



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Maestría en Ciencias Bioquímicas

“Análisis de los marcadores de estrés de retículo endoplásmico y
estrés oxidante en dos modelos experimentales de insuficiencia renal
aguda en ratas”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Biol. Ramírez Magaña Karla Jaqueline

TUTOR PRINCIPAL

Dr. José Pedraza Chaverri

Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Gohar Gevorkyan Markosyan

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dra. Katy Alejandra Sánchez Pozos

Hospital Juárez de México

Ciudad de México, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al posgrado en Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), donde realicé mis estudios de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca para realizar mis estudios de maestría en el programa de Ciencias Bioquímicas, UNAM.

El proyecto fue financiado por el CONACYT (A1-S7495), el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN202219 y PAPIIT IN200922) y el Programa de Apoyo a la Investigación y al Posgrado (PAIP, 5000-9105).

Al Doctor José Pedraza como mi tutor principal por su apoyo, paciencia y enseñanzas a lo largo de mi estancia en su laboratorio para realizar mis estudios de maestría en esta temporada de pandemia.

A mi comité tutorial, la Doctora Gohar Gevorkyan y la Doctora Katy Sánchez por sus correcciones, sus enseñanzas, su apoyo y por sus palabras de aliento que ayudaron a continuar a pesar de la situación de pandemia.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Al Doctor José Pedraza por la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por impulsarme a seguir en el campo de la investigación científica.

A la Doctora Tania Gómez por toda su enseñanza y consejos en la realización de los experimentos y demás trabajo en el laboratorio tanto de escritorio como experimental; por su paciencia y confianza brindada en mí, por su inmenso apoyo en mi proceso de aprendizaje, por los consejos personales y buenos deseos; y por no rendirse conmigo jaja.

Al M. en C. Omar Medina por enseñarme de manera correcta la realización de los análisis de mis datos, por sus consejos, por sus platicas tan carismáticas y por la confianza que me ha brindado para moverme en el laboratorio.

A las Doctoras Katy Sánchez y Guadalupe Ortiz por enseñarme este camino hacia la investigación, sus consejos, su ayuda y su cariño.

A las Doctoras Alexis Jiménez, Ariadna Ortega, Estefany Hernández y Tania Gómez por darme la confianza que necesité para terminar mis estudios de maestría, sus tantos consejos en el ámbito personal y laboral, sus inmensas enseñanzas, su apoyo y platicas recreativas en el laboratorio.

Al Doctor Emiliano Aparicio por su bienvenida tan alegre al laboratorio y su ayuda brindada a lo largo de mi trabajo experimental. A todas mis compañeras de laboratorio que hacen de mi estancia en este laboratorio un momento muy enriquecedor y cálido.

Dedicatorias

A mi familia hermosa que siempre ha estado apoyándome en los momentos difíciles. A mi mamá por siempre darme tanto amor, porras y apoyo incondicional. A mi hermana, que, aunque el tiempo no nos ha dejado compartir tanto, siempre ha estado a mi lado apoyándome y amándome como siempre. A mi papá que siempre ha creído en mí y nunca me ha dejado. A Alonso por su amor, su apoyo, sus consejos y su compañía en todo momento de mis estudios de maestría.

A mi tía Mari por regañarme, desearme siempre lo mejor, amarme y sus palabras de aliento siempre. A mi abuela que siempre confió en mí, me amó y siempre estuvo conmigo. A mis tíos, Carlos y Nacho que también, desde lejos, siempre me acompañaron en mi desarrollo personal y académico.

A mis amigos, Alejandra, Selene, Brianda, Jonathan, Fernando Lomelí, Ikbal, Sara, Jesús y Alonso por su compañía, ayuda y cariño brindado a lo largo de mis estudios de maestría

A mi yiyi, a power, a tami y a olin, por desvelarse conmigo y acompañarme en los momentos de relajación del día.

Índice

Índice de abreviaturas.....	7
Índice de figuras y tablas	10
Resumen	11
1. Introducción	13
1.1 Riñón.....	13
1.2 Insuficiencia renal	16
1.3 Modelos de daño renal.....	18
1.4 Modelo de daño renal inducido por ácido fólico (AF).....	19
1.5 Modelo de daño renal inducido por cisplatino (CP).....	21
1.6 Estrés en la insuficiencia renal	23
1.6.1 Estrés de retículo endoplásmico (RE).....	23
1.6.2 Estrés oxidante.	27
2. Justificación	28
3. Hipótesis.....	28
4. Objetivos.....	29
4.1 Objetivo general.....	29
4.2 Objetivos específicos	29
5. Diseño experimental	30
6. Métodos.....	32
6.1 Evaluación de marcadores de lesión renal.....	32
6.1.2 Creatinina sérica (sCr).....	32
6.1.3 Nitrógeno ureico en sangre (BUN).....	33
6.2 Evaluación del estrés de RE	33
6.2.1 Determinación de la expresión de proteínas por western blot.	33
6.2.2 Expresión génica evaluado por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	34
6.3 Evaluación de estrés oxidante.....	37
6.3.1 Enzimas antioxidantes	37
6.4 Análisis estadístico	37
7. Resultados.....	38
7.1 Modelo de IRA inducido por AF.....	38

7.1.1 Marcadores de daño renal	38
7.1.2 Marcadores de estrés de retículo endoplásmico.....	39
7.1.3 Correlaciones entre daño renal y estrés de RE.....	41
7.1.4 Marcadores de estrés oxidante.....	42
7.1.5 Correlaciones entre daño renal y estrés oxidante.....	43
7.1.6 Correlaciones entre estrés de retículo endoplásmico y estrés oxidante.	44
7.2 IRA inducida por CP.....	45
7.2.1 Marcadores de daño renal	45
7.2.2 Marcadores de estrés de retículo endoplásmico.....	46
7.2.3 Correlaciones entre daño renal y estrés de retículo endoplásmico.	47
7.2.4 Marcadores de estrés oxidante	49
7.2.5 Correlaciones entre el daño renal y el estrés oxidante	50
7.2.6 Correlaciones entre estrés de retículo endoplásmico y estrés oxidante	50
8. Resumen de resultados	52
9. Discusion	52
10. Conclusión.....	58
11. Perspectivas	58
12. Referencias	59

Índice de abreviaturas

aa's	Aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AF	Ácido fólico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATF4	Activador del factor de transcripción 4
ATF6	Activador del factor de transcripción 6
ATP	Adenosín trifosfato
BUN	Nitrógeno ureico en sangre
CAT	Catalasa
CHOP	CCAAT / potenciador de la proteína de unión proteína homóloga
CICUAL	Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio
CP	Cisplatino
Ctr-1	Transportador de cobre 1
DNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
eIF2 α	Subunidad alfa del factor de iniciación 2 de eucariontes
ERK	Proteína cinasa regulada por señales extracelulares
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ERAD	Sistema de degradación asociada al retículo Endoplasmático
GAPDH	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
GBM	Membrana basal glomerular

GR	Glutación reductasa
GRP78	Proteína regulada con glucosa de 78 kDa.
GRP94	Proteína regulada con glucosa de 94 kDa.
GSH	Glutación
GSSG	Glutación disulfuro
GST	Glutación S-transferasa
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-18	Interleucina 18
IL-6	Interleucina 6
i.p.	Intraperitoneal
IR	Insuficiencia renal
IRA	Insuficiencia renal aguda
IRE1 α	Proteína cinasa 1 alfa que requiere inositol
JNK	Cinasa c-jun N-terminal
KIM-1	Molécula 1 de lesión renal
LRC	Lesión renal crónica
MATE 1	Tansportador 1 de extrusión de toxinas y fármacos múltiples
MnSOD	Superóxido dismutasa dependiente de manganeso
NF κ B	Factor nuclear kappa B
NGAL	Lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilo
Nrf2	Factor nuclear eritroide similar al factor 2
OCT2	Cationes orgánicos-2
PDI	Proteína disulfuro isomerasa
PERK	Cinasa del RE activada por ARN de doble cadena
PVDF	Floruro de polivinildeno
RE	Retículo endoplásmico
REL	Retículo endoplásmico liso

RER	Retículo endoplásmico rugoso
RIPA	Amortiguador de radioinmunoprecipitación
SDS	Dodecil sulfato de sodio
sCr	Creatinina sérica
SERCA	ATPasa de calcio del retículo sarco/endoplásmico
TAE	Amortiguador de tris, acetato y EDTA
TBS-T	Amortiguador Tris-Salino con Tween 20
TFG	Tasa de filtración glomerular
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
UPR	Respuesta a proteínas mal plegadas
XBP1s	Proteína de unión a caja X del factor de transcripción 1 empalmada
XBP1u	Proteína de unión a caja X del factor de transcripción 1 sin empalmar

Índice de figuras y tablas

Tabla 1. Secuencias de oligonucleotidos con su temperatura optima de alineación.....	36
Figura 1. A) Corte transversal del riñón y un acercamiento a la nefrona; B) Glomérulo renal	14
Figura 2. Estructura química del ácido fólico.....	20
Figura 3. Estructura química del cisplatino.....	21
Figura 4. Las vías de la UPR en condiciones de estrés del RE.....	25
Figura 5. Niveles de creatinina sérica y Nitrógeno Ureico en sangre en el modelo de AF.....	38
Figura 6. Expresión de los marcadores de estrés de RE en el modelo de AF por WB.....	39
Figura 7. Cambio de la expresión relativa del ARNm de los marcadores de estrés de RE en el modelo de AF por PCR.....	40
Figura 8. Análisis de correlación entre el daño renal y los marcadores de estrés de RE en el modelo de AF.....	42
Figura 9. Actividad de la enzima glutatión reductasa, catalasa y glutatión S transferasa en el modelo de AF.....	43
Figura 10. Correlaciones entre enzimas antioxidantes y marcadores de daño renal en el modelo de AF.....	44
Figura 11. Correlaciones entre enzimas antioxidantes y marcadores de estrés de RE en el modelo de AF.....	45
Figura 12. Niveles de creatinina sérica y nitrógeno ureico en sangre en el modelo de CP.....	46
Figura 13. Cambio de la expresión relativa del ARNm de los marcadores de estrés de RE en el modelo de CP evaluados por PCR.....	47
Figura 14. Análisis de correlación entre el daño renal y los marcadores de estrés de RE en el modelo de CP.....	48
Figura 15. Actividad de las enzimas Glutatión reductasa, catalasa y glutatión S transferasa en el modelo de CP.....	49
Figura 16. Correlaciones entre enzimas antioxidantes y marcadores de daño renal en el modelo de CP.....	50
Figura 17. Correlaciones entre enzimas antioxidantes y marcadores de estrés de RE en el modelo de CP.....	51

Resumen

La lesión renal o insuficiencia renal (IR) se desarrolla cuando existe una interrupción en las funciones reguladoras y excretoras renales debido a una obstrucción del flujo urinario, exposición a agentes tóxicos, vejez entre otros, lo que genera una disminución de la tasa de filtración glomerular (TFG). Las especies reactivas de oxígeno (ERO) tienen un papel importante en el desarrollo de la insuficiencia renal ya que pueden generar estrés oxidante. Para estudiar los diferentes mecanismos involucrados en el desarrollo de la lesión renal aguda o insuficiencia renal aguda (IRA) se utilizan diferentes modelos experimentales tanto *in vivo* como *in vitro*. Entre los modelos *in vivo* se encuentran los modelos de IRA inducidos con ácido fólico (AF) o cisplatino (CP) en ratas. El primero de ellos consiste en administrar una sobredosis de AF vía intraperitoneal a los animales de estudio y así provocar un daño en los conductos renales que resulta en una rápida disminución de la TFG, apoptosis, entre otras. El modelo de daño renal inducido por CP consiste en administrar una dosis elevada de este compuesto vía intraperitoneal provocando muerte de las células de los túbulos renales, disfunción mitocondrial, entre otras. En ambos modelos experimentales, uno de los mecanismos de daño es el estrés oxidante, el cual, está relacionado con el estrés de retículo endoplásmico (RE). El estrés de RE es generado también por otras anomalías como la acumulación de proteínas mal plegadas, lo que da lugar a la pérdida de sus funciones. Por ello, se busca conocer y comprender los mecanismos que relacionan el estrés del RE con el estrés oxidante y cómo se involucran en la IRA inducida por AF y CP en ratas.

En ambos modelos se analizaron los niveles de creatinina sérica (sCr) y nitrógeno ureico en sangre (BUN), expresión de proteínas involucradas en la respuesta a proteína mal plegada (UPR) y la actividad enzimática de la glutatión reductasa (GR), catalasa (CAT) y glutatión S-transferasa (GST). Por último, se hicieron correlaciones estadísticas para investigar la relación entre la lesión renal, el estrés de RE y el estrés oxidante.

