducible factor-1 α in

- ischemic kidney: The role of nitric oxide. *Journal of Biomedical Science*, 19(1), 7.
<https://doi.org/10.1186/1423-0127-19-7>
- Mailloux, R. J., Jin, X., & Willmore, W. G. (2014). Redox regulation of mitochondrial function with emphasis on cysteine oxidation reactions. *Redox Biology*, 2, 123–139.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.011>
- Malhotra, J. D., & Kaufman, R. J. (2007). Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress: A Vicious Cycle or a Double-Edged Sword? *Antioxidants & Redox Signaling*, 9(12), 2277–2294. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1782>
- Manohar, S., & Leung, N. (2018). Cisplatin nephrotoxicity: A review of the literature. *Journal of Nephrology*, 31(1), 15–25. <https://doi.org/10.1007/s40620-017-0392-z>
- Marullo, R., Werner, E., Degtyareva, N., Moore, B., Altavilla, G., Ramalingam, S. S., & Doetsch, P. W. (2013). Cisplatin induces a mitochondrial-ROS response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and bioenergetic functions. *PloS One*, 8(11), e81162.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081162>
- Mattson, M. P. (2008). Hormesis defined. *Ageing Research Reviews*, 7(1), 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.arr.2007.08.007>
- McKnight, N. C., & Yue, Z. (2013). Beclin 1, an Essential Component and Master Regulator of PI3K-III in Health and Disease. *Current Pathobiology Reports*, 1(4), 231–238. <https://doi.org/10.1007/s40139-013-0028-5>
- Miller, R. P., Tadagavadi, R. K., Ramesh, G., & Reeves, W. B. (2010). Mechanisms of cisplatin nephrotoxicity. *Toxins*, 2(11), 2490–2518.
<https://doi.org/10.3390/toxins2112490>
- Mollereau, B. (2013). Establishing Links between Endoplasmic Reticulum-Mediated Hormesis and Cancer. *Molecular and Cellular Biology*, 33(12), 2372–2374.
<https://doi.org/10.1128/MCB.00315-13>
- Mollereau, B., Manié, S., & Napoletano, F. (2014). Getting the better of ER stress. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 8(4), 311–321.
<https://doi.org/10.1007/s12079-014-0251-9>

- Moreno-Londoño, A. P., Bello-Alvarez, C., & Pedraza-Chaverri, J. (2017). Isoliquiritigenin pretreatment attenuates cisplatin induced proximal tubular cells (LLC-PK1) death and enhances the toxicity induced by this drug in bladder cancer T24 cell line. *Food and Chemical Toxicology*, *109*, 143–154. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.08.047>
- Nademi, S., & Dickhout, J. G. (2019). Protein misfolding in endoplasmic reticulum stress with applications to renal diseases. In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* (Vol. 118, pp. 217–247). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.08.001>
- Nakano, K., & Vousden, K. H. (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Molecular Cell*, *7*(3), 683–694. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00214-3](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00214-3)
- Nessa, M. U., Beale, P., Chan, C., Yu, J. Q., & Huq, F. (2011). Synergism from combinations of cisplatin and oxaliplatin with quercetin and thymoquinone in human ovarian tumour models. *Anticancer Research*, *31*(11), 3789–3797.
- Nur, G., Nazıroğlu, M., & Deveci, H. A. (2017). Synergic prooxidant, apoptotic and TRPV1 channel activator effects of alpha-lipoic acid and cisplatin in MCF-7 breast cancer cells. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, *37*(6), 569–577. <https://doi.org/10.1080/10799893.2017.1369121>
- Ognjanović, B. I., Djordjević, N. Z., Matić, M. M., Obradović, J. M., Mladenović, J. M., Štajn, A. Š., & Saičić, Z. S. (2012). Lipid Peroxidative Damage on Cisplatin Exposure and Alterations in Antioxidant Defense System in Rat Kidneys: A Possible Protective Effect of Selenium. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(2), 1790–1803. <https://doi.org/10.3390/ijms13021790>
- Oh, G.-S., Kim, H.-J., Shen, A., Lee, S.-B., Yang, S.-H., Shim, H., Cho, E.-Y., Kwon, K.-B., Kwak, T. H., & So, H.-S. (2016). New Therapeutic Concept of NAD Redox Balance for Cisplatin Nephrotoxicity. *BioMed Research International*, *2016*, 4048390. <https://doi.org/10.1155/2016/4048390>
- Okada, A., Fukushima, K., Fujita, M., Nakanishi, M., Hamori, M., Nishimura, A., Shibata, N., & Sugioka, N. (2017). Alterations in Cisplatin Pharmacokinetics and Its Acute/Sub-chronic Kidney Injury over Multiple Cycles of Cisplatin Treatment in

- Rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 40(11), 1948–1955.
<https://doi.org/10.1248/bpb.b17-00499>
- Orlikova, B., Tasdemir, D., Golais, F., Dicato, M., & Diederich, M. (2011). Dietary chalcones with chemopreventive and chemotherapeutic potential. *Genes & Nutrition*, 6(2), 125–147. <https://doi.org/10.1007/s12263-011-0210-5>
- Oršolić, N., & Car, N. (2014). Quercetin and hyperthermia modulate cisplatin-induced DNA damage in tumor and normal tissues in vivo. *Tumor Biology*, 35(7), 6445–6454. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-1843-y>
- Ozaki, T., Ishiguro, S., Itoh, H., Furuhashi, K., Nakazawa, M., & Yamashita, T. (2013). Cisplatin binding and inactivation of mitochondrial glutamate oxaloacetate transaminase in cisplatin-induced rat nephrotoxicity. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 77(8), 1645–1649. <https://doi.org/10.1271/bbb.130172>
- Ozgur, R., Uzilday, B., Iwata, Y., Koizumi, N., & Turkan, I. (2018). Interplay between the unfolded protein response and reactive oxygen species: A dynamic duo. *Journal of Experimental Botany*, 69(14), 3333–3345. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery040>
- Pabla, N., & Dong, Z. (2008). Cisplatin nephrotoxicity: Mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney International*, 73(9), 994–1007. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002786>
- Pascoe, J. M., & Roberts, J. J. (1974). Interactions between mammalian cell DNA and inorganic platinum compounds. I. DNA interstrand cross-linking and cytotoxic properties of platinum(II) compounds. *Biochemical Pharmacology*, 23(9), 1359–1365. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(74\)90355-4](https://doi.org/10.1016/0006-2952(74)90355-4)
- Peng, F., Du, Q., Peng, C., Wang, N., Tang, H., Xie, X., Shen, J., & Chen, J. (2015). A Review: The Pharmacology of Isoliquiritigenin: A Review: The Pharmacology of ISL. *Phytotherapy Research*, 29(7), 969–977. <https://doi.org/10.1002/ptr.5348>
- Peng, F., Xiong, L., Xie, X., Tang, H., Huang, R., & Peng, C. (2020). Isoliquiritigenin Derivative Regulates miR-374a/BAX Axis to Suppress Triple-Negative Breast Cancer Tumorigenesis and Development. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 378. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00378>

- Peres, L. A. B., & Cunha Júnior, A. D. da. (2013). Acute nephrotoxicity of cisplatin: Molecular mechanisms. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, 35(4), 332–340. <https://doi.org/10.5935/0101-2800.20130052>
- Peyrou, M., & Cribb, A. E. (2007). Effect of endoplasmic reticulum stress preconditioning on cytotoxicity of clinically relevant nephrotoxins in renal cell lines. *Toxicology in Vitro*, 21(5), 878–886. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.03.001>
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., & Bitto, A. (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
- Portilla, D., Dai, G., McClure, T., Bates, L., Kurten, R., Megyesi, J., Price, P., & Li, S. (2002). Alterations of PPARalpha and its coactivator PGC-1 in cisplatin-induced acute renal failure. *Kidney International*, 62(4), 1208–1218. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2002.kid553.x>
- Prachasilchai, W., Sonoda, H., Yokota-Ikeda, N., Oshikawa, S., Aikawa, C., Uchida, K., Ito, K., Kudo, T., Imaizumi, K., & Ikeda, M. (2008). A protective role of unfolded protein response in mouse ischemic acute kidney injury. *European Journal of Pharmacology*, 592(1–3), 138–145. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.06.108>
- Puchsaka, P., Chaotham, C., & Chanvorachote, P. (2016). α -Lipoic acid sensitizes lung cancer cells to chemotherapeutic agents and anoikis via integrin $\beta 1/\beta 3$ downregulation. *International Journal of Oncology*, 49(4), 1445–1456. <https://doi.org/10.3892/ijco.2016.3624>
- Qiao, H., Zhang, X., Wang, T., Liang, L., Chang, W., & Xia, H. (2014). Pharmacokinetics, biodistribution and bioavailability of isoliquiritigenin after intravenous and oral administration. *Pharmaceutical Biology*, 52(2), 228–236. <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.832334>

- Rahman, I., Kode, A., & Biswas, S. K. (2006). Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature Protocols*, *1*(6), 3159–3165. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.378>
- Ramalingam, M., Kim, H., Lee, Y., & Lee, Y.-I. (2018). Phytochemical and Pharmacological Role of Liquiritigenin and Isoliquiritigenin From Radix Glycyrrhizae in Human Health and Disease Models. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *10*, 348. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00348>
- Reyes-Fermín, L. M., Aparicio-Trejo, O. E., Avila-Rojas, S. H., Gómez-Sierra, T., Martínez-Klimova, E., & Pedraza-Chaverri, J. (2020). Natural antioxidants' effects on endoplasmic reticulum stress-related diseases. *Food and Chemical Toxicology*, *138*, 111229. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111229>
- Rui-zhi, T., Ke-huan, X., Yuan, L., Xiao, L., Bing-wen, Z., Tong-tong, L., & Li, W. (2022). Renoprotective effect of isoliquiritigenin on cisplatin-induced acute kidney injury through inhibition of FPR2 in macrophage. *Journal of Pharmacological Sciences*, *148*(1), 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2021.10.001>
- Sancho-Martínez, S. M., Prieto-García, L., Prieto, M., López-Novoa, J. M., & López-Hernández, F. J. (2012). Subcellular targets of cisplatin cytotoxicity: An integrated view. *Pharmacology & Therapeutics*, *136*(1), 35–55. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.07.003>
- Sano, R., & Reed, J. C. (2013). ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1833*(12), 3460–3470. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.028>
- Santos, N. a. G., Bezerra, C. S. C., Martins, N. M., Curti, C., Bianchi, M. L. P., & Santos, A. C. (2008). Hydroxyl radical scavenger ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity by preventing oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, *61*(1), 145–155. <https://doi.org/10.1007/s00280-007-0459-y>
- Schönthal, A. H. (2012). Endoplasmic Reticulum Stress: Its Role in Disease and Novel Prospects for Therapy. *Scientifica*, *2012*, 1–26. <https://doi.org/10.6064/2012/857516>

- Schönthal, A. H. (2013). Pharmacological targeting of endoplasmic reticulum stress signaling in cancer. *Biochemical Pharmacology*, 85(5), 653–666. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.09.012>
- Schwarz, D. S., & Blower, M. D. (2016). The endoplasmic reticulum: Structure, function and response to cellular signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(1), 79–94. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2052-6>
- Seth, R., Yang, C., Kaushal, V., Shah, S. V., & Kaushal, G. P. (2005). P53-dependent caspase-2 activation in mitochondrial release of apoptosis-inducing factor and its role in renal tubular epithelial cell injury. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(35), 31230–31239. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503305200>
- Sharp, C. N., Doll, M. A., Dupre, T. V., Shah, P. P., Subathra, M., Siow, D., Arteel, G. E., Megyesi, J., Beverly, L. J., & Siskind, L. J. (2016). Repeated administration of low-dose cisplatin in mice induces fibrosis. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 310(6), F560-568. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00512.2015>
- Sharp, C. N., & Siskind, L. J. (2017). Developing better mouse models to study cisplatin-induced kidney injury. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 313(4), F835–F841. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00285.2017>
- Shi, S., Tan, P., Yan, B., Gao, R., Zhao, J., Wang, J., Guo, J., Li, N., & Ma, Z. (2016). ER stress and autophagy are involved in the apoptosis induced by cisplatin in human lung cancer cells. *Oncology Reports*, 35(5), 2606–2614. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4680>
- Si, L., Yang, X., Yan, X., Wang, Y., & Zheng, Q. (2017). Isoliquiritigenin induces apoptosis of human bladder cancer T24 cells via a cyclin-dependent kinase-independent mechanism. *Oncology Letters*, 14(1), 241–249. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6159>
- Sicari, D., Delaunay-Moisan, A., Combettes, L., Chevet, E., & Igarria, A. (2020). A guide to assessing endoplasmic reticulum homeostasis and stress in mammalian systems. *The FEBS Journal*, 287(1), 27–42. <https://doi.org/10.1111/febs.15107>
- Singh, M. P., Chauhan, A. K., & Kang, S. C. (2018). Morin hydrate ameliorates cisplatin-induced ER stress, inflammation and autophagy in HEK-293 cells and mice kidney

- via PARP-1 regulation. *International Immunopharmacology*, *56*, 156–167.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.01.031>
- Slot, C. (1965). Plasma creatinine determination. A new and specific Jaffe reaction method. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, *17*(4), 381–387.
<https://doi.org/10.3109/00365516509077065>
- Small, D. M., Coombes, J. S., Bennett, N., Johnson, D. W., & Gobe, G. C. (2012). Oxidative stress, anti-oxidant therapies and chronic kidney disease: Oxidative stress and CKD. *Nephrology*, *17*(4), 311–321. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1797.2012.01572.x>
- Song, S., Tan, J., Miao, Y., Li, M., & Zhang, Q. (2017). Crosstalk of autophagy and apoptosis: Involvement of the dual role of autophagy under ER stress. *Journal of Cellular Physiology*, *232*(11), 2977–2984. <https://doi.org/10.1002/jcp.25785>
- Sun, C., Zhang, H., Ma, X. fei, Zhou, X., Gan, L., Liu, Y. yuan, & Wang, Z. hua. (2013a). Isoliquiritigenin Enhances Radiosensitivity of HepG2 Cells via Disturbance of Redox Status. *Cell Biochemistry and Biophysics*. <https://doi.org/10.1007/s12013-012-9447-x>
- Sun, C., Zhang, H., Ma, X., Zhou, X., Gan, L., Liu, Y., & Wang, Z. (2013b). Isoliquiritigenin Enhances Radiosensitivity of HepG2 Cells via Disturbance of Redox Status. *Cell Biochemistry and Biophysics*, *65*(3), 433–444.
<https://doi.org/10.1007/s12013-012-9447-x>
- Sun, Y., Kang, J., Tao, Z., Wang, X., Liu, Q., Li, D., Guan, X., Xu, H., Liu, Y., & Deng, Y. (2020). Effect of endoplasmic reticulum stress-mediated excessive autophagy on apoptosis and formation of kidney stones. *Life Sciences*, *244*, 117232.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.117232>
- Sun, Y., Oberley, L. W., & Li, Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry*, *34*(3), 497–500.
- Sureshbabu, A., Ryter, S. W., & Choi, M. E. (2015). Oxidative stress and autophagy: Crucial modulators of kidney injury. *Redox Biology*, *4*, 208–214.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.001>

- Townsend, D. M. (2003). Metabolism of Cisplatin to a Nephrotoxin in Proximal Tubule Cells. *Journal of the American Society of Nephrology*, 14(1), 1–10. <https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000042803.28024.92>
- Townsend, D. M., Deng, M., Zhang, L., Lopus, M. G., & Hanigan, M. H. (2003). Metabolism of cisplatin to a nephrotoxin in proximal tubule cells. *Journal of the American Society of Nephrology*. <https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000042803.28024.92>
- Tsang, K. Y., Chan, D., Bateman, J. F., & Cheah, K. S. E. (2010). In vivo cellular adaptation to ER stress: Survival strategies with double-edged consequences. *Journal of Cell Science*, 123(13), 2145–2154. <https://doi.org/10.1242/jcs.068833>
- Tsuruya, K., Yotsueda, H., Ikeda, H., Taniguchi, M., Masutani, K., Hayashida, H., Hirakata, H., & Iida, M. (2008). Involvement of p53-transactivated Puma in cisplatin-induced renal tubular cell death. *Life Sciences*, 83(15–16), 550–556. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2008.08.002>
- Urrea, H., Dufey, E., Lisbona, F., Rojas-Rivera, D., & Hetz, C. (2013). When ER stress reaches a dead end. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(12), 3507–3517. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.07.024>
- Ursini, F., Maiorino, M., & Forman, H. J. (2016). Redox homeostasis: The Golden Mean of healthy living. *Redox Biology*, 8, 205–215. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.01.010>
- Uzilday, B., Ozgur, R., Sekmen, A. H., & Turkan, I. (2018). Endoplasmic reticulum stress regulates glutathione metabolism and activities of glutathione related enzymes in Arabidopsis. *Functional Plant Biology*, 45(2), 284. <https://doi.org/10.1071/FP17151>
- van Angelen, A. A., Glaudemans, B., van der Kemp, A. W. C. M., Hoenderop, J. G. J., & Bindels, R. J. M. (2013). Cisplatin-induced injury of the renal distal convoluted tubule is associated with hypomagnesaemia in mice. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 28(4), 879–889. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfs499>
- Volarevic, V., Djokovic, B., Jankovic, M. G., Harrell, C. R., Fellabaum, C., Djonov, V., & Arsenijevic, N. (2019). Molecular mechanisms of cisplatin-induced nephrotoxicity:

- A balance on the knife edge between renoprotection and tumor toxicity. *Journal of Biomedical Science*, 26(1), 25. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0518-9>
- Wainford, R. D., Weaver, R. J., Stewart, K. N., Brown, P., & Hawksworth, G. M. (2008). Cisplatin nephrotoxicity is mediated by gamma glutamyltranspeptidase, not via a C-S lyase governed biotransformation pathway. *Toxicology*. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2008.05.006>
- Wang, A., Lu, Y., Shi, P., & Zhang, H. (n.d.). *Hydroxyl and hydroperoxyl radicals scavenging by isoliquiritigenin and liquiritigenin: A quantum chemical study*. <https://doi.org/10.1007/s11224-017-0924-0>
- Wang, A., Lu, Y., Shi, P., & Zhang, H. (2017). Hydroxyl and hydroperoxyl radicals scavenging by isoliquiritigenin and liquiritigenin: A quantum chemical study. *Structural Chemistry*, 28(4), 1181–1186. <https://doi.org/10.1007/s11224-017-0924-0>
- Wang, K.-L., Yu, Y.-C., & Hsia, S.-M. (2021). Perspectives on the Role of Isoliquiritigenin in Cancer. *Cancers*, 13(1), E115. <https://doi.org/10.3390/cancers13010115>
- Wang, Z.-F., Liu, J., Yang, Y.-A., & Zhu, H.-L. (2020). A Review: The Anti-inflammatory, Anticancer and Antibacterial Properties of Four Kinds of Licorice Flavonoids Isolated from Licorice. *Current Medicinal Chemistry*, 27(12), 1997–2011. <https://doi.org/10.2174/0929867325666181001104550>
- Wortel, I. M. N., van der Meer, L. T., Kilberg, M. S., & van Leeuwen, F. N. (2017). Surviving Stress: Modulation of ATF4-Mediated Stress Responses in Normal and Malignant Cells. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 28(11), 794–806. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.07.003>
- Xiong, Y., Uys, J. D., Tew, K. D., & Townsend, D. M. (2011). S-Glutathionylation: From Molecular Mechanisms to Health Outcomes. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(1), 233–270. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3540>
- Xu, Y., Guo, M., Jiang, W., Dong, H., Han, Y., An, X.-F., & Zhang, J. (2016). Endoplasmic reticulum stress and its effects on renal tubular cells apoptosis in ischemic acute kidney injury. *Renal Failure*, 38(5), 831–837. <https://doi.org/10.3109/0886022X.2016.1160724>

- Yan, M., Shu, S., Guo, C., Tang, C., & Dong, Z. (2018). Endoplasmic reticulum stress in ischemic and nephrotoxic acute kidney injury. *Annals of Medicine*, *50*(5), 381–390. <https://doi.org/10.1080/07853890.2018.1489142>
- Yao, X., Panichpisal, K., Kurtzman, N., & Nugent, K. (2007). Cisplatin nephrotoxicity: A review. *The American Journal of the Medical Sciences*, *334*(2), 115–124. <https://doi.org/10.1097/MAJ.0b013e31812dfe1e>
- Yu, C.-C., Chien, C.-T., & Chang, T.-C. (2016). M2 macrophage polarization modulates epithelial-mesenchymal transition in cisplatin-induced tubulointerstitial fibrosis. *BioMedicine*, *6*(1), 5. <https://doi.org/10.7603/s40681-016-0005-5>
- Zaazaa, A. M., Motelp, B. A. A. E., & Aniss, N. N.-D. (2019). Potential Protective Role of Rutin and Alpha-lipoic Acid Against Cisplatin-induced Nephrotoxicity in Rats. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, *22*(8), 361–371. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2019.361.371>
- Zeeshan, H., Lee, G., Kim, H.-R., & Chae, H.-J. (2016). Endoplasmic Reticulum Stress and Associated ROS. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(3), 327. <https://doi.org/10.3390/ijms17030327>
- Zhao, H., Yuan, X., Li, D., Chen, H., Jiang, J., Wang, Z., Sun, X., & Zheng, Q. (2013). Isoliquiritigen Enhances the Antitumour Activity and Decreases the Genotoxic Effect of Cyclophosphamide. *Molecules*, *18*(8), 8786–8798. <https://doi.org/10.3390/molecules18088786>
- Zhou, G.-S., Song, L.-J., & Yang, B. (2013). Isoliquiritigenin inhibits proliferation and induces apoptosis of U87 human glioma cells in vitro. *Molecular Medicine Reports*, *7*(2), 531–536. <https://doi.org/10.3892/mmr.2012.1218>
- Zhu, S., Pabla, N., Tang, C., He, L., & Dong, Z. (2015). DNA damage response in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Archives of Toxicology*, *89*(12), 2197–2205. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1633-3>
- Zhu, Y., Hu, S., Ru, X., Zheng, Z., Fan, Z., Qiu, L., & Zhang, Y. (2019). A unity of opposites in between Nrf1- and Nrf2-mediated responses to the endoplasmic reticulum stressor tunicamycin [Preprint]. *Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1101/655159>

- Zimmermann, A., Bauer, M., Kroemer, G., Madeo, F., Carmona-Gutierrez, D. (2014). When less is more: Hormesis against stress and disease. *Microbial Cell*, 1(5), 150–153. <https://doi.org/10.15698/mic2014.05.148>
- Zsengellér, Z. K., Ellezian, L., Brown, D., Horváth, B., Mukhopadhyay, P., Kalyanaraman, B., Parikh, S. M., Karumanchi, S. A., Stillman, I. E., & Pacher, P. (2012). Cisplatin nephrotoxicity involves mitochondrial injury with impaired tubular mitochondrial enzyme activity. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 60(7), 521–529. <https://doi.org/10.1369/0022155412446227>