Se encontró que ambos modelos presentaron niveles elevados de sCr y BUN. Ambos modelos no presentaron cambios en la expresión de la GRP78, tuvieron un aumento significativo en la expresión de la GRP94 y una disminución en la expresión proteica de ATF4. El modelo de CP fue el que presentó una mayor expresión de los ARNm de los marcadores de estrés de RE, mientras que no se encontraron cambios en el modelo de AF. Las enzimas antioxidantes presentaron una menor actividad en los dos modelos a excepción de GST que sólo se observó en el modelo de AF. En cuanto a las correlaciones se observó lo siguiente: (1) el modelo de CP presentó correlaciones significativas entre el daño renal y los ARNm de GRP78, CHOP y XBP1, mientras que estas no fueron significativas en el modelo de AF; (2) en ambos modelos se encontró una correlación significativa ($P < 0.05$) entre la lesión renal y el estrés oxidante y (3) el modelo de AF no presentó una correlación significativa entre el estrés de RE y el estrés oxidante a excepción de la CAT con GRP78, pero el modelo de CP si presentó correlación significativa ($P < 0.05$) entre la actividad de la GR y los ARNm de GRP78, CHOP, XBP1 e IRE1a, y la actividad de la CAT y los ARNm de GRP78, PERK y XBP1.

Se concluye que la vía de estrés de RE es una vía muy dinámica que depende del entorno celular y puede ser en respuesta al grado de lesión provocada en los diferentes modelos estudiados en este proyecto.

1. Introducción

1.1 Riñón

El riñón es el órgano principal que mantiene la cantidad y composición del líquido extracelular por sus funciones de excreción, metabolismo y provisión de sustancias endocrinas (Curthoys y Moe, 2013). El riñón ayuda a preservar la homeostasis interna y un estado constante de equilibrio manteniendo la cantidad y composición del líquido extracelular, gracias a sus funciones de excreción, metabólicas y hormonales (Thurau y Boylan, 1976; Curthoys y Moe, 2013).

Algo muy importante para la homeostasis celular interna es el mantenimiento del pH, ya que éste dicta el estado de carga de las proteínas, lo que interviene en sus funciones conformacionales, enzimáticas y transportadoras. El riñón entonces tiene mecanismos para regular el equilibrio ácido-base. Si existe una alcalosis, por ejemplo, secreta bicarbonato o si hay una acidosis, aumenta la expresión de los transportadores de H^+ y Na^+ (Hoenig y Zeidel, 2014).

Los riñones son dos órganos retroperitoneales pares localizados a nivel de la cavidad abdominal en posición dorsal. La estructura general del riñón está dividida en dos zonas, una externa denominada corteza y otra interna denominada médula (Figura 1) (Escaso *et al.*, 2010; Nielsen *et al.*, 2012).

La nefrona es la unidad estructural del riñón y está formada por dos componentes: el corpúsculo renal o de Malpighi y el túbulo renal (Figura 1A). El corpúsculo renal contiene las unidades vasculares y epiteliales del glomérulo renal, el cual se encuentra dentro de la cápsula de Bowman, y los túbulos renales. (Sherwood, 2011; Vélez *et al.*, 2012).

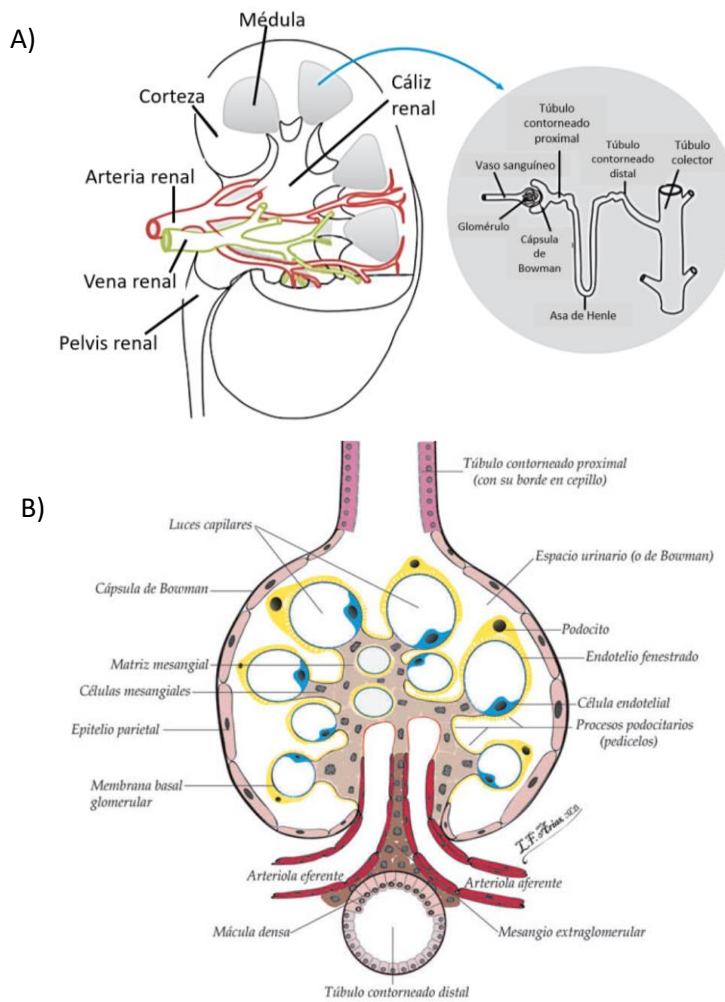


Figura 1. A) Corte transversal del riñón y un acercamiento a la nefrona (Escaso *et al.*, 2010); B) Glomérulo renal (kidneypathology.com, consultado en septiembre 2022)

El glomérulo tiene tres tipos celulares diferentes: el primer tipo celular del filtro glomerular es un endotelio fenestrado cubierto por una glucocálix que cubre el aspecto luminal del capilar y permite la filtración. El segundo tipo celular del filtro es la membrana basal glomerular (GBM) que contiene varias proteínas extracelulares como el colágeno tipo IV, láminas, fibronectinas y proteoglicanos. Por último, las células mesangiales contribuyen también a la integridad glomerular y a la dinámica de filtración (Figura 1B). Es así como se forma el filtrado glomerular primario que posteriormente se modificará durante su tránsito a través de los túbulos renales (Pollak *et al.*, 2014). El sistema glomerular y tubular deben estar en constante

comunicación ya que existe una capacidad limitada para reabsorber el filtrado y por ello la cantidad de filtrado acumulado se debe ajustar a esta capacidad (Gonzalez-Enders, 1997; Pollak *et al.*, 2014).

Los túbulos renales entonces son un sistema que comprende: el túbulo proximal, el asa de Henle y el túbulo distal (Figura 1). Cada uno tiene características morfológicas diferentes para realizar funciones específicas (Sherwood, 2011; Vélez *et al.*, 2012). El túbulo proximal es el primer segmento de la nefrona después del glomérulo y es donde comienza la reabsorción dirigida por las células tubulares. La pared tubular se interpone entre el sitio de filtración y de absorción, lo que refina el proceso de reabsorción y permite un grado de selectividad en la excreción de solutos. La sal, el agua, la glucosa, los aminoácidos (aa's) y los aniones como el fosfato y el citrato se reabsorben, mientras que la creatinina y la urea en su mayor parte se excretan (Thurau y Boylan, 1976; Curthoys y Moe, 2013). Por otro lado, la excreción de ácido es de suma importancia y ocurre en el epitelio tubular proximal en un modo secretor de H^+ independientemente de la carga dietética. Todo el NH_3/NH_4^+ de la orina se sintetiza en el túbulo proximal (Curthoys y Moe, 2013).

Después del túbulo proximal se encuentra el asa de Henle, la cual se divide en la rama delgada descendente, la rama delgada ascendente y la rama gruesa ascendente. En esta estructura se genera la concentración de orina a través de la formación de un gradiente osmótico por el principio físico denominado "multiplicador por contracorriente" (Wirz *et al.*, 1951). En este, los flujos opuestos de las ramas ascendentes y descendentes generan los cambios osmóticos para dar lugar a la formación del concentrado de orina (Peña, 2021).

El túbulo contorneado distal se encuentra entre la mácula densa (placa sensorial colocada delante del glomérulo para poder regular la circulación glomerular de acuerdo con el estado fisicoquímico de la orina que pasa por ahí (Goormaghtiegh; 1937) y el túbulo colector. Es el segmento más corto de la nefrona y tiene un papel fundamental en la reabsorción de NaCl, secreción de potasio, en la secreción de ácidos orgánicos y en la homeostasis de calcio y magnesio (Subramanya y Ellison, 2014; McCormick y Ellison, 2015).

El mecanismo de retroalimentación túbulo-glomerular comprende el control selectivo de las arteriolas en respuesta a los cambios en el flujo tubular distal. Sirve para estabilizar la tasa de flujo tubular distal que regula la osmolaridad de la orina (Gonzalez-Enders, 1997).

La reducción de la tasa de filtración glomerular (TFG) para ajustarse a la disminución de la capacidad de reabsorción significa que el glomérulo conserva el volumen que, en condiciones normales, está en los túbulos. Si la TFG no se redujera y la reabsorción tubular se redujera un 50%, el volumen urinario y la excreción de Na⁺ serían la mitad de la carga filtrada perdiendo así, el volumen urinario, sal y agua. El volumen se conserva por la disminución de la TFG de manera inmediata y efectiva, sin embargo, los desechos nitrogenados y otros compuestos regularmente filtrados son retenidos (Thurau y Boylan, 1976).

Cualquier daño a los túbulos renales que reduzca su capacidad de reabsorción en presencia de una filtración continua conducirá a una reducción inmediata de la función de los glomérulos y una pérdida de fluidos grave. Cuando se interrumpen las funciones regulatorias y excretoras de los riñones, se presenta una insuficiencia renal (IR) (Thurau y Boylan, 1976; Espinosa-Sevilla *et al.* 2013; Makris y Spanou, 2016).

1.2 Insuficiencia renal

La IR es un problema de salud importante en México. En 2010 fue dado a conocer un estudio llamado Epidemiología de la IR en México donde se menciona que cada año se suman al menos 40 000 casos de IR en México, presenta una mortalidad del 16 al 18.7% cuando existe solo una falla única y en pacientes con falla orgánica múltiple la mortalidad sube hasta el 46.7 o 52% (Moreno-Santillan *et al.* 2006; Enfermedades renales, 2019).

La insuficiencia renal aguda (IRA), se refiere a una disminución de la TFG, es decir, a una disminución del flujo de plasma del glomérulo hacia la capsula de Bowman

durante un tiempo específico, dando como resultado una pérdida rápida de la función excretora renal, la acumulación de productos nitrogenados y un desequilibrio hidroelectrolítico y ácido-base (Kellum *et al.*, 2011; Bellodomo *et al.*, 2012; Díaz de León-Ponce *et al.*, 2017; Levey *et al.*, 2017; Kaufman *et al.* 2021).

Los criterios para su diagnóstico se basan en los cambios de la creatinina sérica (sCr) y el nitrógeno ureico en sangre (BUN), la producción de orina que da lugar a la disminución abrupta de la TFG y un aumento en la expresión de los marcadores lipocalina asociada con gelatinasa de neutrófilo (NGAL, neutrophil gelatinase-associated lipocalin) que aumenta su expresión en infecciones, procesos inflamatorios o cuando hay isquemia en células renales del asa de Henle y del túbulo colector (Plascencia-Pimentel *et al.*, 2019); la molécula 1 de lesión renal (KIM-1, kidney injury molecule) observada de igual manera después de una lesión renal y la interleucina 18 (IL-18), producida principalmente por neutrófilos activados, células mononucleares, macrófagos y células no inmunes como las células del túbulo proximal (Kdigo, 2012; Lombi, 2016).

Otro elemento patogénico reconocido en la IRA es la disfunción mitocondrial, la cual genera muerte y una mala función de las células tubulares. Además, la disfunción mitocondrial genera un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), una disminución de la producción de ATP y la liberación del citocromo c (Plotnikov *et al.*, 2007; Szeto *et al.*, 2011; Stallons, 2014). Las ERO tienen un papel muy importante ya que, si existe un estrés oxidante, éstas pueden desencadenar una cascada de señalización molecular que dará lugar a la lesión tubular aguda (Aksu *et al.*, 2011). De igual forma, la inflamación participa en la disminución de la TFG al evitar el paso correcto del filtrado glomerular y tiene un papel importante resultando en una lesión endotelial. Algunos mediadores que potencian la inflamación son las citocinas proinflamatorias, algunas de ellas son el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 beta (IL-1 β) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) (Bonventre, 2004; Schrier *et al.*, 2004).