ANEXO 1

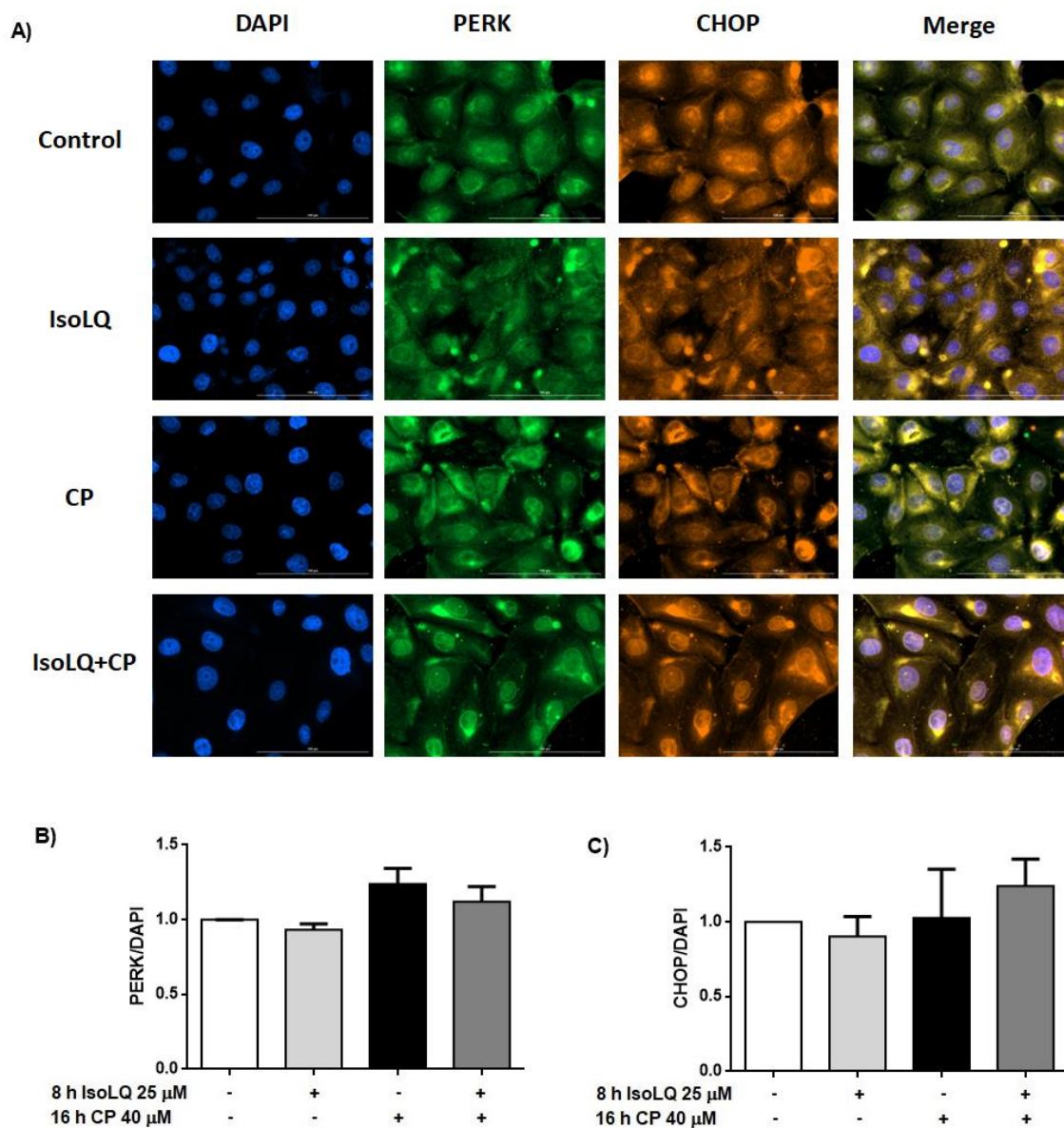


Figura 20. Expresión de proteínas de la vía de PERK. A) Imágenes de las inmunocitoquímicas Objetivo 40 x. B) Cuantificación de PERK. C) Cuantificación de CHOP. n=3 experimentos independientes. Datos promedio \pm EEM. * $p < 0.05$ vs control. **Abreviaturas:** CHOP: proteína homóloga potenciadora de la unión a CCAAT; PERK: proteína cinasa del RE activada por RNA de doble cadena.

ANEXO 2

Los animales se dividieron en 5 grupos experimentales, el esquema de administración se describe a continuación:

- Grupo Control: administración de una mezcla de solución salina isotónica 0.9% y etanol (vehículo, i.p) durante 6 días.
- Grupo CP: dosis única del CP (7.5 mg/kg, i.p en solución salina isotónica al 0.9%) en el día 4 del estudio y administración de vehículo durante los demás días del estudio.
- Grupo IsoLQ+CP: durante los 6 días del estudio se les administró la IsoLQ. En el día 4, se les administró el CP (7.5 mg/kg, i.p en solución salina isotónica al 0.9%) una hora después de la administración de la IsoLQ. Las dosis de IsoLQ ensayadas fueron: 1.25, 2.5 y 5 mg/kg, i.p.

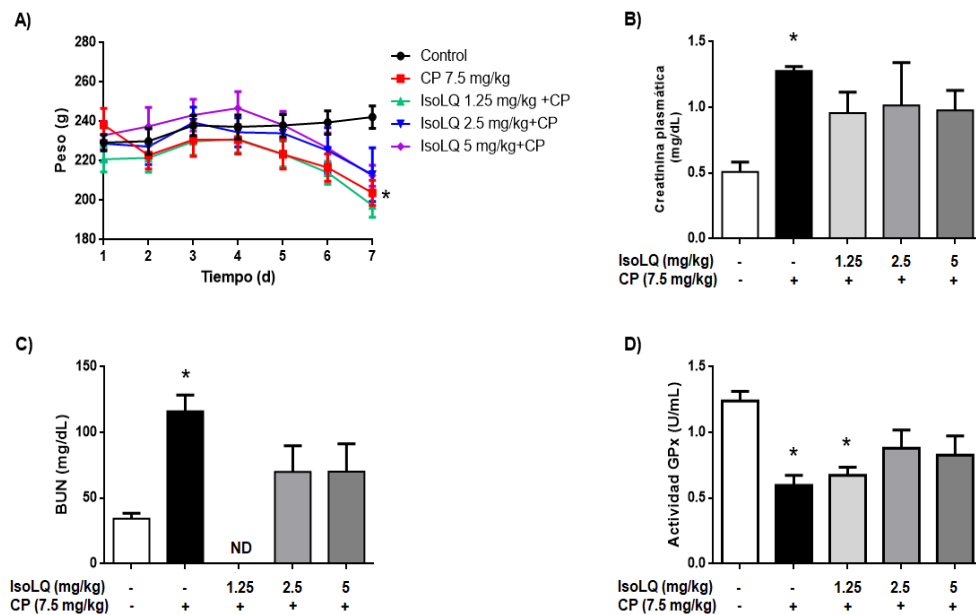


Figura 21. Efecto del co-tratamiento con la isoliquiritigenina (IsoLQ) en el peso corporal y marcadores de daño renal en la toxicidad inducida por el cisplatino (CP). A) Peso corporal. B) Creatinina plasmática. C) Nitrógeno de urea en sangre (BUN). D) Glutación peroxidasa (GPx) en plasma. n=4-8 ratas por grupo. Datos promedio \pm EEM. * $p < 0.05$ vs control, # $p < 0.05$ vs CP. ND, no determinado **Abreviaturas:** Cisplatino: CP; Isoliquiritigenina: IsoLQ.

Article

Isoliquiritigenin Pretreatment Induces Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Hormesis and Attenuates Cisplatin-Induced Oxidative Stress and Damage in LLC-PK1 Cells

Tania Gómez-Sierra, Omar Noel Medina-Campos, José D. Solano, María Elena Ibarra-Rubio and José Pedraza-Chaverri * 

Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX 04510, Mexico; taniags@comunidad.unam.mx (T.G.-S.); mconoel@comunidad.unam.mx (O.N.M.-C.); jdsolanobecerra@comunidad.unam.mx (J.D.S.); meir@unam.mx (M.E.I.-R.)

* Correspondence: pedraza@unam.mx; Tel.: +52-555622-3878

Academic Editors: Paola Di Donato and Brigida Silvestri

Received: 25 August 2020; Accepted: 26 September 2020; Published: 27 September 2020



Abstract: Isoliquiritigenin (IsoLQ) is a flavonoid with antioxidant properties and inducer of endoplasmic reticulum (ER) stress. In vitro and in vivo studies show that ER stress-mediated hormesis is cytoprotective; therefore, natural antioxidants and ER stress inducers have been used to prevent renal injury. Oxidative stress and ER stress are some of the mechanisms of damage involved in cisplatin (CP)-induced nephrotoxicity. This study aims to explore whether IsoLQ pretreatment induces ER stress and produces hormesis to protect against CP-induced nephrotoxicity in Lilly Laboratories Cell-Porcine Kidney 1 (LLC-PK1) cells. During the first stage of this study, both IsoLQ protective concentration and pretreatment time against CP-induced toxicity were determined by cell viability. At the second stage, the effect of IsoLQ pretreatment on cell viability, ER stress, and oxidative stress were evaluated. IsoLQ pretreatment in CP-treated cells induces expression of glucose-related proteins 78 and 94 kDa (GRP78 and GRP94, respectively), attenuates CP-induced cell death, decreases reactive oxygen species (ROS) production, and prevents the decrease in glutathione/glutathione disulfide (GSH/GSSG) ratio, free thiols levels, and glutathione reductase (GR) activity. These data suggest that IsoLQ pretreatment has a moderately protective effect on CP-induced toxicity in LLC-PK1 cells, through ER stress-mediated hormesis, as well as by the antioxidant properties of IsoLQ.

Keywords: isoliquiritigenin; cisplatin; nephrotoxicity; oxidative stress; ER stress; hormesis

1. Introduction

The flavonoid 4,2',4'-trihydroxichalcone, also known as isoliquiritigenin (IsoLQ) (Figure 1), proceeds from the roots and rhizomes of licorice (*Glycyrrhiza glabra*). It is used in Asia as an herbal medicine due to its anti-inflammatory, antimicrobial, antitumoral, and antioxidant properties [1–8]. Regarding its antioxidant activity, it has been reported that IsoLQ scavenges reactive oxygen species (ROS), such as the superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$), hydroxyl radical, hydrogen peroxide, and singlet oxygen [4,7], and induces phase II cytoprotective enzymes' expression [9,10]. In addition, IsoLQ has been used as an endoplasmic reticulum (ER) stress inducer in cancer cell lines to induce apoptosis [8,10–16] and also has cytoprotective effects in non-cancer cells, such as liver and kidney cells [1,4,9,16–18].

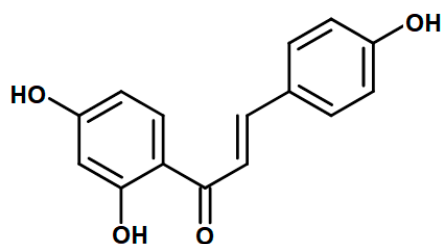


Figure 1. Chemical structure of isoliquiritigenin (IsoLQ).

On the other hand, cisplatin or cis-diaminodichloroplatin II (CP), is an antineoplastic drug approved by the United States Federal Drug Administration since 1978 used for the treatment of many cancers, such as head, neck, bladder, lung, stomach, uterus, and testicular. However, its application has been limited because 25–35% of treated patients develop kidney damage [19–23]. The mechanism of CP nephrotoxicity has been studied for the last forty years and binding to multiple targets such as deoxyribonucleic acid or glutathione (GSH) have been identified. Also, mechanisms such as oxidative stress, inflammation, mitochondrial dysfunction, and ER stress have been associated to kidney damage [19–22,24], and although the contribution of each pathway is not exactly known, oxidative stress plays a key role [19,24–26].

Under acute ER stress, glucose-related protein 78 kDa (GRP78) and glucose-related protein 94 kDa (GRP94) are released from the ER membrane and activate the unfolded protein response (UPR) to restore ER functions, such as protein synthesis and transport, protein folding, lipid and steroid synthesis, among others [27–31], in addition to the antioxidant response and autophagy [27,32–34], which maintain cellular homeostasis. However, if the ER stress is excessive or chronic and cannot be corrected, UPR signaling promotes apoptosis [29,31,35–39]. These different effects of UPR on cellular function have generated interest because of their similarity to those occurring in hormesis, a process usually referred to as a biological favorable response originated by low dose/concentration or short exposure to chemical/natural compounds or environmental factors [40–44]. However, a high dose/concentration or long exposure inhibits this favorable response [40,41,45–49]. It has been suggested that this biphasic dose-response could protect against more than one type of stress, and play a key role in the treatment of different pathologies [36,40,41,50–53].

Based on the knowledge of the main pathways involved in CP-induced nephrotoxicity, such as oxidative stress [19,21,22,25,54], apoptosis [20–22,25], mitochondrial dysfunction [20–22,25], kinases activation [21,22,54], and ER stress [21,24,55], treatments with natural compounds have been implemented to prevent CP-induced nephrotoxicity [20,21,24,25,56–58]. However, it is necessary to explore more compounds and other targets less studied, such as ER stress, due to the complexity of cisplatin toxicity. Therefore, the aim of this study was to explore whether IsoLQ-induced ER stress produces a hormetic effect that protects against CP-induced nephrotoxicity in Lilly Laboratories Cell-Porcine Kidney 1 (LLC-PK1) cells.

2. Results

2.1. First Stage

2.1.1. Estimation of Hormetic Zone of IsoLQ in CP-Induced Toxicity in LLC-PK1 Cells

LLC-PK1 cells were treated with CP (10–80 μM) for 24 h. Figure 2 shows that 10 μM CP was not cytotoxic, whereas concentrations higher than 20 μM induced cytotoxicity ($p < 0.05$) and the half-maximal (50%) inhibitory concentration (IC_{50}) calculated was $29.4 \pm 3.8 \mu\text{M}$. Figure 3 presents the typical inverted J-shaped hormetic relationship, where IsoLQ concentrations between 5 and 30 μM attenuated CP-induced cell death ($p < 0.05$), whereas IsoLQ concentrations higher than 35 μM increased CP-induced cell death ($p < 0.05$).

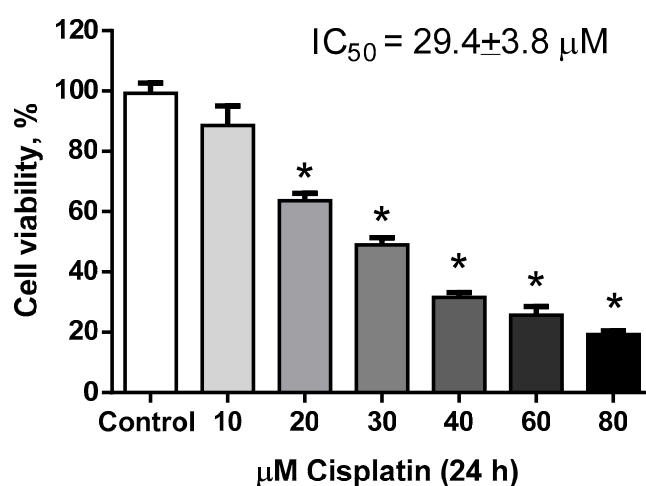


Figure 2. Cisplatin half-maximal (50%) inhibitory concentration (IC_{50}) in 24 h treated Lilly Laboratories Cell-Porcine Kidney 1 (LLC-PK1) cells. Data are mean \pm standard error of the mean (SEM), $n = 3$. * $p < 0.05$ vs. control (without cisplatin).

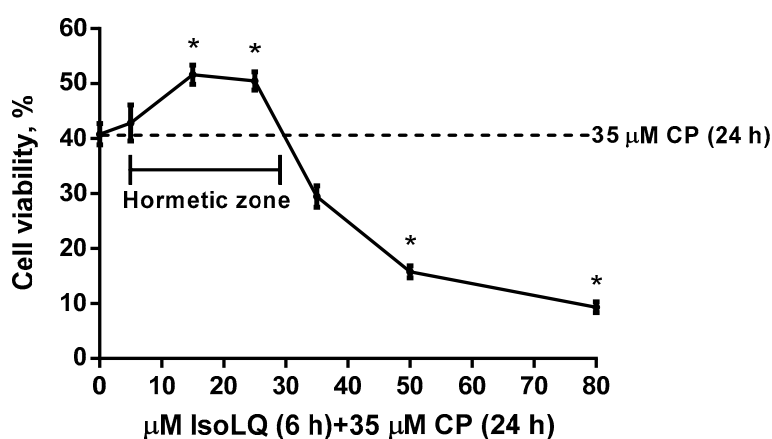


Figure 3. Hormetic dose-response curve of isoliquiritigenin (IsoLQ) in cisplatin (CP)-induced LLC-PK1 cell death. Data are mean \pm SEM, $n = 3$. * $p < 0.05$ vs. CP 24 h.

2.1.2. Determination of IsoLQ Protective Concentration and Pretreatment Time against CP-Induced Toxicity in LLC-PK1 Cells

According to the data shown in Figure 2, 40 μ M CP caused ~66% of cell death ($p < 0.05$), while Figure 3 shows that 15 and 25 μ M IsoLQ attenuated CP-induced decrease on cell viability ($p < 0.05$). Therefore, these two concentrations were used to determine the IsoLQ pretreatment time that could have a protective effect against CP-induced toxicity in LLC-PK1 cells. Cell viability results indicate that 6 and 8 h pretreatment with 15 and 25 μ M IsoLQ promoted cytoprotective effects against 40 μ M CP ($p < 0.05$) (Figure 4).

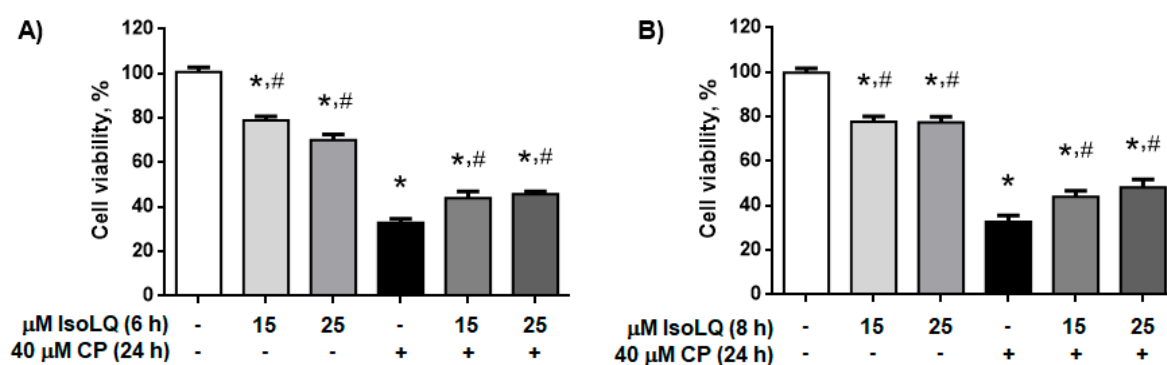


Figure 4. Isoliquiritigenin (IsoLQ) pretreatment attenuated cell viability decrease in cisplatin (CP)-induced toxicity. (A) 6 h IsoLQ pretreatment, (B) 8 h IsoLQ pretreatment. Data are mean \pm SEM, $n = 3$. * $p < 0.05$ vs. control (without IsoLQ and CP), # $p < 0.05$ vs. CP.

2.1.3. Pretreatment of IsoLQ Induces ER Stress

According to the data shown in Figure 4, 15 and 25 μM IsoLQ pretreatment attenuated CP-induced cell death ($p < 0.05$), so cells were treated with the highest concentration of IsoLQ (25 μM) to evaluate ER stress. Figure 5 shows that GRP94 and GRP78 increased at 4 and 6 h ($p < 0.05$) respectively, after pretreatment with 25 μM IsoLQ, and remained increased at 24 h.

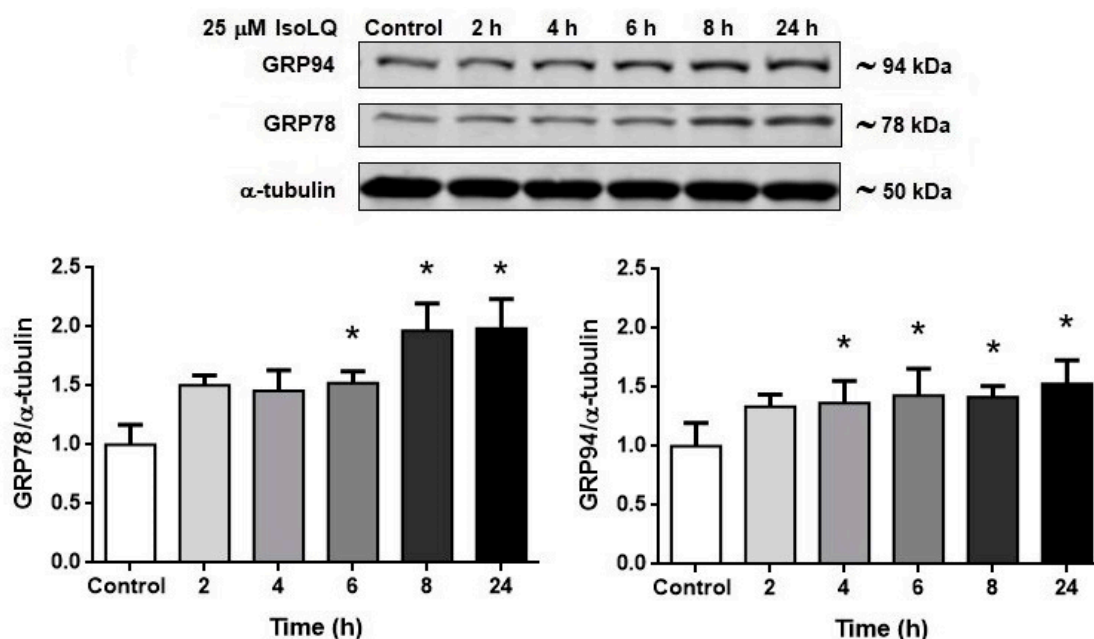


Figure 5. 25 μM isoliquiritigenin (IsoLQ) induced endoplasmic reticulum (ER) stress in LLC-PK1 cells. Glucose-related protein 78 kDa (GRP78), glucose-related protein 94 kDa (GRP94). Data are mean \pm SEM, $n = 3$ –4. * $p < 0.05$ vs. control (without IsoLQ).

2.2. Second Stage

2.2.1. IsoLQ Pretreatment Enhanced ER Stress in CP-Induced Nephrotoxicity in LLC-PK1 Cells

Based on cell viability results as well as protein levels of GRP78 and GRP94 obtained from first-stage experiments, the experimental protocol was designed as follows: cells were pretreated with 25 μM IsoLQ for 8 h (the highest effects on cell viability and GRP78 and GRP94 expression were observed in these conditions) and subsequently with 40 μM CP (the highest CP concentration evaluated) for a time-course study. After pretreatment of LLC-PK1 cells with 25 μM IsoLQ for 8 h and exposure to 40 μM

CP for 16 and 24 h, GRP78 and GRP94 expression increased ($p < 0.05$) (Figure 6A). This increase was higher than that under IsoLQ treatment or with CP alone (Figures 5 and 6B, respectively). In addition, the expression of the eukaryotic initiation factor 2 α (p -eIF2 α) did not change (data not shown).

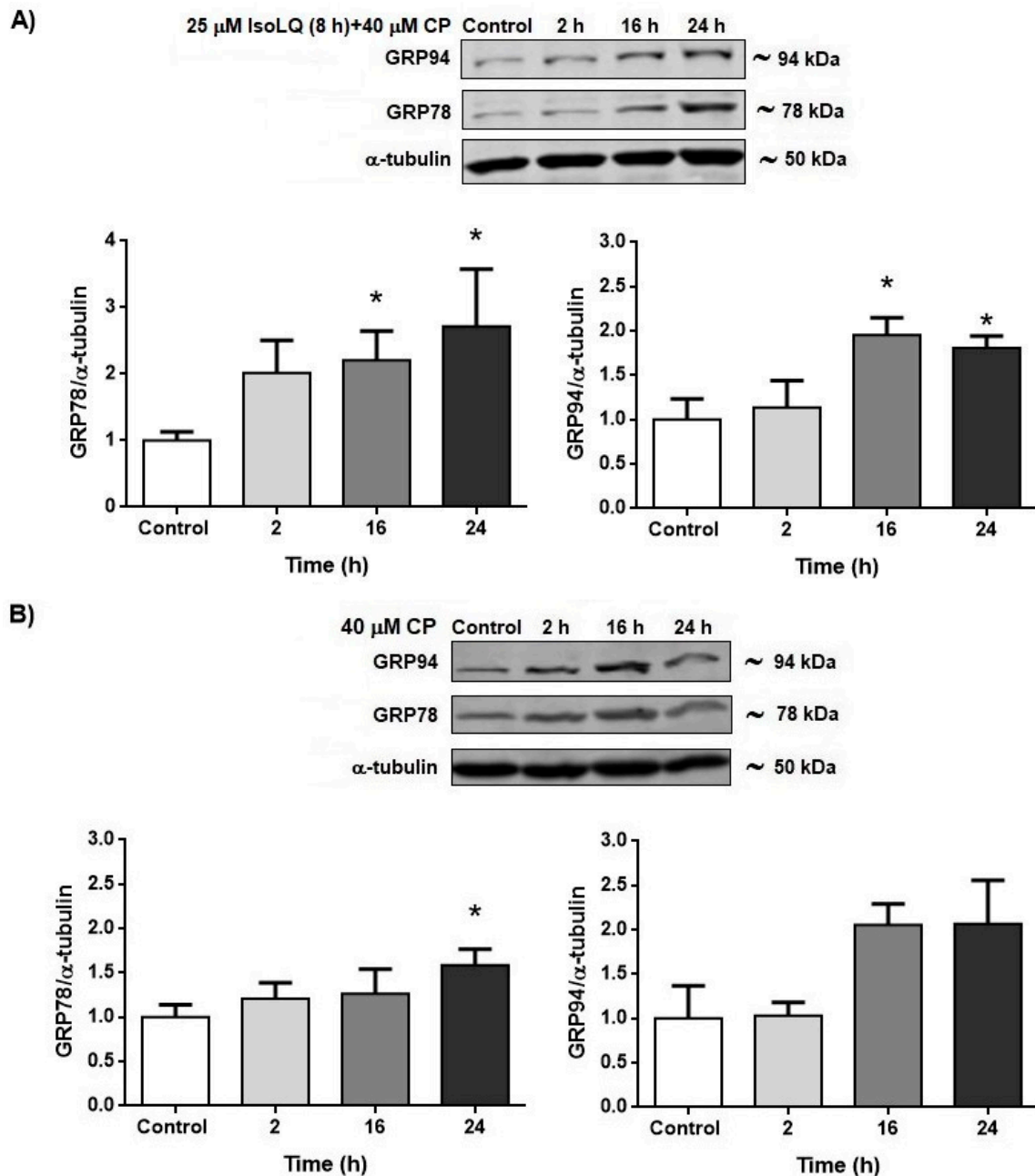


Figure 6. Endoplasmic reticulum (ER) stress in LLC-PK1 cells. (A) 25 μ M isoliquiritigenin (IsoLQ, 8 h) pretreatment + 40 μ M cisplatin (CP) treatment. (B) 40 μ M CP treatment. Glucose-related protein 78 kDa (GRP78), glucose-related protein 94 kDa (GRP94). Data are mean \pm SEM, $n = 3$. * $p < 0.05$ vs. control (without IsoLQ and CP).