La IRA y la lesión o insuficiencia renal crónica (IRC) están estrechamente interconectadas, la IRA (independientemente de su etiología) es un factor de riesgo para el desarrollo de la IRC (Chawla *et al.*, 2014), debido a que los mecanismos de reparación adaptativos que persisten después de la fase aguda promueven la inflamación y la fibrosis en la fase crónica. Además, algunos procesos patológicos que persisten después de la IRA son similares a los causantes de la progresión a IRC como la lesión endotelial que da lugar al daño del tubulointersticial y la pérdida vascular que genera, ciclos repetidos de hipoxia e isquemia tisular afectando entonces la función celular renal (Zuk y Bonventre, 2016). Es por ello que se deben buscar estrategias para prevenir la IRA y así evitar una evolución a la IRC.

Otros factores iniciados por la IRA son la apoptosis desregulada, respuestas anormales de células epiteliales, miofibroblastos y células inmunitarias, diferenciación fallida, señalización pro-fibrótica y pro-inflamatoria, pérdida capilar progresiva, perturbación de mecanismos del ciclo celular y cambios epigénéticos dentro de las células intersticiales y epiteliales renales (Zuk y Bonventre, 2016).

1.3 Modelos de daño renal

Para estudiar las enfermedades humanas se utilizan modelos experimentales en diferentes organismos, como roedores, peces y bacterias, así como en células en cultivo; esto proporciona información de la fisiopatología en la enfermedad, permite conocer los mecanismos y sitios donde ocurre el daño y, con base en ello, descubrir herramientas que ayuden al tratamiento de la enfermedad, como la IRA.

Se han desarrollado diferentes modelos experimentales de la IRA: los modelos *in vitro* proporcionan información acerca de la respuesta celular ante la enfermedad, son sencillos de obtener a partir de cultivos primarios de tejidos o de líneas celulares inmortalizadas; y los modelos *in vivo* proporcionan estudios integradores de la evaluación de la función, estructura y la interacción con otros órganos y elementos de la enfermedad (Maiden, 2019; Hukriede *et al.*, 2022).

Los ratas y ratones son los animales más utilizados en los modelos *in vivo* de daño renal, debido a que son relativamente económicos, fáciles de manejar y estandarizar. Además, su tiempo de gestación y de vida es corto, lo que permite estudiar varios individuos y determinar las tasas de mortalidad, sin embargo, debido a su tamaño y el volumen de sangre limitado, no se pueden hacer análisis simultáneos de múltiples parámetros fisiológicos y los cambios en ocasiones pueden ser demasiado pequeños para detectarse (Maiden, 2019).

La IRA en los modelos experimentales se induce con la administración de fármacos nefrotóxicos, metales, obstrucciones en el tracto urinario, toxinas bacterianas, episodios isquémicos, por mencionar algunos ejemplos (Sanz *et al.*, 2013). Algunos de los modelos experimentales *in vivo* utilizados para inducir IRA son los de isquemia renal, antineoplásicos, sepsis, nefrectomía 5/6 (en donde se extirpa un riñón y 2/3 partes del otro), obstrucción unilateral del uréter y obstrucción por una sobredosis de ácido fólico (Maiden, 2019).

La IRA, además, es una enfermedad que puede generar daño a otros órganos y aún no se han descrito por completo todos los mecanismos involucrados en el desarrollo de la enfermedad, por ello es necesario estudiar y comprender los mecanismos para buscar tratamientos que contrarresten el daño.

1.4 Modelo de daño renal inducido por ácido fólico (AF).

El AF (Figura 2) se encuentra presente en la dieta y es necesario en el desarrollo fetal, sin embargo, a puede ser tóxico al provocar una acumulación de cristales en zonas como los túbulos renales.

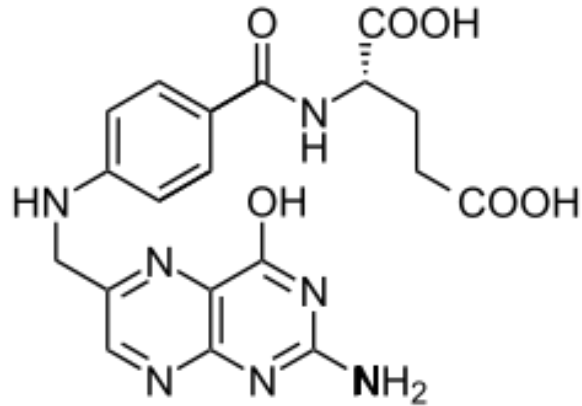


Figura 2. Estructura química del ácido fólico.

El modelo de daño renal inducido por AF consiste en administrar una sola sobredosis de AF (o varias a concentraciones menores) vía intraperitoneal para generar IRA. Este modelo ha sido utilizado desde los 60's, ya que es relativamente simple y además de ser dosis dependiente, el daño se limita a los túbulos renales y en primer instancia, no afecta a otros órganos o tejidos (Taylor *et al.*, 1966; Klingler *et al.*, 1980; Fink *et al.*, 1987; Rattanasinganchan *et al.*, 2016). Se ha descrito que el modelo de daño renal inducido por AF genera una rápida aparición de cristales de ácido fólico en los túbulos renales y puede resultar en una fibrosis predominante del túbulo intersticial debido a la acumulación de matriz extracelular en exceso, principalmente compuesta de colágeno. Esto da lugar a la pérdida de la función renal normal caracterizada por lesión tubular, apoptosis de células tubulares, inflamación y fibrosis. Todas estas respuestas son las que se producen en la IRA en humanos, por lo que se propone que es un excelente modelo que imita la IRA humana (Gupta *et al.*, 2012 Rattanasinganchan *et al.*, 2016). Además, este modelo puede comprender de una lesión de fase aguda y posteriormente una crónica (Aparicio-Trejo *et al.*, 2020).

En la IRA inducida por AF se observan cambios en los niveles de creatinina sérica (sCr) y nitrógeno ureico en sangre (BUN), una disminución en la producción de orina, disminución de la TFG, afectaciones en la respuesta fisiológica, fatiga muscular, hipertrofia renal, una baja en los niveles de glutatión (GSH), disminución

del peso corporal de los animales y reducción del estado de alerta. Además, también se observa un aumento de otros marcadores, como NGAL, KIM-1 e IL-18. (KDIGO, 2012; Lombi, 2016).

1.5 Modelo de daño renal inducido por cisplatino (CP).

El *cis*-diaminodicloroplatino II (cisplatino CP) (Figura 3) es un fármaco antineoplásico utilizado en la clínica para el tratamiento del cáncer de ovario, testículos, vejiga, pulmón y tumores sólidos de cabeza y cuello (Dasari y Tchounwou, 2014).

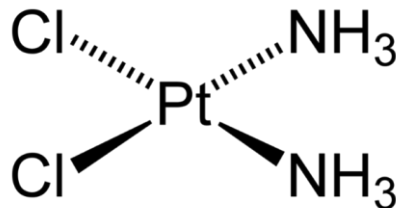


Figura 3. Estructura química del cisplatino.

Sin embargo, su uso se ha asociado con diversos efectos secundarios, uno de los más destacados es la nefrotoxicidad, debido a que el CP se acumula en mayor medida en el riñón (de Jongh *et al.*, 2003). Los daños fisiopatológicos que genera en la lesión renal incluyen una inducción secuencial de vasoconstricción renal, disminución del flujo plasmático renal, reducción de la TFG, aumento de la creatinina sérica y una reducción de los niveles séricos de magnesio y potasio (Oh *et al.*, 2014).

Se ha observado que la muerte de las células tubulares es una característica histopatológica común en la nefrotoxicidad por CP (Oh *et al.*, 2014). En los túbulos proximales se concentra el CP por la localización y expresión de los transportadores de captación de este fármaco (Holditch *et al.*, 2019).

El transporte de CP está mediado por el transportador de cobre 1 (Ctr-1) y de cationes orgánicos-2 (OCT2 en rata y hOCT2 en humano), siendo este último el que

se expresa en mayor medida. La salida de CP se ha asociado al transportador 1 de extrusión de toxinas y fármacos múltiples (MATE 1) (Miller *et al.* 2010; Ciarimboli, 2012). Una vez que el CP ingresa a la célula sus átomos de cloro son desplazados por moléculas de agua volviéndolo un electrófilo potente listo para reaccionar con cualquier nucleófilo, como los átomos donantes de nitrógeno con los ácidos nucleicos, lo que genera así daño a las bases de purina en el ADN en las células bloqueando la división celular y generando muerte celular por apoptosis (Dasari y Tchounwou, 2014; Ghosh, 2019). Se ha descrito que el ADN es el principal blanco de la citotoxicidad del CP en células procariotas y eucariotas deficientes en la reparación del ADN (Beck y Brubaker, 1973).

Por otro lado, el CP también induce la muerte celular por diferentes mecanismos como la autofagia, por vía intrínseca por la liberación de citocromo c a través de las vías de estrés mitocondrial y del retículo endoplásmico (RE); y por la vía extrínseca, a partir de la activación del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y el ligando *Fas*. Además de la apoptosis se ha descrito una vía híbrida apoptótica-necrótica en el modelo de IRA inducida por CP llamada necroptosis (Dasari y Tchounwou, 2014; Oh *et al.*, 2014; Holditch *et al.*, 2019).

El CP genera la salida de calcio de las mitocondrias, lo que da lugar a una interrupción de la homeostasis de calcio, esto inicia eventos primarios como la peroxidación de lípidos, la inhibición de enzimas y daño mitocondrial (Dasari y Tchounwou, 2014). De igual forma, el CP también produce ERO que provocan peroxidación y desnaturalización de proteínas, las cuales, dan lugar a la inactivación enzimática. Una sobreproducción de ERO y una incapacidad para neutralizar esas especies reactivas, genera estrés oxidante que, junto con la disfunción mitocondrial, son características distintivas de la IRA inducida por CP. Otro mecanismo que genera el CP es la inflamación como un papel perjudicial en la lesión renal (Oh *et al.*, 2014; Holditch *et al.*, 2019).

1.6 Estrés en la insuficiencia renal.

1.6.1 Estrés de retículo endoplásmico (RE).

El RE es un sistema membranoso que forma cisternas y túbulos con un solo espacio interno delimitados por su membrana, la cual constituye más de la mitad de la membrana total de la célula. Está organizado por una red que se extiende por todo el citoplasma y se clasifica en: el RE rugoso (RER) que cuenta con ribosomas y el RE liso (REL) que carece de ellos. Sus principales funciones son la organización del núcleo y la síntesis de lípidos y proteínas, siendo esta última la razón por la que tiene un papel central en la biosíntesis celular (Alberts *et al.*, 2002; Welsch, 2009; Mejías *et al.*, 2020).

Las proteínas sintetizadas destinadas a la secreción se transportan a través de una vía secretora altamente regulada, ya que algún error en la exportación conlleva a graves consecuencias estructurales y funcionales. Migran por el aparato de Golgi donde se envasan en vesículas para transportarse a la membrana plasmática, donde se incorporan a ella y se liberan por exocitosis, o bien, para dirigirse a los lisosomas. También es donde comienza la formación de la matriz extracelular (Alberts *et al.*, 2002; Welsch 2009; Almanza *et al.*, 2019).

De igual forma en el RER ocurren algunas reacciones de modificación en las proteínas, como la formación de enlaces disulfuro (por la proteína isomerasa disulfuro, PDI), el comienzo de la glucosilación y su plegamiento con ayuda de catalizadores como proteínas chaperonas (Welsch, 2009; Karp, 2011).

Diferentes alteraciones, como mutaciones, estrés oxidante, hipoxia, desregulación de calcio, autofagia deficiente y errores en la traducción, alteran las funciones del RE provocando que las proteínas no se plieguen de manera correcta y se acumulen en el lumen. Cuando los mecanismos de reparación no son eficientes para evitar la acumulación de estas proteínas aberrantes, se genera el estrés de RE (Bravo *et al.*, 2013; Almanza *et al.*, 2019; Mejías *et al.*, 2020).

En las células el estrés del RE activa la respuesta de proteínas mal plegadas (UPR), para restaurar el RE a su estado fisiológico normal por la detención transitoria de la traducción de proteínas, aumentando la capacidad del plegamiento al expresar en mayor medida proteínas chaperonas y, si es muy severo el daño, puede inducir apoptosis (Zhu y Lee, 2014; Bravo *et al.*, 2013).

En los animales, la UPR está conformada por tres vías de señalización: Proteína cinasa dependiente de inositol alfa (IRE1 α , Inositol-requiring transmembrane kinase/endonucleases), proteína cinasa del RE activada por ARN de doble cadena (PERK, protein kinase activated by double-stranded RNA (PKR)-like ER kinase) y el activador del factor de transcripción 6 (ATF6, Activating Transcription Factor 6) (Figura 4), (Welsch, 2009; Bravo *et al.*, 2013; Almanza *et al.*, 2019; Reyes-Fermín *et al.*, 2020). Aunque, dependiendo de la patología, las vía de la UPR se activaran de manera particular y específica.

En condiciones sin estrés de RE todas éstas vías son reprimidas por la proteína chaperona relacionada con glucosa de 78 kDa (GRP78), pero en condiciones de estrés de RE las proteínas mal plegadas compiten por la unión de GRP78 activando la UPR. Por otro lado la proteína chaperona relacionada con glucosa de 94 kDa (GRP94), es la glicoproteína más abundante del RE y ambas participan en el plegamiento de proteínas, almacenamiento de calcio en el RE y ayudan en la selección de proteínas mal plegadas para su degradación (Zhu y Lee, 2014).

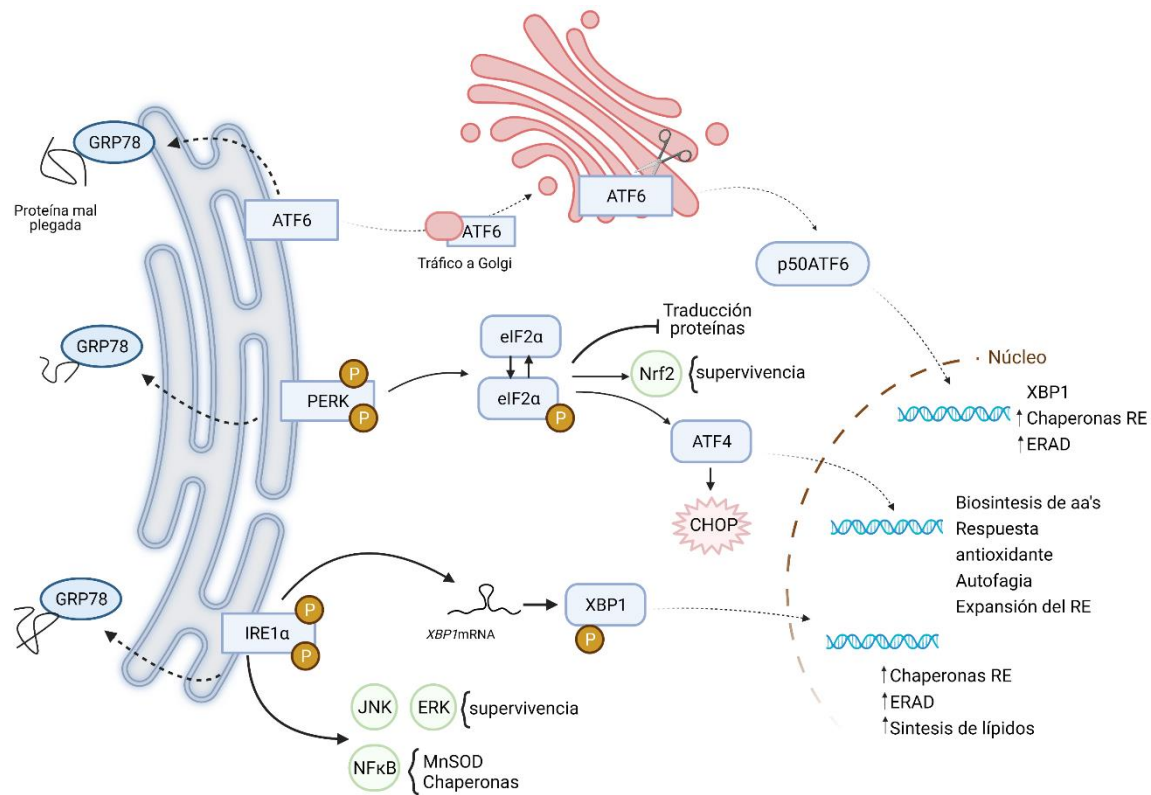


Figura 4. vías de la UPR en condiciones de estrés del RE activada por el desacoplamiento de la chaperona GRP78 de los receptores ATF6, PERK e IRE1 α . RE: retículo endoplásmico; ERAD: sistema de degradación asociada al retículo endoplásmico, aa's: aminoácidos; MnSOD: superóxido dismutasa dependiente de manganeso; GRP78: proteína regulada con glucosa de 78 kDa; ATF6: Activador del factor de transcripción 6; PERK: cinasa del RE activada por ARN de doble cadena; eIF2 α : subunidad alfa del factor de iniciación 2 de eucariontes; Nrf2: factor nuclear eritroide similar al factor 2; ATF4: activador del factor de transcripción 4; CHOP: CCAAT/ potenciador de la proteína de unión a proteína homóloga; IRE1 α : proteína cinasa 1 alfa que requiere inositol; XBP1: proteína de unión a la caja X del factor de transcripción 1; JNK: cinasa c-jun N-terminal; ERK: proteína cinasa regulada por señales extracelulares; NF κ B: factor nuclear kappa B (Imagen basada en Bravo, et al. 2013).

La vía IRE1 α es la vía más conservada en los mamíferos. Es una proteína transmembrana del RE con actividad de serina/treonina cinasa y endoribonucleasa (RNasa) en el espacio citosólico, se regula en dos pasos: la disociación de GRP78 de IRE1 α impulsa a su oligomerización y la unión a proteínas desplegadas conduce la activación de IRE1 α por trans-autofosforilación. La actividad de RNasa modifica el ARNm de la forma sin empalmar de la proteína de unión a caja X del factor de

transcripción 1 (XBP1u), produciendo la forma empalmada de XBP1 (XBP1s), que da lugar a un factor de transcripción dirigido a los genes que participan en el plegamiento de proteínas de RE, el tráfico intracelular, la biogénesis del RE y la UPR (Bashir *et al.*, 2021).

La segunda vía de la UPR inicia con PERK y de igual forma es activada por trans-autofosforilación. Esta cinasa actúa principalmente fosforilando la subunidad alfa del factor de iniciación eucariota 2 (eIF2 α) en su Ser⁵¹. La fosforilación de eIF2 α atenúa la síntesis proteica y suprime la traducción general, favoreciendo la expresión del ARNm involucrado en la respuesta del estrés, induciendo la expresión del factor de transcripción activador 4 (ATF4) relacionado con la transcripción de chaperonas, la expansión del RE y la autofagia mediada por CHOP para restaurar la homeostasis del RE (Fels y Koumenis, 2006).

La tercer y última vía comienza con ATF6, la cual es una proteína transmembranal que al liberarse de la unión con GRP78, se transporta en vesículas hacia el aparato de Golgi y luego al núcleo, donde induce la expresión de genes implicados en la optimización del plegamiento, la maduración y la secreción de proteínas como XBP1, GRP78, GRP94 y la ATPasa de calcio del RE (SERCA) relacionada con la homeostasis del calcio (Bravo *et al.*, 2013; Tam *et al.*, 2018; Reyes-Fermín *et al.*, 2020)

La finalidad de la UPR es restaurar la homeostasis del RE y disminuir la progresión de la lesión renal, sin embargo, algunos factores como el estrés oxidante, producido principalmente en la mitocondria, que tiene un papel clave en el desarrollo y progresión de la IRA, se relaciona con el estrés de RE. La relación que existe entre ambos se ha establecido directamente por el plegamiento incorrecto de proteínas (Aparicio-Trejo, 2020).

El RE está relacionado con la mitocondria, el RE almacena el calcio intracelular y por ello existe una concentración mayor dentro del lumen del RE en comparación con el citosol. Sin embargo, cuando existe estrés de RE, se afectan los canales involucrados en la liberación de Calcio, lo que provoca que aumente la

concentración de Calcio en el citosol y a su vez esto va a estimular el metabolismo de las mitocondrias que generan mas ERO (Zhang, 2010).

1.6.2 Estrés oxidante.

El estrés oxidante no se presenta de forma aislada, siempre interactúa con otras formas de estrés celular como la disfunción mitocondrial, inflamación, fibrosis y el estrés de RE (Burton y Jauniaux, 2011).

En condiciones normales, las células mantienen siempre un equilibrio entre las ERO, que son producidas de manera natural como segundos mensajeros, y los sistemas antioxidantes que mantienen las ERO en niveles normales. Cuando este equilibrio entre agentes antioxidantes y ERO se ve perturbado se presenta un estado de estrés oxidante en la célula. Las ERO son radicales libres y los intermediarios que se generan a partir del oxígeno. Los radicales libres se definen como moléculas que tienen uno o más electrones desapareados, lo que confiere su reactividad. La mayoría de ellos surgen a partir de la necesidad de consumir oxígeno molecular en las mitocondrias para la producción de energía (Halliwell, 2006).

El estrés oxidante provoca alteraciones en la célula, como daño a diferentes biomoléculas claves para el funcionamiento correcto de la célula (ADN, ARN, proteínas, enzimas, lípidos, entre otras) (Ochoa *et al.*, 2018; Tomsa *et al.*, 2019).

Existen dos tipos de defensas antioxidantes, las enzimáticas y las no enzimáticas. La primera de ellas consta, en mayor parte, de una enzima con un metal de transición en su núcleo capaz de brindar electrones y así reducir los radicales libres con la unión de un átomo de hidrógeno, algunas de las enzimas más comunes que participan en la reducción de las ERO son: glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, glutatión S-transferasa, catalasa y superóxido dismutasa. Por otro lado, las defensas no enzimáticas son compuestos que reducen los radicales libres a partir de su estructura química, como el ascorbato (vitamina C) y el tocoferol (vitamina E) (Burton y Jauniaux, 2011).

2. Justificación

Los modelos experimentales *in vivo* de insuficiencia renal en ratas dan lugar a diferentes mecanismos específicos que provocan alteraciones en la célula. El modelo de AF genera daño principalmente en los túbulos renales y el estrés oxidante, disfunción mitocondrial, inflamación y fibrosis son mecanismos ampliamente descritos en este modelo. Por otro lado, en el modelo de CP el daño se genera principalmente en el túbulo proximal y el estrés oxidante, la disfunción mitocondrial, la apoptosis y el estrés de RE son alteraciones ya reportadas anteriormente para este modelo.

Ambos modelos de daño renal generan estrés oxidante, el cual tiene un papel fundamental en el desarrollo de la IRA, además, forma un ciclo de daño con el estrés de RE. Este último mecanismo ha generado interés en los últimos años debido a su relación con el estrés oxidante y a que puede promover la supervivencia o muerte celular. Sin embargo, el estrés de RE y la UPR han sido estudiados muy poco en varios modelos de IRA, particularmente en el modelo de AF y en el modelo de CP. El estudio y la comprensión de los mecanismos de daño involucrados en cada uno de los modelos, podrá proporcionar otros enfoques en la búsqueda y desarrollo de estrategias para prevenir o retardar el desarrollo de la IRA

3. Hipótesis

La administración de ácido fólico en dosis elevadas o de cisplatino inducen IRA al dañar los túbulos renales, esto puede causar estrés de RE y, siendo que cada modelo tiene mecanismos diferentes, se activarán de manera diferencial las vías involucradas en la UPR.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Evaluar la lesión renal por los niveles de sCr y BUN, el estrés oxidante a partir de la actividad enzimática de GR, CAT y GST; y el estrés de RE en la IRA inducida por AF o CP en ratas para analizar y relacionar algunos de los mecanismos de daño en los dos modelos experimentales.

4.2 Objetivos específicos

En el modelo de IRA inducida por AF evaluar y relacionar:

1. Los marcadores de daño renal: sCr y BUN.
2. La expresión de algunas proteínas involucradas en la UPR como marcadores de estrés de RE: GRP78, GRP94 y ATF4.
3. La expresión relativa de los ARNm de la UPR: GRP78, GRP94 PERK, ATF4, CHOP, IRE1 α y XBP1.
4. Las enzimas antioxidantes como marcadores de estrés oxidante: GR, CAT y GST.
5. Analizar las correlaciones entre el estrés del RE y la lesión renal, el estrés oxidante y la lesión renal, y el estrés del RE y oxidante.