2.2.2. IsoLQ-Induced Hormesis Attenuates Oxidative Stress in CP-Treated LLC-PK1 Cells

LLC-PK1 cells were pretreated with 25 μ M IsoLQ for 8 h and then with 40 μ M CP for 16 and 24 h, as described for the second stage of the experimental design. 25 μ M IsoLQ pretreatment decreased ROS production by $\sim 37\%$ and $\sim 26\%$ after exposure to 40 μ M CP for 16 and 24 h ($p < 0.05$) respectively,

and attenuated the decrease in GSH/glutathione disulfide (GSSG) ratio, free thiols, and glutathione reductase (GR) activity 24 h after CP treatment ($p < 0.05$) (Table 1).

Table 1. Effect of isoliquiritigenin (IsoLQ)-induced hormesis on oxidative stress in LLC-PK1 cells after 16 and 24 h of cisplatin (CP) treatment.

Groups	Control	25 μ M IsoLQ (8 h)	40 μ M CP		25 μ M IsoLQ (8 h) + 40 μ M CP	
Time CP Treatment	0 h	0 h	16 h	24 h	16 h	24 h
ROS production, %	100 \pm 4.5	100.1 \pm 6.7 ^{**,#}	236.5 \pm 36.2 [*]	206.8 \pm 24.5 [*]	147.9 \pm 18.2 ^{*,**}	152.3 \pm 24.5 [*]
GSH/GSSG	5.92 \pm 0.35	ND	1.67 \pm 0.19 [*]	1.49 \pm 0.16 [*]	2.14 \pm 0.13 [*]	3.22 \pm 0.44 ^{*,#}
Free thiols (nmol/mg protein)	143.9 \pm 2.9	138.1 \pm 13.6 [#]	115.1 \pm 3.6	85.1 \pm 4.6 [*]	148.9 \pm 27.1	204.9 \pm 28.7 [#]
GR activity (U/mg protein)	0.015 \pm 0.001	0.014 \pm 0.001 [#]	0.010 \pm 0.001 [*]	0.006 \pm 0.001 [*]	0.011 \pm 0.001 [*]	0.014 \pm 0.001 [#]

ROS, reactive oxygen species; GSH/GSSG, glutathione/glutathione disulfide ratio; GR, glutathione reductase. Data are mean \pm SEM, $n = 3$. ^{*} $p < 0.05$ vs. control (without IsoLQ and CP), ^{**} $p < 0.05$ vs. CP 16 h, [#] $p < 0.05$ vs. CP 24 h. ND, not determined.

Nitric Oxide Synthase (NOS) is the Source of ROS Production in LLC-PK1 Cells Pretreated with IsoLQ and Exposed to CP

In order to determine intracellular ROS sources, we used diphenyleneiodonium chloride (DPI), an inhibitor of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen (NADPH) oxidase (NOX), or N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), an inhibitor of NOS. DPI did not decrease ROS production in any of the groups of treated cells, whereas L-NAME decreased ROS production at 16 h in IsoLQ + CP-treated cells to similar levels as the control group ($p < 0.05$). This effect remained until 24 h ($p < 0.05$) (Figure 7); whereas in CP-treated cells, ROS production decreased only at 16 h ($p < 0.05$).

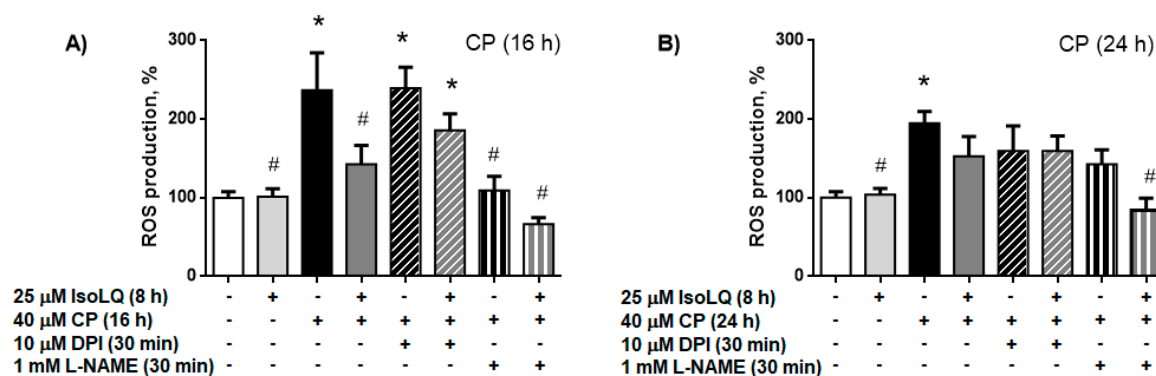


Figure 7. Nitric oxide synthase (NOS), but not nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen (NADPH) oxidase (NOX), is the source of reactive oxygen species (ROS) production in LLC-PK1 cells pretreated with 25 μ M isoliquiritigenin (IsoLQ, 8 h) and subsequently with 40 μ M cisplatin (CP). Diphenyleneiodonium chloride (DPI), N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME). (A) 16 h CP treatment. (B) 24 h CP treatment. Data are mean \pm SEM, $n = 3$. ^{*} $p < 0.05$ vs. control (without IsoLQ and CP), [#] $p < 0.05$ vs. CP.

3. Discussion

IsoLQ is a flavonoid with anti-inflammatory, antitumoral, and antioxidant properties [1–7,16,59] that exerts protective effects in liver and kidney cells [3,4,9,16–18]. In addition, it has been demonstrated that IsoLQ does not interfere with CP antineoplastic activity [16]. The effect of IsoLQ on cell viability in CP-induced nephrotoxicity was a biphasic dose-response: low IsoLQ concentrations attenuated the decrease on cell viability, but high IsoLQ concentrations inhibited it. This effect is known as hormesis, a term that refers to a biological favorable cellular response [40,47–50,60]. The IsoLQ + CP dose-response curve showed an inverted J-shaped hormetic effect and this biphasic curve has an interval called the hormetic zone where the beneficial effects are evident (Figure 3) [45,47–49]. The low-dose stimulation reflects the capacity of the cells to distribute biological resources that help to defend the

organism from a wide range of stressor agents, such as CP, and this adaptive mechanism includes stress protein responses that reduce the damage more effectively than the response induced only by exposure to the stressor [40,41,46,47]. Therefore, hormesis is more than simply a dose-response relationship, it is a quantitative and temporal manifestation of reparative processes that is adaptive in nature, such as UPR elicited by ER stress [42,43,46,47,50,60,61].

Data obtained show that 25 μ M IsoLQ pretreatment induced ER stress and also attenuated 40 μ M CP-induced cell death in LLC-PK1 cells. The increase in the expression of the chaperones GRP78 and GRP94 indicates the occurrence of ER stress and suggests the activation of UPR [27,29,37,62–65]. The early induction of ER stress could play a key role in cell survival, because ER stress induced by IsoLQ pretreatment generated a hormetic effect to activate adaptive responses such as UPR, that protects against higher stress levels as occurs in CP-induced nephrotoxicity. In *in vitro* and *in vivo* models of kidney diseases, like renal ischemia-reperfusion or exposure to cytotoxic compounds, the *a priori* induction of ER stress with pharmacological or natural compounds generates tolerance against these insults (hypoxia, oxidative stress) in order to inhibit the apoptotic cell death [37,52,53,62,66–69].

On the other hand, oxidative stress is also characteristic in CP-induced nephrotoxicity and is an important factor in the development and progression of other associated damage mechanisms, such as mitochondrial dysfunction, inflammation, and ER stress [19–22,25,26,54,70]. ROS are generated naturally and regulate cell functions [71,72]. However, excessive quantities of ROS can result in damage to proteins, modifying their function and disrupting ER homeostasis [27,32,34,73]. ROS overproduction can be sensed by the ER, which is highly sensitive to changes in ROS levels through redox sensors, such as, for example, the thiol groups of cysteines [33,70,74–77], causing misfolded protein accumulation and consequently increasing ROS production, which leads to a vicious cycle able to activate UPR, generate chronic stress, and induce apoptosis [32–34,70,72]. Moreover, ROS overproduction causes a decrease in the GSH/GSSG ratio and in antioxidant enzyme levels, whilst oxidizing lipids, DNA, and proteins [19–22,25,26]. In our experimental model, ROS production could be associated to NOS activity and consequently to overproduction of $O_2^{\bullet-}$ that enhances oxidative stress. However, IsoLQ can attenuate this oxidative imbalance due to its ROS scavenging capacity [4,7]. In CP-induced nephrotoxicity, the decrease in the GSH/GSSG ratio is characteristic due to the formation of GSH-CP adducts. The positively charged species of CP (their active forms) have a great affinity for thiol groups [20,22,25,78,79] and consequently, there is an alteration in the activity of enzymes related to GSH metabolism [19,26,78]. In addition, the decrease in GSH could be associated with the formation of disulfide bonds among misfolded proteins in a coupled reaction with the protein disulfide isomerase and ER oxidoreductase 1 [73,80–83].

Interestingly, ER stress induction is also associated with an increase in GSH biosynthesis in order to form disulfide bonds between proteins and recycle unfolded proteins. This effect could explain the increase in free thiols, such as GSH, in cells pretreated with IsoLQ [33,82]. Moreover, it has been described that ER stress increases the activity of antioxidant enzymes such as GR, glutathione peroxidase, and glutathione S-transferase [33,63,82]. Probably, augmented GR activity in cells pretreated with IsoLQ was due to this effect, since IsoLQ is also a bifunctional antioxidant able to induce expression of phase II detoxifying enzymes through nuclear factor erythroid 2 (Nrf2) transcriptional regulation [9,10]. Under ER stress, protein kinase ribonucleic acid (RNA)-activated-like ER kinase (PERK), one of the signaling pathways of UPR, directly phosphorylates Nrf2, causing Nrf2 to dissociate from its negative regulator (Kelch-like erythroid-derived cap-n-collar homology-(ECH)-associated protein 1); after which, Nrf2 translocates to the nucleus, leading the transcription of genes that encode phase II detoxifying enzymes that maintain redox homeostasis and may contribute to cell survival [84–86]. In addition, eIF2 α is another target of the PERK signaling pathway [27,29,63,65]. Even though the data on p-eIF2 α expression are inconclusive (data not shown), it is possible that the PERK pathway has become activated. Nevertheless, studies on the role of UPR proteins are required to describe and understand the mechanisms involved in the hormetic effect produced by IsoLQ in this experimental model. In summary, Figure 8 shows a possible mechanism of the protective effect of IsoLQ against

CP-induced nephrotoxicity in LLC-PK1 cells. We derived our assumptions from the main observations found in this study.