En el modelo de IRA inducida por CP analizar y relacionar:

1. Los datos de los marcadores de daño renal: sCr y BUN
2. Los marcadores de estrés de RE: ARNm de GRP78, PERK, ATF4, CHOP, IRE1 α y XBP1.
3. Los datos de las enzimas GR, CAT y GST como marcadores de estrés oxidante.
4. Las correlaciones entre estrés de RE y lesión renal, estrés oxidante y lesión renal, y estrés de RE y estrés oxidante.

5. Diseño experimental

Los modelos de daño renal se realizaron en el año 2019 por el grupo de trabajo del laboratorio 315 de la Facultad de Química de la UNAM. Debido a la pandemia, se utilizaron algunos resultados y tejidos congelados que se obtuvieron previamente.

Para el modelo de ácido fólico se utilizaron las muestras extraídas por el Dr. Omar Emiliano Aparicio-Trejo parte del equipo de trabajo en la Facultad de Química de la UNAM.

El protocolo experimental fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química, UNAM (FQ/CICUAL/332/18); se llevó a cabo de acuerdo con las directrices de la Norma Oficial Mexicana para el uso y cuidado de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

Se utilizaron ratas macho Wistar con un peso inicial de 250 a 300 g y se dividieron en dos grupos experimentales:

- **Control (n=3):** Administración de una solución de NaHCO_3 300 mM vía intraperitoneal (i.p).
- **Ácido fólico (AF, n=3):** Tratados una dosis de ácido fólico (300 mg/kg, i.p.).

Los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (60 mg/kg, i.p) 24 h después de la administración para obtener la sangre y remover ambos riñones. El riñón izquierdo se almacenó a $-70\text{ }^\circ\text{C}$ para el posterior análisis de los marcadores de estrés de RE por Western blot, PCR y la actividad de las enzimas antioxidantes (Gallegos-Sánchez, 2019).

Para el modelo de CP se utilizaron los datos provistos por la Dra. Tania Gómez Sierra, alumna de doctorado de Ciencias Biológicas y miembro del mismo laboratorio.

Se utilizaron ratas macho Wistar con un peso inicial de 200 a 220 g. Durante el estudio los animales se mantuvieron en condiciones controladas de luz/oscuridad (12 h x 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 dos grupos experimentales:

- **Control (n=3):** administración de una mezcla de solución salina isotónica 0.95% (vehículo, i.p) durante 3 días.
- **Cisplatino (CP, n=3):** dosis única del cisplatino (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.

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 (Gómez-Sierra, 2022)

6. Métodos

6.1 Evaluación de marcadores de lesión renal

6.1.1 Lista de reactivos

Los siguientes reactivos: albúmina sérica bovina, dodecil sulfato de sodio (SDS), pirofosfato de sodio, ortovanadato de sodio, ácido sulfosalicílico, trietanolamina, tris-clorhidrato, azul de tripano, tritón X-100, tween 20, el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) cat (372.25), así como el anticuerpo anti-GRP94 (cat. G4420) fueron adquiridos de Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). La sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético, el fosfato dipotásico, 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). Los anticuerpos anti-GRP78 (cat. SC-3768) y anti-ATF4 (cat. SC-200) se adquirieron de Santa Cruz Biotechnology Inc. (Dallas, TX, USA). Los anticuerpos secundarios fluorescentes anti-conejo 800CW y anti-ratón 680RD fueron de LI-COR Biosciences (Lincoln, NE, USA). El SYBR Green Master Mix se adquirió de Bio-Rad (cat. L001893) Los oligonucleótidos fueron de T4OLIGO (Guanajuato, México). Los demás reactivos utilizados fueron de calidad analítica y estaban disponibles comercialmente.

6.1.2 Creatinina sérica (sCr)

La determinación de los niveles de creatinina se realizó por el ensayo colorimétrico basado en el ensayo de Jaffé que consiste en la reacción de la creatinina con el picrato alcalino que forma un complejo rojizo y la intensidad de color formado es proporcional a la concentración de creatinina en la muestra (Slot, 1965).

La absorbancia se mide a 492 nm y los resultados se expresaron como mg creatinina/dL.

6.1.3 Nitrógeno ureico en sangre (BUN)

El BUN se determinó empleando un estuche comercial (Spin react). La urea presente en la muestra reacciona con *o*-ftalaldehído en un medio ácido dando como resultado Isoindolina, compuesto que se puede medir espectrofotométricamente a 510 nm. Los resultados se expresaron en mg/dL.

6.2 Evaluación del estrés de RE

6.2.1 Determinación de la expresión de proteínas por western blot.

Para la extracción de proteínas se utilizaron 100 mg de riñón de las rata de cada uno de los grupos experimentales. La extracción de proteínas totales se realizó a partir de las muestras resuspendidas en amortiguador de radioinmunoprecipitación (RIPA) que contiene Tris-HCl 40 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, EGTA 1 mM, NaF 5 mM, Na₃O₄ 1mM, PMSF 1 mM, desoxicolato de sodio al 0.5%, SDS al 0.1% pH 7.6 y la mezcla de inhibidores de proteasas. Una vez resuspendidas las muestras, se homogenizaron con un Potter-Elvehjem y posteriormente se centrifugó a 1000 rpm por 5 min a 4 °C. El sobrenadante se sonicó y posteriormente se centrifugaron a 15000 rpm por 20 min. El sobrenadante se almacenó a -70 °C para su posterior análisis. Las proteínas totales se cuantificaron por el método de Bradford (Kruger, 2009).

El sobrenadante obtenido en la extracción de proteínas se mezcló con amortiguador Laemmli 2x que contiene Tris-HCl 60 mM, dodecil sulfato sódico (SDS) al 2%, glicerol al 10%, β-mercaptoetanol al 5% y azul de bromofenol al 0.01% pH 6.8 en proporción (1:1). Las muestras se desnaturalizaron a 90 °C durante 7 min. Posteriormente se colocaron en hielo durante 5 min y finalmente se almacenaron a -70°C hasta su análisis. El análisis proteico por Western blot se realizó por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida.

Una vez terminada la electroforesis, los geles se sobrepusieron en membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) para transferir las proteínas por el método de transferencia húmeda. La unión a proteínas no específicas se bloqueó con leche en polvo descremada al 5% en amortiguador TBST (Tween 20 al 0.4%) durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se incubaron toda la noche a 4° C con el anticuerpo primario apropiado (GRP78, SC-376768 ratón; GRP94, G4420 conejo; ATF4 SC-200 conejo) a una dilución de 1:1,000. Al término del tiempo de incubación se colocó el anticuerpo secundario fluorescente correspondiente (1:10,000) (Kim, 2017). Las proteínas de interés se detectaron con el fotodocumentador Odyssey (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, EUA). El análisis de la imagen se realizó con el Software Image Studio™ Lite LI-COR Odyssey (LI-COR Biosciences) version 5.2.

6.2.2 Expresión génica evaluado por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Extracción de ARN. Se utilizaron 100 mg de tejido, nitrógeno líquido para facilitar su homogeneización y 1 mL de TRIzol®. Una vez generados los homogenados en mortero, se vertieron en tubos eppendorf y se dejaron reposar 5 minutos a temperatura ambiente. Después se agregaron 200 µL de cloroformo para separar las fases y se dejaron 3 minutos a temperatura ambiente para después centrifugarlos a 12000 rpm por 15 min. a 4 °C. Una vez separadas las fases, se tomó la fase acuosa con micropipeta. A estos tubos se les agregó 500 µL de isopropanol dejando los tubos a 4 °C por 10 minutos para precipitar las muestras, transcurridos los 10 minutos, las muestras se centrifugaron a 12000 rpm por 10 min a 4 °C. El sobrenadante se retiró con micropipeta, a la pastilla se le agregó 1 mL de etanol al 75% y se agitaron los tubos en vortex hasta homogenizar. Después se centrifugaron los tubos a 7500 rpm por 5 min. a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se dejaron los tubos abiertos hasta que el etanol se evaporara por completo. Por último, se agregaron 50 µL de agua miliQ y el ARN se cuantificó en el take 3 EPOCH (BioTek Instruments, Inc) utilizando 2 µL de cada muestra. Para determinar la

integridad del ARN se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, 25 mL de amortiguador de tris, acetato y EDTA (TAE) y 2.5 µL de bromuro de etidio. La electroforesis se realizó a 80 V por 40 min y el gel se visualizó posteriormente en un transiluminador.

Retrotranscripción. Se realizó la síntesis de ADNc de acuerdo con la cuantificación de las muestras, se generaron alcuotas con una concentración de 500 ng/50 µL y posteriormente se tomó una alícuota de 4 µL de muestra y se adicionó 1 µL amortiguador DNasa 10X, 1 µL DNasa I Amp Grade y 4 µL de agua miliQ. Los tubos fueron incubados 15 minutos a temperatura ambiente.

Después se inactivó la DNasa añadiendo 1 mL de EDTA 25 mM y se incubó a 65 °C por 10 min. Transcurrido el tiempo, se les añadió a los tubos: 0.5 µL de primers aleatorios, 5.5 µL de las muestras de ARN, 1 µL de DNTPs y 5 µL de agua miliQ. Se incubaron a 65 °C por 5 minutos y posteriormente a los tubos se les añadió 4 µL de amortiguador 5X de primer hebra y 2 µL de DTT 0.1 M, se homogeneizaron por pipeteo y se incubaron a 37 °C por 2 min.

Por último, se agregó 1 µL de transcriptasa reversa (M-MLV-RT), se homogeneizó por pipeteo, se incubaron a 25 °C por 10 min, luego a 37 °C por 50 min. y finalmente a 70 °C por 15 min. El ADNc generado se almacenó a -70 °C hasta su análisis.

PCR en tiempo real. Bio-Rad CFX96. Se utilizó la sonda fluorescente SYBR green master mix (Bio-Rad, Chicago, USA). Las secuencias de oligonucleótidos usados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos con su temperatura óptima de alineación.

Gen objetivo	Secuencia (5'-3')	Temperatura de alineación (°C)
GAPDH	F: CACTGAGCATCTCCCTCACAA R: TGGTATTCGAGAGAAGGGAGG	55
GRP78	F: TAACAATCAAGGTCTACGAAGG R: CCATTCACATCTATCTCAAAGGT	51
GRP94	F: AAACGGCAACTCTTCGGTCA R: TTAAGCTGAGGCGGAGCATC	51

ATF4	F: AAGGCAGATTCTCTCGCCAA R: TTCTTCCCCCTTGCCTTACG	60
PERK	F: TCGGATACGGCATTGGCTT R: AGTGCGGCAATTCGTCCAT	53
CHOP	F: GAGAGAAACCGGTCCAA R: GGACACTGTCTCAAAGGCGA	51
XBP1	F: CCACTTGGTACAGACCACTCC R: AGACACTAATCAGCTGGGGG	51
IRE1 α	F: GCTGTGGAGACCCTACGCTAT R: GGCATAGAGGCTGGTGGAGTA	55

GAPDH: gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, GRP78: proteína regulada con glucosa de 78 kDa, GRP94: proteína regulada con glucosa de 94 kDa, PERK: cinasa del RE activada por ARN de doble cadena, ATF4: activador del factor de transcripción 4, CHOP: CCAAT/ potenciador de la proteína de unión a proteína homologa, IRE1 α : proteína cinasa 1 alfa que requiere inositol, XBP1: proteína de unión a la caja X del factor de transcripción 1.

Por pozo se adicionó 1 μ L de ADNc, 5 μ l de SYBR green, 2 μ l de agua miliQ y 2 μ l de oligonucleotidos.

El protocolo que se siguió fue el siguiente:

- 1.- 95 °C 1 min.
- 2.- 95 °C 30 seg.
- 3.- Gradiente de temperaturas (62 a 51 °C) 30 seg.
- 4.- 72 °C 30 seg.
- 5.- Repetición desde el paso 2 (39 veces)
- 6.- 72 °C 3 min.
- 7.- 4 °C 5 min.

Siedo a 95 °C la desnaturalización del DNA, de 62 a 51 °C el alineamiento de los primers y a 72 °C la elongación de las cadenas de DNA. Todos los experimetos se hicieron por triplicado.

6.3 Evaluación de estrés oxidante

6.3.1 Enzimas antioxidantes

Glutación reductasa (GR) es la responsable de la reducción de GSSG a GSH utilizando NADPH como agente reductor. Este ensayo se determina midiendo la desaparición de NADPH a 340 nm. Los resultados se expresan como U/mg proteína (U equivale a un μmol de NADPH oxidado por minuto) (Carlberg y Mannervik, 1975).

Catalasa (CAT) dismuta el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en moléculas de agua. La actividad de esta enzima se determina por la concentración de H_2O_2 a 240 nm por 30s. Se usa la constante de reacción de primer orden (k) como unidad de la actividad enzimática. Los resultados se expresan como k/mg de proteína (Aebi, 1984)

Glutación S-transferasa (GST) conjuga al GSH con el 1-cloro-2,4-dinitrobenceno. Este conjugado puede ser medido espectrofotométricamente a 340 nm. La actividad de la enzima se expresa como U/mg proteína (U equivale a la cantidad de 1-cloro-2,4-dinitrobenceno conjugado expresado en nmol por minuto) (Habig *et al.*, 1974).

6.4 Análisis estadístico

Los datos se presentaron como valores promedio \pm error estándar de la media (EEM). El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism 8 (San Diego, CA, EUA). Primero se hizo la prueba Shapiro-Wilk para conocer si los datos fueron normales o no, si fueron normales se hizo un ensayo de T-student comparando las medias a través de un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de una prueba de comparación múltiple. El valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. Si los datos fueron no normales se hizo la prueba de Kruskal-Wallis, seguido de una prueba de comparación múltiple de Dunn.

Los resultados también se analizaron con una prueba de correlación. El coeficiente con valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

7. Resultados

7.1 Modelo de IRA inducido por AF.

7.1.1 Marcadores de daño renal.

En primer lugar, se buscó confirmar la inducción de IRA y para ello se midieron los niveles de sCr y BUN como marcadores de lesión renal.

Se observó que ambos marcadores aumentaron significativamente, lo que indica la presencia de una lesión renal provocada por la administración de una sobredosis de ácido fólico (Figura 5).

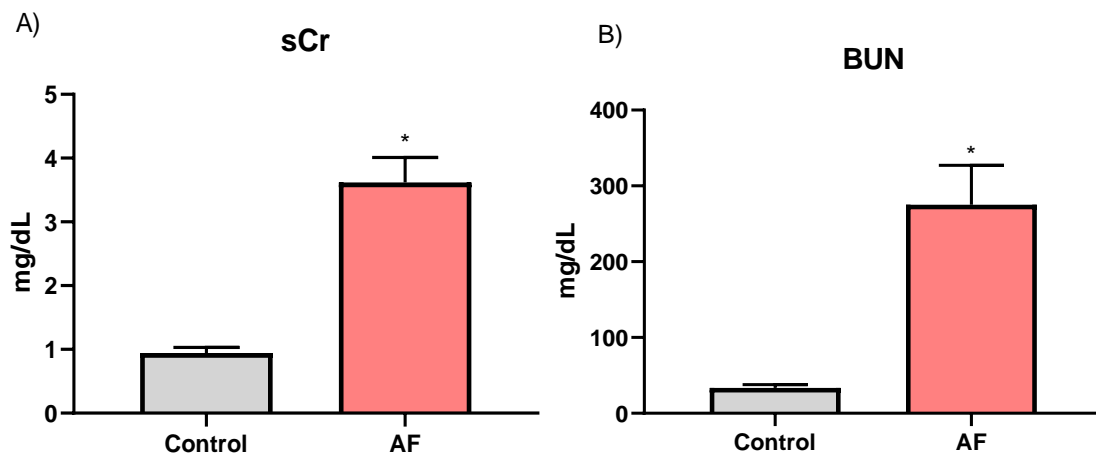


Figura 5. Marcadores de daño renal A) creatinina sérica (sCr) y B) Nitrógeno Ureico en sangre (BUN). Datos promedio \pm EEM, $n=3$ ratas. * $p<0.05$ vs C. C: control, AF: ácido fólico, sCr: creatinina sérica, BUN: nitrógeno ureico en sangre.

Se observó que la sCr aumentó en un %% y BUN aumentó en un %, ya que se encontró un aumento significativo, se analizaron los marcadores de estrés de RE como siguiente paso.

7.1.2 Marcadores de estrés de retículo endoplásmico.

Una vez confirmada la lesión renal, se realizó la evaluación de los marcadores de estrés de RE, GRP78, GRP94 y ATF4 por western blot. En el grupo tratado con AF, no se observaron cambios en la expresión proteica de GRP78, sin embargo, GRP94 presentó un aumento significativo del doble de su expresión. Por otro lado, ATF4 que está aguas debajo de la vía de PERK presentó una disminución significativa de casi la mitad de su expresión (Figura 6).

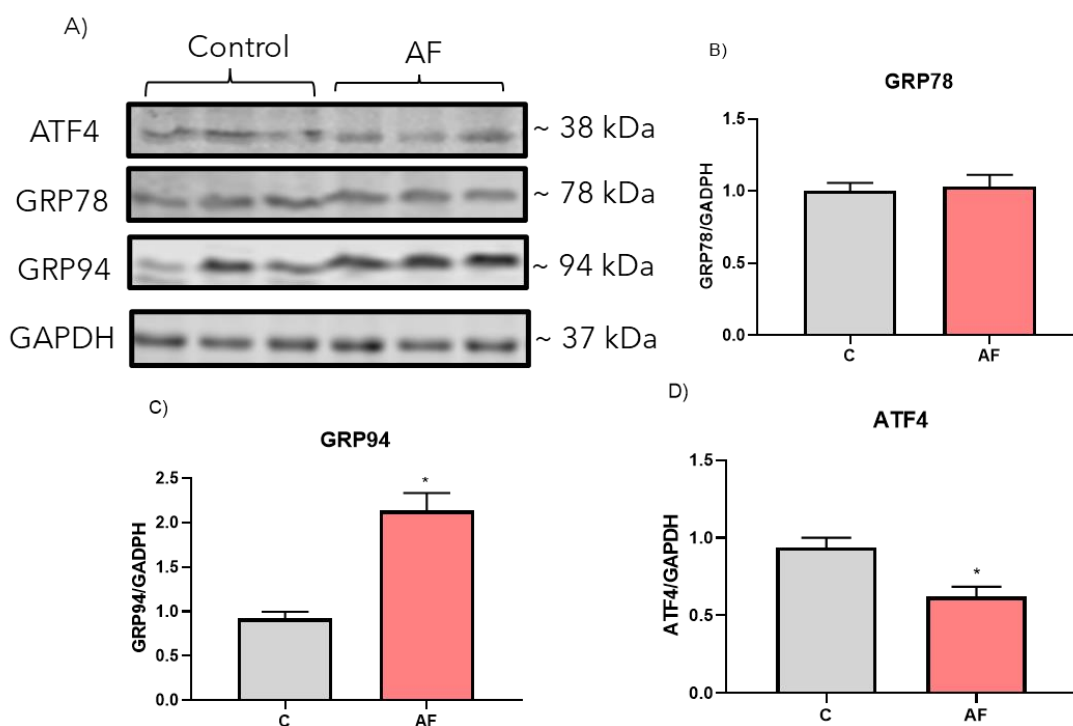


Figura 6. Abundancia de marcadores de estrés de retículo endoplásmico (RE) en el modelo de ácido fólico (AF). Datos promedio \pm EEM $n=3$ ratas. A) ATF4, GRP78, GRP94 y como control de carga GAPDH, B) densitometría de GRP78, C) densitometría de GRP94 y D) densitometría de ATF4. * $P<0.05$ vs C. C: control; AF: ácido fólico; kDa: kilo dalton, RE: retículo endoplásmico, GAPDH: gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, GRP78: proteína regulada con glucosa de 78 kDa, GRP94: proteína regulada con glucosa de 94 kDa, ATF4: activador del factor de transcripción 4, EEM: error estándar.

Para seguir investigando sobre la vía de la UPR en el estrés del RE, se midió la expresión de los ARNm de GRP78, GRP94, PERK, ATF4, CHOP, IRE1 α y XBP1 por PCR.

Se observó una disminución del transcrito de GRP78 y del factor pro apoptótico CHOP, aunque no logró ser significativo (0.3818 y 0.4334 respectivamente). En cuanto a los demás marcadores no se observó un cambio en su expresión relativa (Figura 7).

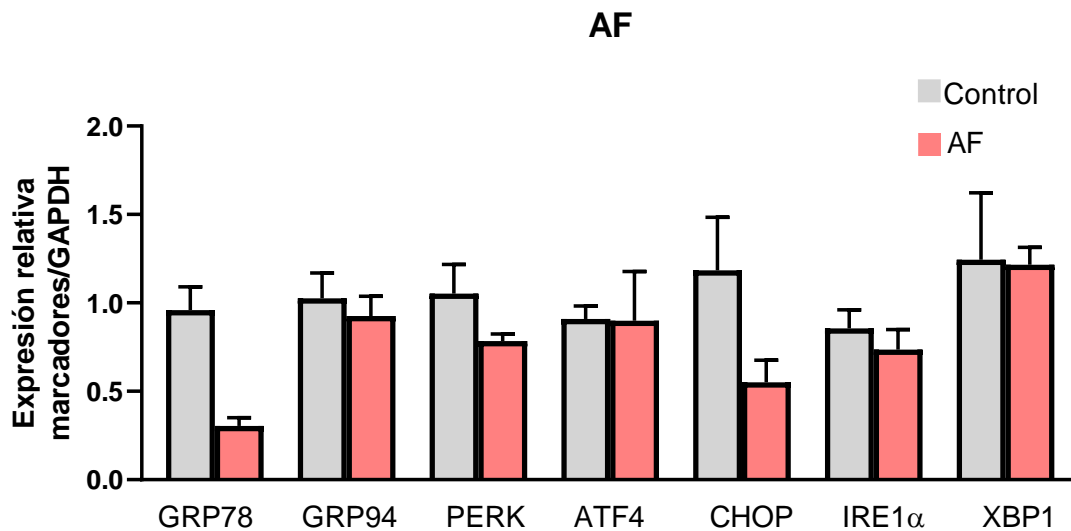
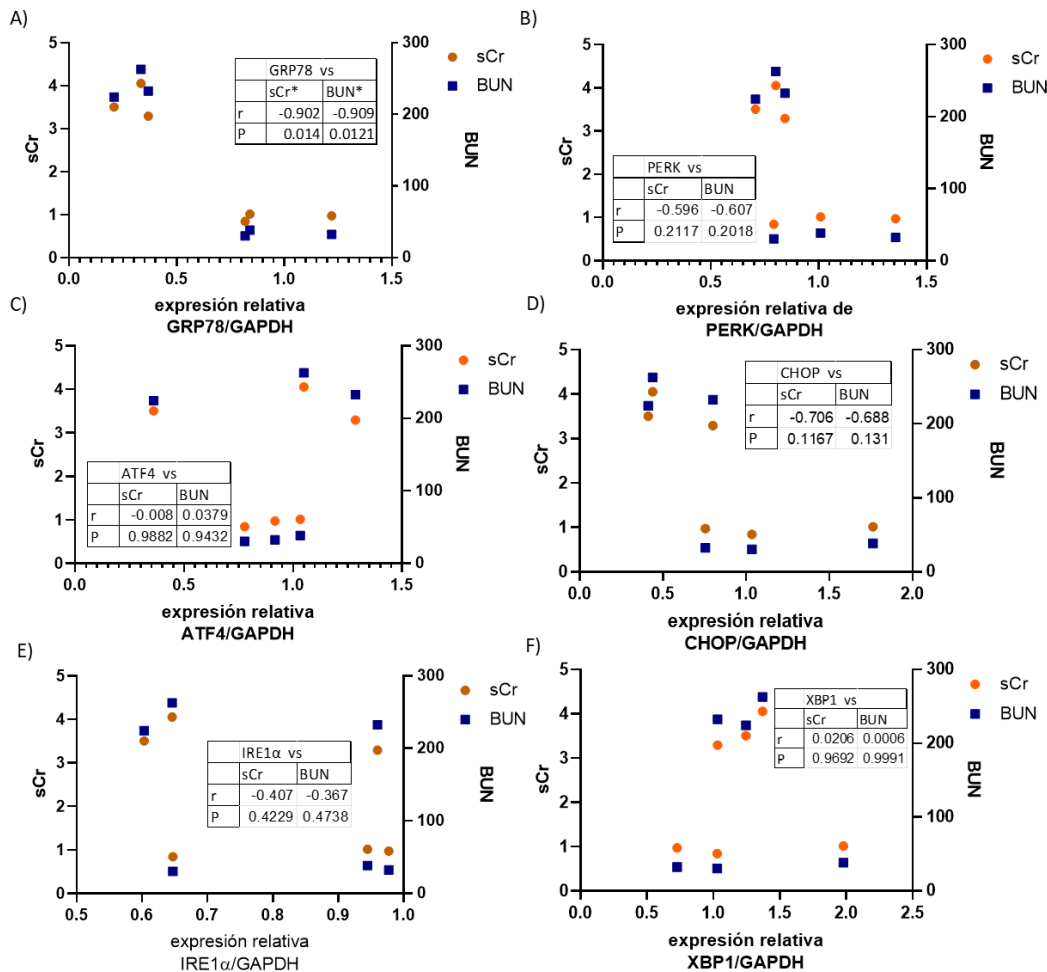


Figura 7. Cambio de la expresión relativa de ARNm de los marcadores de estrés de RE normalizados con GAPDH en el modelo de AF. Datos promedio \pm EEM, n=3 ratas. * P<0.05 vs C. C: control; AF: ácido fólico, RE: retículo endoplásmico, GAPDH: gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, GRP78: proteína regulada con glucosa de 78 kDa, GRP94: proteína regulada con glucosa de 94 kDa, PERK: cinasa del RE activada por ARN de doble cadena, ATF4: activador del factor de transcripción 4, CHOP: CCAAT/ potenciador de la proteína de unión a proteína homóloga, IRE1 α : proteína cinasa 1 alfa que requiere inositol, XBP1: proteína de unión a la caja X del factor de transcripción 1.