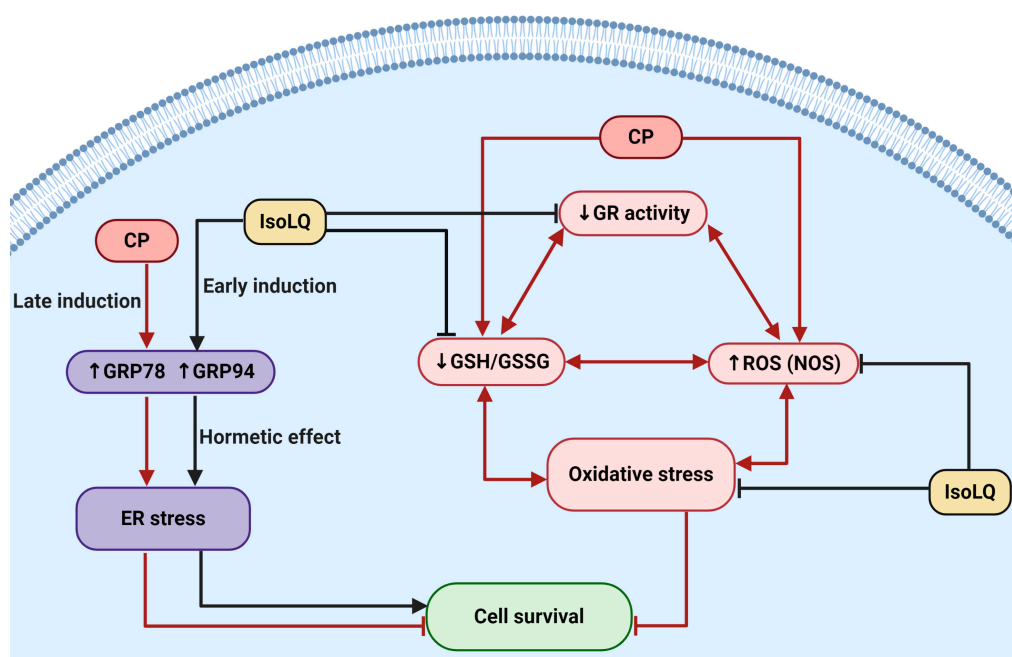


Figure 8. Mechanisms involved in the protective effect of isoliquiritigenin (IsoLQ) against cisplatin (CP)-induced damage in LLC-PK1 cells. Pretreatment with IsoLQ increased the expression of glucose-regulated protein 78 (GRP78) and glucose-regulated protein 94 (GRP94), markers of endoplasmic reticulum (ER)-stress. The generated hormetic effect induces a decrease in reactive oxygen species (ROS) production, associated to nitric oxide synthase (NOS) activity, as well as the attenuation in the reduction of glutathione/glutathione disulfide (GSH/GSSG) ratio and glutathione reductase (GR) activity. These combined effects, in addition to the antioxidant properties of IsoLQ, attenuated oxidative stress. Figure was created with [Biorender.com](https://www.biorender.com).

4. Materials and Methods

4.1. Reagents

LLC-PK1 cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). IsoLQ was purchased from AK Scientific (Union City, NJ, USA). Bovine serum albumin, CP, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, dimethyl sulfoxide, DPI, 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), fluorescein diacetate (FDA), glycerophosphate, GSH, GSSG, GR, L-NAME, NADPH, 4-nonylphenyl-polyethylene glycol (NP-40), protease inhibitor cocktail, sodium deoxycholate, sodium dodecyl sulfate (SDS), sodium fluoride (NaF), sodium pyrophosphate ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$), sodium orthovanadate (Na_3VO_4), sulfosalicylic acid, triethanolamine, Tris-hydrochloride (Tris-HCl), trypan blue, triton X-100, tween 20, 2-vinylpyridine, mouse anti- α -tubulin (cat. T9026) antibodies, and rabbit anti-GRP94 (cat. G4420) antibodies were from Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). Dipotassium hydrogen orthophosphate, ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA), potassium chloride, potassium dihydrogen orthophosphate, sodium chloride (NaCl), sodium bicarbonate (NaHCO_3), and sodium phosphate dibasic were from J.T. Baker (Xalostoc, Edo. Mex, Mex). Bradford reagent was from Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), and penicillin/streptomycin were from Biowest (Riverside, MO, USA). TrypLE Express was from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Dichlorodihydrofluorescein diacetate (H_2DCFDA) was from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Mouse anti-GRP78 (cat. SC-3768) antibodies were from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Dallas, TX, USA). Fluorescent secondary antibodies anti-rabbit 800CW

and anti-mouse 680RD were from LI-COR Biosciences (Lincoln, NE, USA). All the other chemicals and reagents used were of analytical grade and commercially available.

4.2. Cell Culture

LLC-PK1 cells are a proximal tubule cell line derived from porcine kidneys, widely used in experimental models [9,25,53,87]. LLC-PK1 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS, 0.33% NaHCO₃, 100 U/mL penicillin, and 50 U/mL streptomycin under a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C. The cells were sub-cultured with TrypLE Express upon reaching 90% confluence. LLC-PK1 cells passage numbers 8 to 33 were used.

4.3. Experimental Design

4.3.1. First Stage

The aim of the first stage set of experiments was to determine the potential IsoLQ protective concentration and pretreatment time against CP-induced toxicity in LLC-PK1 cell culture. Cells were treated with CP (10–80 µM) for 24 h to calculate the IC₅₀. Additionally, cells were pretreated with IsoLQ (5–80 µM) for 6 h and later incubated with one concentration higher than the IC₅₀ of CP (35 µM) for 24 h to evaluate the potentially hormetic dose-response curve for cell viability. Finally, two IsoLQ concentrations within the hormetic zone (15 and 25 µM) and one concentration higher than the IC₅₀ of CP (40 µM) were selected to test the putative protective effect by IsoLQ on cell viability.

On the other hand, cells were pretreated with 25 µM IsoLQ (highest concentration within the hormetic zone) in a time-course study (2–24 h) to evaluate the expression of GRP78 and GRP94.

4.3.2. Second Stage

Based on the first stage results, LLC-PK1 cells were pretreated with 25 µM IsoLQ for 8 h and subsequently incubated, in a time-course study, with 40 µM CP to evaluate ER stress (2, 16, and 24 h) and oxidative stress (16 and 24 h). The experimental design is summarized in Figure 9.

4.4. Cell Viability

Subsequently after treatments, DMEM was removed and cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) followed by the addition of 12 µM FDA and incubation for 5 min at 37 °C in darkness [88]. Fluorescence was determined by a microplate reader at excitation and emission wavelengths of 485 and 520 nm, respectively. The results are expressed as the percentage of the control (without treatments).

4.5. Extraction of Total Fractions of Proteins for Western Blot

LLC-PK1 cells were lysed with radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% sodium deoxycholate, 1% NP-40, 0.1% SDS, 25 mM NaF, 1 mM Na₄P₂O₇, 1 mM Na₃VO₄, 0.5 mM glycerophosphate, and protease inhibitor cocktail) for one hour at 4 °C. Lysates were centrifuged at 12,000× g during 10 min at 4 °C and the supernatant was collected and stored at −70 °C until use. Total protein content was determined by the Bradford assay [89].

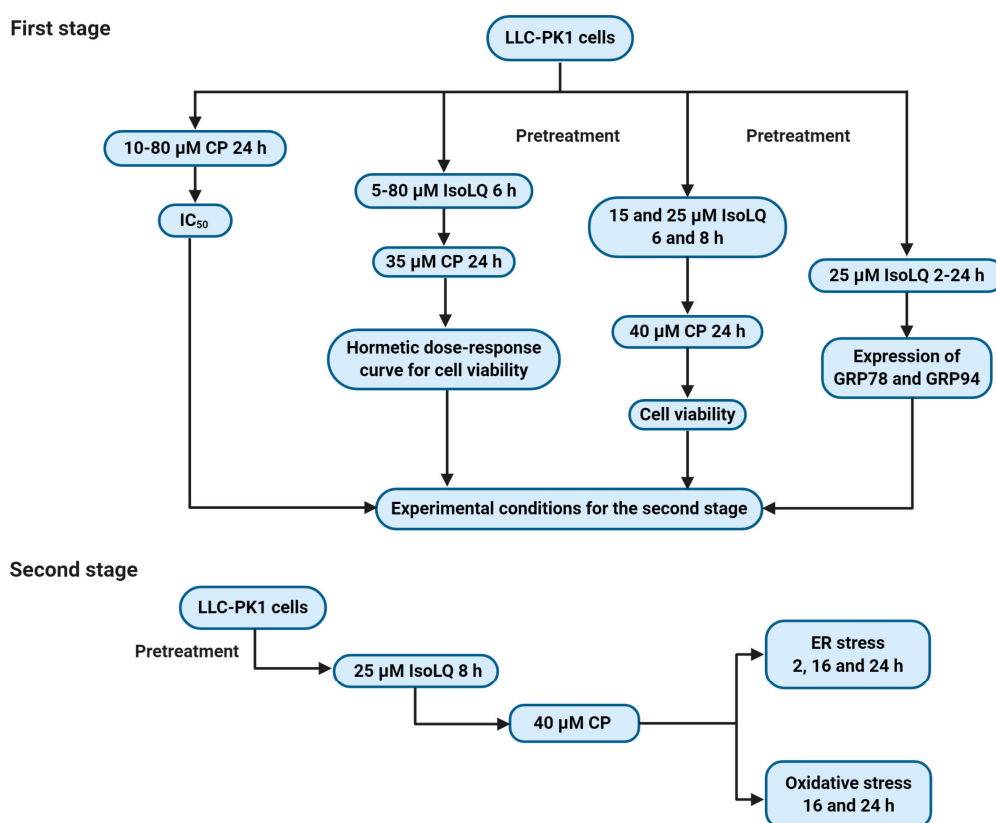


Figure 9. Scheme of the experimental design. CP, cisplatin; IsoLQ, isoliquiritigenin; GRP78, glucose-regulated protein 78 kDa; GRP94, glucose-regulated protein 94 kDa; ER, endoplasmic reticulum. Figure was created with [Biorender.com](https://www.biorender.com).

4.6. ER Stress Evaluation

Western Blot Analysis

Proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and transferred to polyvinylidene fluoride membranes, which were blocked for one hour with 5% skimmed milk or bovine serum albumin. Membranes were left incubating overnight at 4 °C with the appropriate primary antibodies against GRP78 (1:1000), GRP94 (1:1000), and α -tubulin (1:8000). Subsequently, membranes were washed and incubated with the appropriate secondary antibodies for two hours. The proteins of interest were detected with the LI-COR Odyssey Sa Infrared Imaging System (Lincoln, NE, USA). Image analysis was performed with Image Studio Lite Software version 5.2.

4.7. Oxidative Stress Evaluation

4.7.1. Measurement of ROS Production

After the second stage cell treatments, DMEM was removed and cells were washed with PBS followed by incubation with 10 μM H_2DCFDA for 30 min at 37 °C in the darkness. Fluorescence intensity was visualized and determined in a Cytation 5 Cell Imaging Reader (Biotek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) at excitation and emission wavelengths of 485 and 520 nm, respectively. Relative fluorescence intensity of treated cells was expressed as a percentage of the control (without treatments).

In order to determine the intracellular ROS sources, LLC-PK1 cells were pretreated with IsoLQ for 8 h, then with CP for 16 or 24 h. At 30 min before the end of the CP treatments, the NOX inhibitor 10 μM DPI and the NOS inhibitor 1 mM L-NAME, were added separately to the cell cultures. Finally, the growth medium was removed, and the measurement of ROS was carried out as described above.

4.7.2. Measurement of GSH/GSSG Ratio

The redox status, expressed as the GSH/GSSG ratio, was determined following a method previously described [90].

4.7.3. Free Thiols Levels

Free thiols were determined following a method previously described [91]. Total protein content was determined by the Bradford assay [89]. Results are expressed as nmol/mg protein.

4.7.4. GR Activity

Activity of GR was determined by measuring the disappearance of NADPH at 340 nm. Total protein content was determined by the Bradford assay [89]. Results are expressed as U/mg protein, where U equals one μmol of oxidized NADPH per minute [92].

4.8. Statistical Analysis

The results are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical analysis was performed for each determination using the software Graph-Pad Prism 6.0 (San Diego, CA, USA) comparing the mean values through a one-way analysis of variance, followed by the Tukey's multiple comparison test. For the time-course studies of Western blot, a Student's *t*-test was carried out with respect to the control. A *p*-value < 0.05 was considered significant.