7.1.3 Correlaciones entre daño renal y estrés de RE.

Una vez que se midieron los marcadores de daño renal y de estrés de RE, se hizo un análisis de correlación para ver si la expresión de los marcadores de estrés de RE se relaciona con el daño renal existente.

No se observaron correlaciones significativas a excepción de GRP78 que tuvo una correlación negativa con respecto al daño renal, es decir, a mayores niveles de los marcadores de daño renal, la expresión relativa del ARNm de GRP78 fue menor. (Figura 8).



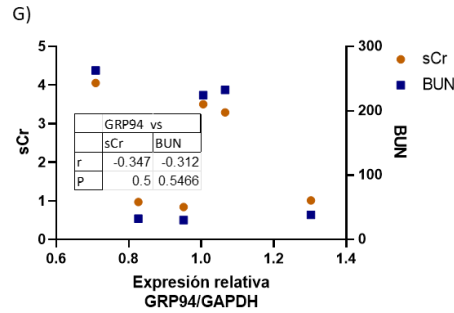


Figura 8. Análisis de correlación entre el daño renal y los marcadores de estrés de RE en el modelo de AF. GRP78 presentó una correlación negativa significativa con sCr y BUN. A) Correlación entre GRP78 y marcadores de lesión renal, B) Correlación entre PERK y marcadores de lesión renal, C) Correlación entre ATF4 y marcadores de lesión renal, D) Correlación de CHOP y marcadores de lesión renal, E) Correlación de IRE1 α y marcadores de lesión renal, F) Correlación de XBP1 y marcadores de lesión renal, G) Correlación de GRP94 y marcadores de lesión renal. n=3 ratas *P<0.05 vs C. sCr: creatinina sérica, BUN: nitrógeno ureico en sangre, GAPDH: gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, GRP78: proteína regulada con glucosa de 78 kDa, GRP94: proteína regulada con glucosa de 94 kDa, PERK: cinasa del RE activada por ARN de doble cadena, ATF4: activador del factor de transcripción 4, CHOP: CCAAT/ potenciador de la proteína de unión a proteína homóloga, IRE1 α : proteína cinasa 1 alfa que requiere inositol, XBP1: proteína de unión a la caja X del factor de transcripción 1.

Después de analizar los marcadores de estrés de RE, se analizaron los marcadores de estrés oxidante.

7.1.4 Marcadores de estrés oxidante.

Se ha descrito que el estrés oxidante tiene un papel importante en la IRA inducida por AF. Cuando el estrés oxidante es elevado, los sistemas antioxidantes enzimáticos empiezan a presentar errores, por ello, medimos la actividad de tres enzimas antioxidantes: GR, CAT y GST.

La actividad de las 3 enzimas disminuyó significativamente en el grupo administrado con la sobredosis de AF. Con esto se observa que existe un elevado estrés oxidante en la IRA inducida por el AF (Figura 9).

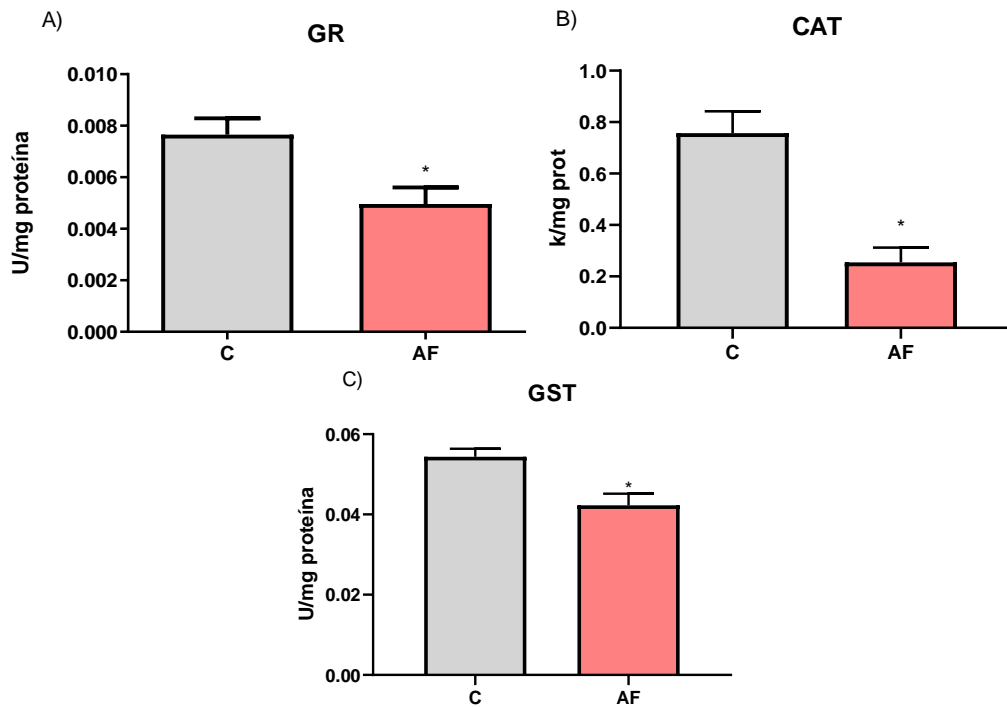


Figura 9. Actividad de las enzimas A) glutatión reductasa (GR), B) catalasa (CAT) y C) glutatión S transferasa (GST). Datos promedio \pm EEM n=3 ratas. *P<0.05 vs C. C: control; AF: ácido fólico.

Al observar el estrés oxidante en este modelo, se prosiguió a analizar la correlación que existe entre éste y el daño renal.

7.1.5 Correlaciones entre daño renal y estrés oxidante.

Se observó una correlación negativa y significativa en el caso de la actividad enzimática de CAT y BUN; entre la actividad enzimática de GST y sCr y BUN. En cuanto a la GR se observa una tendencia a correlacionar con BUN. En los tres casos un mayor daño renal corresponde a una menor actividad de las enzimas antioxidantes (Figura 10).

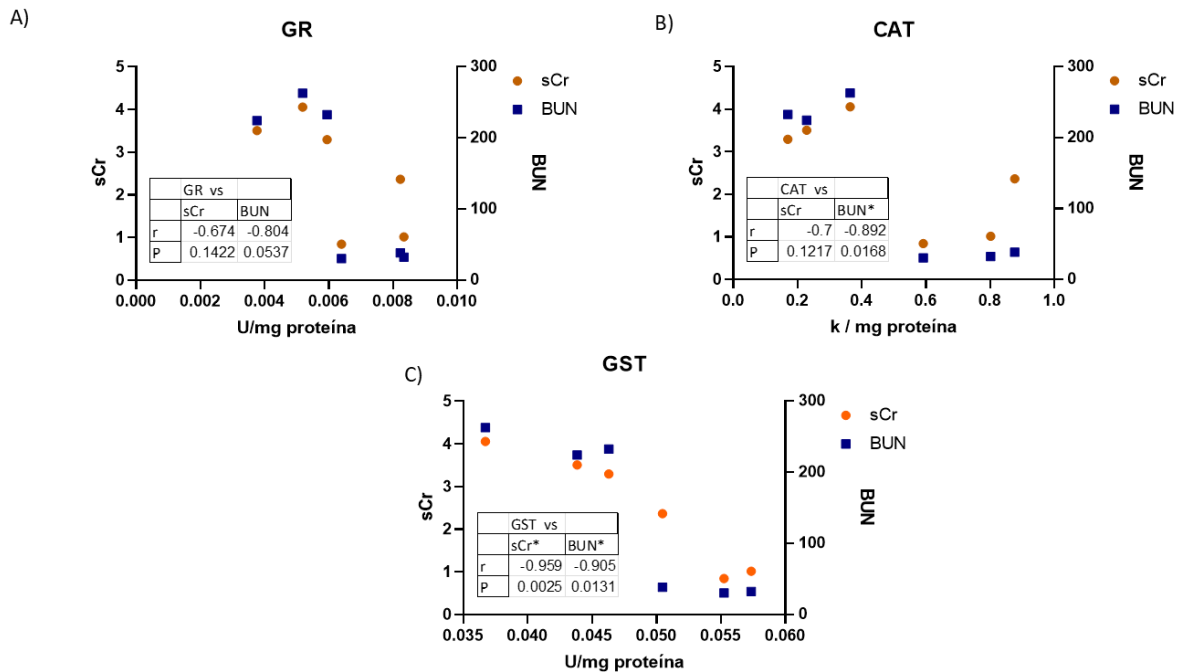


Figura 10. Correlación entre la actividad de las enzimas antioxidantes y los marcadores de daño renal en el modelo de AF, n=3. A) glutatión reductasa (GR), B) catalasa (CAT), C) glutatión S-transferasa (GST). *P<0.05. sCr: creatinina sérica, BUN nitrógeno ureico en sangre.

Estas enzimas son importantes en la dismutación del H₂O₂ y en la regeneración del GSH, la cual es una molécula reductora de suma importancia en el metabolismo de los seres vivos. El GSH es uno de los reductores que en mayor concentración se encuentra en la célula.

7.1.6 Correlaciones entre estrés de retículo endoplásmico y estrés oxidante.

Por último, se analizó la relación que existe entre la abundancia de los ARNm de las proteínas involucradas en el estrés de RE (GRP78, GRP94, PERK, ATF4, CHOP, IRE1 α y XBP1) y la actividad antioxidante de las enzimas GR, CAT y GST.

Se observó una correlación significativa entre GRP78 y las tres enzimas antioxidantes, y entre PERK y la actividad enzimática de GR. En los tres análisis se observó la misma tendencia: cuando existe una menor actividad de las enzimas

antioxidantes la abundancia relativa de los marcadores de estrés de RE también disminuye (Figura 11).