5. Conclusions

The mechanism of cisplatin toxicity is complex and involves many cellular targets, some of which are less studied, such as ER stress, which could have cytoprotective or cytotoxic effects. However, if ER stress is induced early with natural compounds such as IsoLQ, the effects could be beneficial because the cell adapts to stress, distributing biological resources to help defend the organism from a wide range of stressor agents, such as CP. However, to describe the mechanisms involved in this specific hormetic effect, it is necessary to study and explore each UPR pathway activated in this particular experimental model.

In conclusion, our results suggest that pretreatment with IsoLQ induces the expression of GRP78 and GRP94, consequently inducing ER stress-mediated hormesis and ameliorating oxidative stress, both of which have a moderately protective effect against CP-induced nephrotoxicity in LLC-PK1 cells. This study provides another strategy or perspective to prevent cisplatin-induced toxicity, which can be applied to the study of other reticulum stress-inducing compounds.

Author Contributions: Conceptualization, T.G.-S., O.N.M.-C. and J.P.-C.; methodology, formal analysis, investigation, and data curation, T.G.-S.; writing—original draft preparation, T.G.-S., O.N.M.-C. and J.P.-C.; writing—review and editing, T.G.-S., O.N.M.-C., J.D.S., M.E.I.-R. and J.P.-C.; supervision and funding acquisition, J.P.-C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by (1) Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, A1-S-7495), (2) Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT, IN202219), Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and (3) Programa de Apoyo a la Investigación y al Posgrado (PAIP, 5000-9105).

Acknowledgments: T.G.-S. is a PhD student who received a scholarship from CONACYT-México and would like to thank Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM. This article is a requirement for obtaining the Doctor of Science degree of the Programa de Posgrado de Ciencias Biológicas, UNAM. We thank Elena Martínez-Klimova for English and style corrections to the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Chen, C.; Huang, S.; Chen, C.L.; Su, S.B.; Fang, D.D. Isoliquiritigenin Inhibits Ovarian Cancer Metastasis by Reversing Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Molecules* **2019**, *24*, 3725. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Kim, J.Y.; Park, S.J.; Yun, K.J.; Cho, Y.W.; Park, H.J.; Lee, K.T. Isoliquiritigenin isolated from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* inhibits LPS-induced iNOS and COX-2 expression via the attenuation of NF- κ B in RAW 264.7 macrophages. *Eur. J. Pharmacol.* **2008**, *584*, 175–184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Lee, Y.; Chin, Y.W.; Bae, J.K.; Seo, J.; Choi, Y. Pharmacokinetics of Isoliquiritigenin and Its Metabolites in Rats: Low Bioavailability Is Primarily Due to the Hepatic and Intestinal Metabolism. *Planta Med.* **2013**, *79*, 1656–1665. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Ramalingam, M.; Kim, H.; Lee, Y.; Lee, Y.I. Phytochemical and Pharmacological Role of Liquiritigenin and Isoliquiritigenin From Radix *Glycyrrhizae* in Human Health and Disease Models. *Front. Aging Neurosci.* **2018**, *10*, 348. [[CrossRef](#)]
5. Takahashi, T.; Takasuka, N.; Iigo, M.; Baba, M.; Nishino, H.; Tsuda, H.; Okuyama, T. Isoliquiritigenin, a flavonoid from licorice, reduces prostaglandin E2 and nitric oxide, causes apoptosis, and suppresses aberrant crypt foci development. *Cancer Sci.* **2004**, *95*, 448–453. [[CrossRef](#)]
6. Tanemoto, R.; Okuyama, T.; Matsuo, H.; Okumura, T.; Ikeya, Y.; Nishizawa, M. The constituents of licorice (*Glycyrrhiza uralensis*) differentially suppress nitric oxide production in interleukin-1 β -treated hepatocytes. *Biochem. Biophys. Rep.* **2015**, *2*, 153–159. [[CrossRef](#)]
7. Wang, A.; Lu, Y.; Shi, P.; Zhang, H. Hydroxyl and hydroperoxyl radicals scavenging by isoliquiritigenin and liquiritigenin: A quantum chemical study. *Struct. Chem.* **2017**, *28*, 1181–1186. [[CrossRef](#)]
8. Zhao, H.; Yuan, X.; Li, D.; Chen, H.; Jiang, J.; Wang, Z.; Sun, X.; Zheng, Q. Isoliquiritigenin Enhances the Antitumour Activity and Decreases the Genotoxic Effect of Cyclophosphamide. *Molecules* **2013**, *18*, 8786–8798. [[CrossRef](#)]
9. Moreno-Londoño, A.P.; Bello-Alvarez, C.; Pedraza-Chaverri, J. Isoliquiritigenin pretreatment attenuates cisplatin induced proximal tubular cells (LLC-PK1) death and enhances the toxicity induced by this drug in bladder cancer T24 cell line. *Food Chem. Toxicol.* **2017**, *109*, 143–154. [[CrossRef](#)]
10. Orlikova, B.; Tasdemir, D.; Golais, F.; Dicato, M.; Diederich, M. Dietary chalcones with chemopreventive and chemotherapeutic potential. *Genes Nutr.* **2011**, *6*, 125–147. [[CrossRef](#)]
11. Chen, H.Y.; Huang, T.C.; Shieh, T.M.; Wu, C.H.; Lin, L.C.; Hsia, S.M. Isoliquiritigenin Induces Autophagy and Inhibits Ovarian Cancer Cell Growth. *IJMS* **2017**, *18*, 2025. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Hu, F.W.; Yu, C.C.; Hsieh, P.L.; Liao, Y.W.; Lu, M.Y.; Chu, P.M. Targeting oral cancer stemness and chemoresistance by isoliquiritigenin-mediated GRP78 regulation. *Oncotarget* **2017**, *8*, 93912–93923. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Kanazawa, M.; Satomi, Y.; Mizutani, Y.; Ukimura, O.; Kawauchi, A.; Sakai, T.; Baba, M.; Okuyama, T.; Nishino, H.; Miki, T. Isoliquiritigenin Inhibits the Growth of Prostate Cancer. *Eur. Urol.* **2003**, *43*, 580–586. [[CrossRef](#)]
14. Si, L.; Yang, X.; Yan, X.; Wang, Y.; Zheng, Q. Isoliquiritigenin induces apoptosis of human bladder cancer T24 cells via a cyclin-dependent kinase-independent mechanism. *Oncol. Lett.* **2017**, *14*, 241–249. [[CrossRef](#)]
15. Zhou, G.S.; Song, L.J.; Yang, B. Isoliquiritigenin inhibits proliferation and induces apoptosis of U87 human glioma cells in vitro. *Mol. Med. Rep.* **2013**, *7*, 531–536. [[CrossRef](#)]
16. Lee, C.K.; Son, S.H.; Park, K.K.; Park, J.H.Y.; Lim, S.S.; Chung, W.Y. Isoliquiritigenin Inhibits Tumor Growth and Protects the Kidney and Liver Against Chemotherapy-Induced Toxicity in a Mouse Xenograft Model of Colon Carcinoma. *J. Pharm. Sci.* **2008**, *106*, 444–451. [[CrossRef](#)]
17. Peng, F.; Du, Q.; Peng, C.; Wang, N.; Tang, H.; Xie, X.; Shen, J.; Chen, J. A Review: The Pharmacology of Isoliquiritigenin: A Review: The Pharmacology of ISL. *Phytother. Res.* **2015**, *29*, 969–977. [[CrossRef](#)]
18. Wang, Z.F.; Liu, J.; Yang, Y.A.; Zhu, H.L. A Review: The Anti-inflammatory, Anticancer and Antibacterial Properties of Four Kinds of Licorice Flavonoids Isolated from Licorice. *CMC* **2020**, *27*, 1997–2011. [[CrossRef](#)]
19. Chirino, Y.I.; Pedraza-Chaverri, J. Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Exp. Toxicol. Pathol.* **2009**, *61*, 223–242. [[CrossRef](#)]
20. dos Santos, N.A.G.; Carvalho Rodrigues, M.A.; Martins, N.M.; dos Santos, A.C. Cisplatin-induced nephrotoxicity and targets of nephroprotection: An update. *Arch. Toxicol.* **2012**, *86*, 1233–1250. [[CrossRef](#)]

21. Manohar, S.; Leung, N. Cisplatin nephrotoxicity: A review of the literature. *J. Nephrol.* **2018**, *31*, 15–25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Miller, R.P.; Tadagavadi, R.K.; Ramesh, G.; Reeves, W.B. Mechanisms of Cisplatin Nephrotoxicity. *Toxins* **2010**, *2*, 2490–2518. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Sancho-Martínez, S.M.; Prieto-García, L.; Prieto, M.; López-Novoa, J.M.; López-Hernández, F.J. Subcellular targets of cisplatin cytotoxicity: An integrated view. *Pharmacol. Ther.* **2012**, *136*, 35–55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Gómez-Sierra, T.; Eugenio-Pérez, D.; Sánchez-Chinchillas, A.; Pedraza-Chaverri, J. Role of food-derived antioxidants against cisplatin induced-nephrotoxicity. *Food Chem. Toxicol.* **2018**, *120*, 230–242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Pabla, N.; Dong, Z. Cisplatin nephrotoxicity: Mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney Int.* **2008**, *73*, 994–1007. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Peres, L.A.B.; da Cunha Júnior, A.D. Acute nephrotoxicity of cisplatin: Molecular mechanisms. *J. Bras. Nefrol.* **2013**, *35*, 332–340. [[CrossRef](#)]
27. Almanza, A.; Carlesso, A.; Chinthia, C.; Creedican, S.; Doultinos, D.; Leuzzi, B.; Luís, A.; McCarthy, N.; Montibeller, L.; More, S.; et al. Endoplasmic reticulum stress signaling—from basic mechanisms to clinical applications. *FEBS J.* **2019**, *286*, 241–278. [[CrossRef](#)]
28. Braakman, I.; Hebert, D.N. Protein Folding in the Endoplasmic Reticulum. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *5*, a013201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Schönthal, A.H. Endoplasmic Reticulum Stress: Its Role in Disease and Novel Prospects for Therapy. *Scientifica* **2012**, *2012*, 857516. [[CrossRef](#)]
30. Schwarz, D.S.; Blower, M.D. The endoplasmic reticulum: Structure, function and response to cellular signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* **2016**, *73*, 79–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Wang, Q.; Groenendyk, J.; Michalak, M. Glycoprotein Quality Control and Endoplasmic Reticulum Stress. *Molecules* **2015**, *20*, 13689–13704. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Malhotra, J.D.; Kaufman, R.J. Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress: A Vicious Cycle or a Double-Edged Sword? *Antioxid. Redox Signal.* **2007**, *9*, 2277–2294. [[CrossRef](#)]
33. Ozgur, R.; Uzilday, B.; Iwata, Y.; Koizumi, N.; Turkan, I. Interplay between the unfolded protein response and reactive oxygen species: A dynamic duo. *J. Exp. Bot.* **2018**, *69*, 3333–3345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Reyes-Fermín, L.M.; Aparicio-Trejo, O.E.; Avila-Rojas, S.H.; Gómez-Sierra, T.; Martínez-Klimova, E.; Pedraza-Chaverri, J. Natural antioxidants' effects on endoplasmic reticulum stress-related diseases. *Food Chem. Toxicol.* **2020**, *138*, 111229. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Boyce, M.; Yuan, J. Cellular response to endoplasmic reticulum stress: A matter of life or death. *Cell Death Differ.* **2006**, *13*, 363–373. [[CrossRef](#)]
36. Inagi, R.; Kumagai, T.; Nishi, H.; Kawakami, T.; Miyata, T.; Fujita, T.; Nangaku, M. Preconditioning with Endoplasmic Reticulum Stress Ameliorates Mesangioproliferative Glomerulonephritis. *JASN* **2008**, *19*, 915–922. [[CrossRef](#)]
37. Kitamura, M. Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in renal pathophysiology: Janus faces. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* **2008**, *295*, F323–F334. [[CrossRef](#)]
38. Shi, S.; Tan, P.; Yan, B.; Gao, R.; Zhao, J.; Wang, J.; Guo, J.; Li, N.; Ma, Z. ER stress and autophagy are involved in the apoptosis induced by cisplatin in human lung cancer cells. *Oncol. Rep.* **2016**, *35*, 2606–2614. [[CrossRef](#)]
39. Song, S.; Tan, J.; Miao, Y.; Li, M.; Zhang, Q. Crosstalk of autophagy and apoptosis: Involvement of the dual role of autophagy under ER stress. *J. Cell Physiol.* **2017**, *232*, 2977–2984. [[CrossRef](#)]
40. Mattson, M.P. Hormesis defined. *Ageing Res. Rev.* **2008**, *7*, 1–7. [[CrossRef](#)]
41. Zimmermann, A.; Bauer, M.; Kroemer, G.; Madeo, F.; Carmona-Gutierrez, D. When less is more: Hormesis against stress and disease. *MIC* **2014**, *1*, 150–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Mollereau, B. Establishing Links between Endoplasmic Reticulum-Mediated Hormesis and Cancer. *Mol. Cell. Biol.* **2013**, *33*, 2372–2374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Mollereau, B.; Manié, S.; Napoletano, F. Getting the better of ER stress. *J. Cell Commun. Signal.* **2014**, *8*, 311–321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Marques, F.Z.; Markus, M.A.; Morris, B.J. Hormesis as a pro-healthy aging intervention in human beings? *Dose Response* **2009**, *8*, 28–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

45. Breithaupt, H. Fierce creatures: Zoonoses, diseases that jump from animals to humans, are a growing health problem around the world. Understanding their causes and their effects on humans have therefore become an important topic for global public health. *EMBO Rep.* **2003**, *4*, 921–924. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Calabrese, E.J. Hormesis: Why it is important to toxicology and toxicologists. *Environ. Toxicol. Chem.* **2008**, *27*, 1451. [[CrossRef](#)]
47. Calabrese, E.J.; Baldwin, L.A. The Dose Determines the Stimulation (and Poison): Development of a Chemical Hormesis Database. *Int. J. Toxicol.* **1997**, *16*, 545–559. [[CrossRef](#)]
48. Calabrese, E.J.; Baldwin, L.A. U-Shaped Dose-Responses in Biology, Toxicology, and Public Health. *Annu. Rev. Public Health* **2001**, *22*, 15–33. [[CrossRef](#)]
49. Lushchak, V.I. Dissection of the Hormetic Curve: Analysis of Components and Mechanisms. *Dose-Response* **2014**, *12*. [[CrossRef](#)]
50. Calabrese, E.J.; Mattson, M.P. How does hormesis impact biology, toxicology, and medicine? *NPJ Aging Mech. Dis.* **2017**, *3*, 13. [[CrossRef](#)]
51. Foufelle, F.; Fromenty, B. Role of endoplasmic reticulum stress in drug-induced toxicity. *Pharm. Res. Perspect* **2016**, *4*, e00211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Inagi, R. Endoplasmic reticulum stress as a progression factor for kidney injury. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2010**, *10*, 156–165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Peyrou, M.; Cribb, A.E. Effect of endoplasmic reticulum stress preconditioning on cytotoxicity of clinically relevant nephrotoxins in renal cell lines. *Toxicol. In Vitro* **2007**, *21*, 878–886. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Dasari, S.; Bernard Tchounwou, P. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *Eur. J. Pharmacol.* **2014**, *740*, 364–378. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Tian, J.; Liu, R.; Qu, Q. Role of endoplasmic reticulum stress on cisplatin resistance in ovarian carcinoma. *Oncol. Lett.* **2017**, *13*, 1437–1443. [[CrossRef](#)]
56. Mohan, I.K.; Khan, M.; Shobha, J.C.; Naidu, M.U.R.; Prayag, A.; Kuppusamy, P.; Kutala, V.K. Protection against cisplatin-induced nephrotoxicity by Spirulina in rats. *Cancer Chemother. Pharm.* **2006**, *58*, 802–808. [[CrossRef](#)]
57. Zou, P.; Song, J.; Jiang, B.; Pei, F.; Chen, B.; Yang, X.; Liu, G.; Hu, Z. Epigallocatechin-3-gallate protects against cisplatin nephrotoxicity by inhibiting the apoptosis in mouse. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2014**, *7*, 4607–4616.
58. Khan, S.A.; Priyamvada, S.; Khan, W.; Khan, S.; Farooq, N.; Yusufi, A.N.K. Studies on the protective effect of green tea against cisplatin induced nephrotoxicity. *Pharmacol. Res.* **2009**, *60*, 382–391. [[CrossRef](#)]
59. Sun, C.; Zhang, H.; Ma, X.; Zhou, X.; Gan, L.; Liu, Y.; Wang, Z. Isoliquiritigenin Enhances Radiosensitivity of HepG2 Cells via Disturbance of Redox Status. *Cell Biochem. Biophys.* **2013**, *65*, 433–444. [[CrossRef](#)]
60. Bhakta-Guha, D.; Efferth, T. Hormesis: Decoding Two Sides of the Same Coin. *Pharmaceuticals* **2015**, *8*, 865–883. [[CrossRef](#)]
61. Cox, L.A. (Tony) Hormesis for Fine Particulate Matter (PM 2.5). *Dose-Response* **2012**, *10*. [[CrossRef](#)]
62. Cybulsky, A.V. Endoplasmic reticulum stress, the unfolded protein response and autophagy in kidney diseases. *Nat. Rev. Nephrol.* **2017**, *13*, 681–696. [[CrossRef](#)]
63. Dufey, E.; Sepúlveda, D.; Rojas-Rivera, D.; Hetz, C. Cellular Mechanisms of Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Health and Disease. 1. An overview. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2014**, *307*, C582–C594. [[CrossRef](#)]
64. Hiramatsu, N.; Chiang, W.-C.; Kurt, T.D.; Sigurdson, C.J.; Lin, J.H. Multiple Mechanisms of Unfolded Protein Response-Induced Cell Death. *Am. J. Pathol.* **2015**, *185*, 1800–1808. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Urra, H.; Dufey, E.; Lisbona, F.; Rojas-Rivera, D.; Hetz, C. When ER stress reaches a dead end. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Mol. Cell Res.* **2013**, *1833*, 3507–3517. [[CrossRef](#)]
66. Bedard, K.; MacDonald, N.; Collins, J.; Cribb, A. Cytoprotection Following Endoplasmic Reticulum Stress Protein Induction in Continuous Cell Lines. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2004**, *94*, 124–131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Prachasilchai, W.; Sonoda, H.; Yokota-Ikeda, N.; Oshikawa, S.; Aikawa, C.; Uchida, K.; Ito, K.; Kudo, T.; Imaizumi, K.; Ikeda, M. A protective role of unfolded protein response in mouse ischemic acute kidney injury. *Eur. J. Pharmacol.* **2008**, *592*, 138–145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

68. Xu, Y.; Guo, M.; Jiang, W.; Dong, H.; Han, Y.; An, X.F.; Zhang, J. Endoplasmic reticulum stress and its effects on renal tubular cells apoptosis in ischemic acute kidney injury. *Ren. Fail.* **2016**, *38*, 831–837. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Yan, M.; Shu, S.; Guo, C.; Tang, C.; Dong, Z. Endoplasmic reticulum stress in ischemic and nephrotoxic acute kidney injury. *Ann. Med.* **2018**, *50*, 381–390. [[CrossRef](#)]
70. Cao, S.S.; Kaufman, R.J. Targeting endoplasmic reticulum stress in metabolic disease. *Expert Opin. Ther. Targets* **2013**, *17*, 437–448. [[CrossRef](#)]
71. Halliwell, B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, *35*, 1147–1150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Small, D.M.; Coombes, J.S.; Bennett, N.; Johnson, D.W.; Gobe, G.C. Oxidative stress, anti-oxidant therapies and chronic kidney disease: Oxidative stress and CKD. *Nephrology* **2012**, *17*, 311–321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Bhandary, B.; Marahatta, A.; Kim, H.-R.; Chae, H.-J. An Involvement of Oxidative Stress in Endoplasmic Reticulum Stress and Its Associated Diseases. *IJMS* **2012**, *14*, 434–456. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Goligorsky, M.S. Oxidative Stress and the Kidney: Riding on the Curve of Hormesis. *Antioxid. Redox Signal.* **2016**, *25*, 117–118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Mailloux, R.J.; Jin, X.; Willmore, W.G. Redox regulation of mitochondrial function with emphasis on cysteine oxidation reactions. *Redox Biol.* **2014**, *2*, 123–139. [[CrossRef](#)]
76. Ursini, F.; Maiorino, M.; Forman, H.J. Redox homeostasis: The Golden Mean of healthy living. *Redox Biol.* **2016**, *8*, 205–215. [[CrossRef](#)]
77. Xiong, Y.; Uys, J.D.; Tew, K.D.; Townsend, D.M. S-Glutathionylation: From Molecular Mechanisms to Health Outcomes. *Antioxid. Redox Signal.* **2011**, *15*, 233–270. [[CrossRef](#)]
78. Haynes, C.M.; Titus, E.A.; Cooper, A.A. Degradation of Misfolded Proteins Prevents ER-Derived Oxidative Stress and Cell Death. *Mol. Cell* **2004**, *15*, 767–776. [[CrossRef](#)]
79. Townsend, D.M. Metabolism of Cisplatin to a Nephrotoxin in Proximal Tubule Cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2003**, *14*, 1–10. [[CrossRef](#)]
80. Birk, J.; Meyer, M.; Aller, I.; Hansen, H.G.; Odermatt, A.; Dick, T.P.; Meyer, A.J.; Appenzeller-Herzog, C. Endoplasmic reticulum: Reduced and oxidized glutathione revisited. *J. Cell Sci.* **2013**, *126*, 1604–1617. [[CrossRef](#)]
81. Ognjanović, B.I.; Djordjević, N.Z.; Matić, M.M.; Obradović, J.M.; Mladenović, J.M.; Štajn, A.Š.; Saičić, Z.S. Lipid Peroxidative Damage on Cisplatin Exposure and Alterations in Antioxidant Defense System in Rat Kidneys: A Possible Protective Effect of Selenium. *IJMS* **2012**, *13*, 1790–1803. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Uzilday, B.; Ozgur, R.; Sekmen, A.H.; Turkan, I. Endoplasmic reticulum stress regulates glutathione metabolism and activities of glutathione related enzymes in Arabidopsis. *Funct. Plant. Biol.* **2018**, *45*, 284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Zaazaa, A.M.; Motelp, B.A.A.E.; Aniss, N.N.D. Potential Protective Role of Rutin and Alpha-lipoic Acid Against Cisplatin-induced Nephrotoxicity in Rats. *Pak. J. Biol. Sci.* **2019**, *22*, 361–371. [[CrossRef](#)]
84. Cullinan, S.B.; Zhang, D.; Hannink, M.; Arvisais, E.; Kaufman, R.J.; Diehl, J.A. Nrf2 Is a Direct PERK Substrate and Effector of PERK-Dependent Cell Survival. *MCB* **2003**, *23*, 7198–7209. [[CrossRef](#)]
85. Huang, Y.; Li, W.; Su, Z.; Kong, A.N.T. The complexity of the Nrf2 pathway: Beyond the antioxidant response. *J. Nutr. Biochem.* **2015**, *26*, 1401–1413. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Zhu, Y.; Zheng, Z.; Hu, S.; Ru, X.; Fan, Z.; Qiu, L.; Zhang, Y. Unification of Opposites between Two Antioxidant Transcription Factors Nrf1 and Nrf2 in Mediating Distinct Cellular Responses to the Endoplasmic Reticulum Stressor Tunicamycin. *Antioxidants* **2019**, *9*, 4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Thongnuanjan, P.; Soodvilai, S.; Chatsudthipong, V.; Soodvilai, S. Fenofibrate reduces cisplatin-induced apoptosis of renal proximal tubular cells via inhibition of JNK and p38 pathways. *J. Toxicol. Sci.* **2016**, *41*, 339–349. [[CrossRef](#)]
88. Clarke, J.M.; Gillings, M.R.; Altavilla, N.; Beattie, A.J. Potential problems with fluorescein diacetate assays of cell viability when testing natural products for antimicrobial activity. *J. Microbiol. Methods* **2001**, *46*, 261–267. [[CrossRef](#)]
89. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254. [[CrossRef](#)]
90. Rahman, I.; Kode, A.; Biswas, S.K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 3159–3165. [[CrossRef](#)]

91. Ellman, G.L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, *82*, 70–77. [[CrossRef](#)]
92. Carlberg, I.; Mannervik, B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 5475–5480. [[PubMed](#)]

Sample Availability: Samples of the compounds are not available from the authors.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).