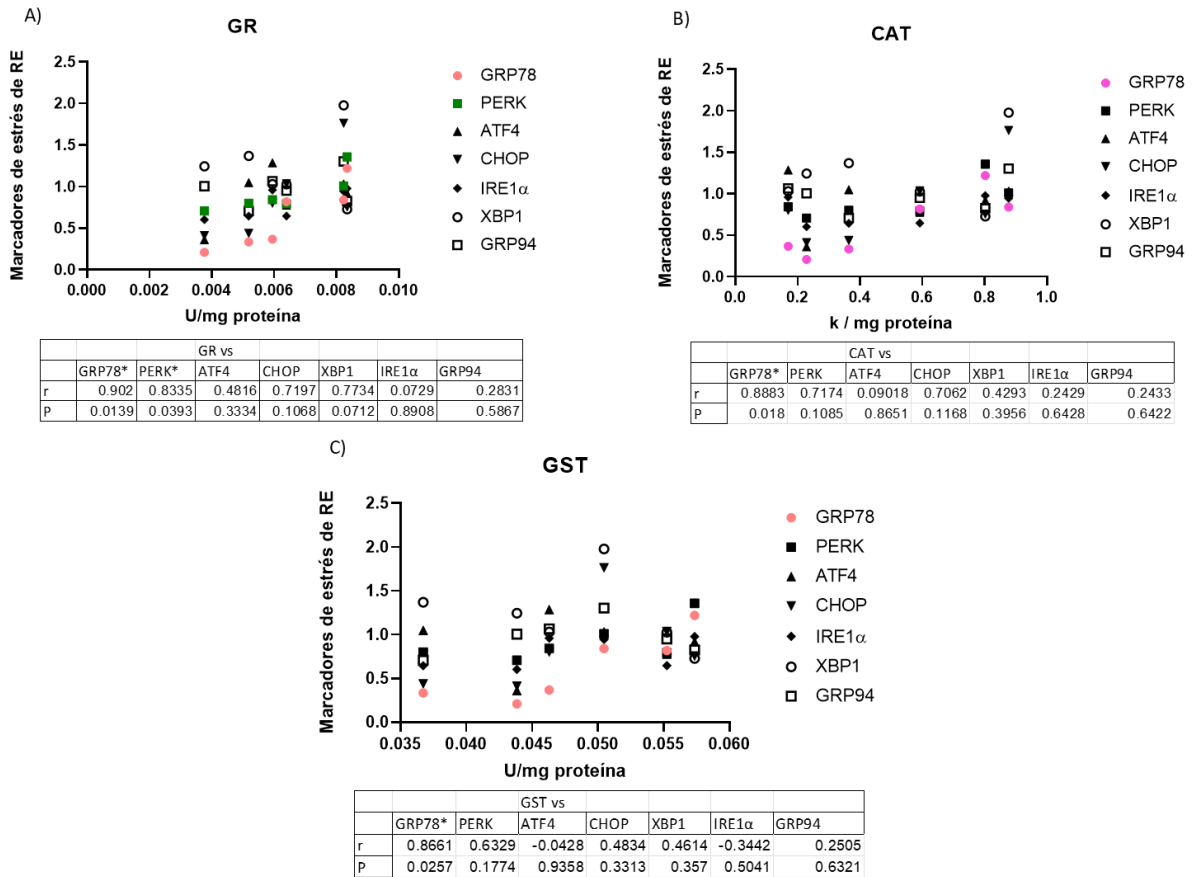


Figura 11. Correlación entre la actividad de las enzimas antioxidantes y los marcadores de estrés de RE en el modelo de AF, n=3. A) glutatión reductasa (GR), B) catalasa (CAT) y C) glutatión S-transferasa (GST). *P<0.05. sCr: creatinina sérica, BUN nitrógeno ureico en sangre.

7.2 IRA inducida por CP

7.2.1 Marcadores de daño renal

Se hizo la medición de los niveles de sCr y BUN como marcadores de daño renal también en el modelo de CP. Se observó un aumento significativo de ambos

marcadores en el grupo administrado con cisplatino, lo que nos indica la existencia de IRA en estos grupos (Figura 12).

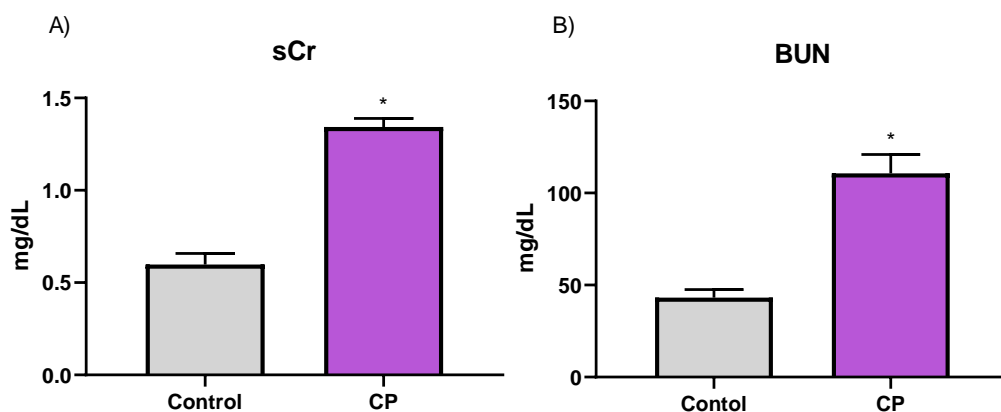


Figura 12. Niveles de A) creatinina sérica (sCr) y B) Nitrógeno Ureico en sangre (BUN). Datos promedio \pm EEM, n=3 ratas. * $p < 0.05$ vs C. C: control, CP: cisplatino, sCr: creatinina sérica, BUN: nitrógeno ureico en sangre.

7.2.2 Marcadores de estrés de retículo endoplásmico.

Después de que se comprobó la IRA, se midió la expresión relativa de los ARNm de GRP78, PERK, ATF4, CHOP, IRE1 α y XBP1 por PCR como marcadores de estrés de RE (Figura 14).

La expresión de todos los marcadores aumentó en el grupo de CP siendo sólo GRP78 y CHOP significativos.

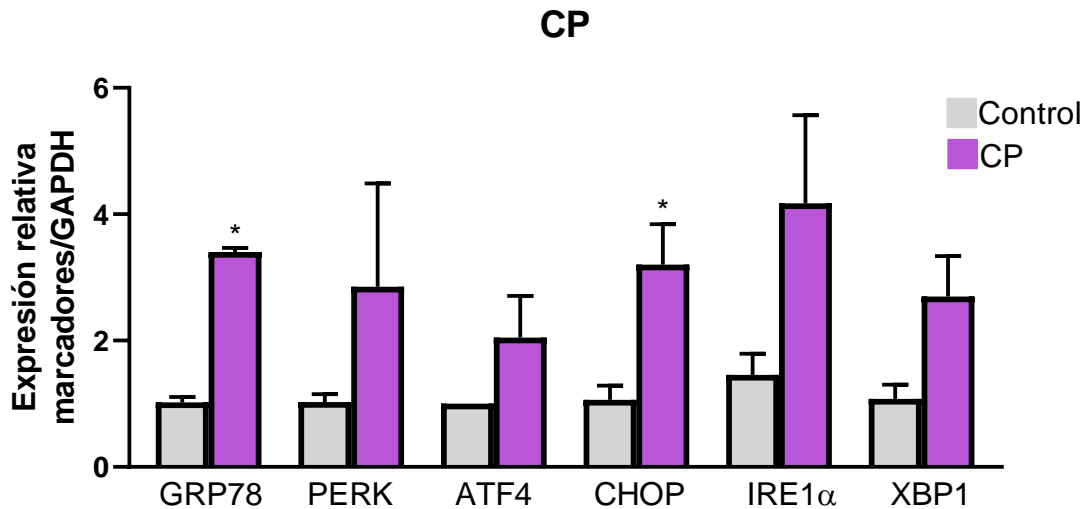


Figura 13. Cambio de la expresión relativa del ARNm de los marcadores de estrés de RE normalizados con GAPDH en el modelo de cisplatino (CP). Datos promedio \pm EEM, n=3 ratas. *P<0.05 vs C. C: control; CP: cisplatino, RE: retículo endoplásmico GAPDH: gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, GRP78: proteína regulada con glucosa de 78 kDa, PERK: cinasa del RE activada por ARN de doble cadena, ATF4: activador del factor de transcripción 4, CHOP: CCAAT/ potenciador de la proteína de unión a proteína homóloga, IRE1 α : proteína cinasa 1 alfa que requiere inositol, XBP1: proteína de unión a la caja X del factor de transcripción 1.

7.2.3 Correlaciones entre daño renal y estrés de retículo endoplásmico.

Después que se midieron los marcadores de daño renal y de estrés de RE, se hizo un análisis de correlación entre ellos,

Se observó una correlación significativa entre la expresión relativa de los ARNm de GRP78 y CHOP y los marcadores de daño renal. Sin embargo, se observa esta misma tendencia, aunque no significativa, en los demás marcadores, a mayor daño renal, mayor expresión de los ARNm involucrados en el estrés de RE (Figura 15).

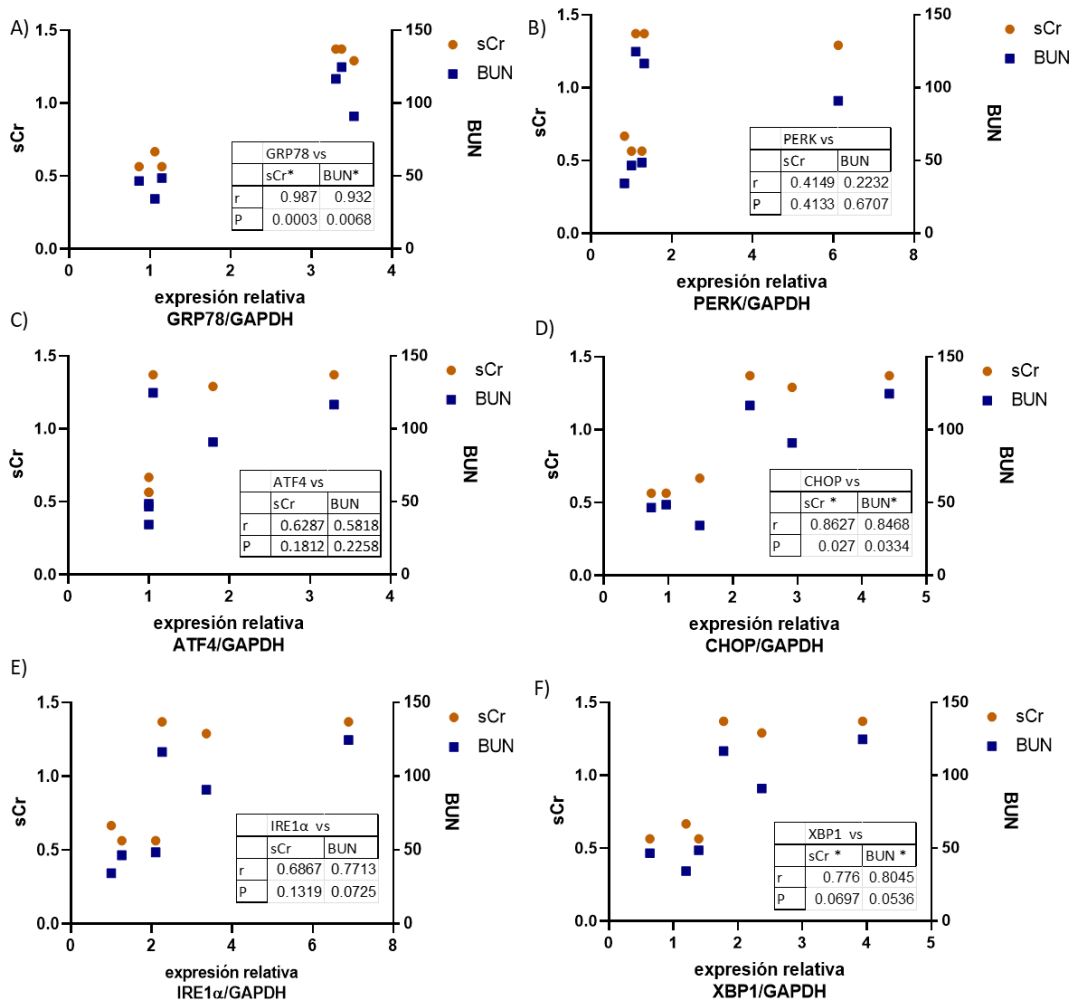


Figura 14. Análisis de correlación entre el daño renal y los marcadores de estrés de RE en el modelo de CP. Correlación positiva en los ARNm de GRP78, CHOP y XBP1. A) Correlación entre GRP78 y marcadores de lesión renal, B) Correlación entre PERK y marcadores de lesión renal, C) Correlación entre ATF4 y marcadores de lesión renal, D) Correlación de CHOP y marcadores de lesión renal, E) Correlación de IRE1 α y marcadores de lesión renal, F) Correlación de XBP1 y marcadores de lesión renal, G) Correlación de GRP94 y marcadores de lesión renal. * $P < 0.05$ vs C. sCr: creatinina sérica, BUN: nitrógeno ureico en sangre, GAPDH: gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, GRP78: proteína regulada con glucosa de 78 kDa, PERK: cinasa del RE activada por ARN de doble cadena, ATF4: activador del factor de transcripción 4, CHOP: CCAAT/ potenciador de la proteína de unión a proteína homóloga, IRE1 α : proteína cinasa 1 alfa que requiere inositol, XBP1: proteína de unión a la caja X del factor de transcripción 1.

7.2.4 Marcadores de estrés oxidante

De igual forma, en el modelo de CP se ha descrito que el estrés oxidante está presente en el desarrollo de la enfermedad. Por ellos se midió la actividad de las enzimas antioxidantes GR, CAT y GST.

En este modelo se observó una disminución significativa en la actividad de las enzimas GR y CAT, mientras que GST no presentó cambios en su actividad después de la administración de CP (Figura 16).

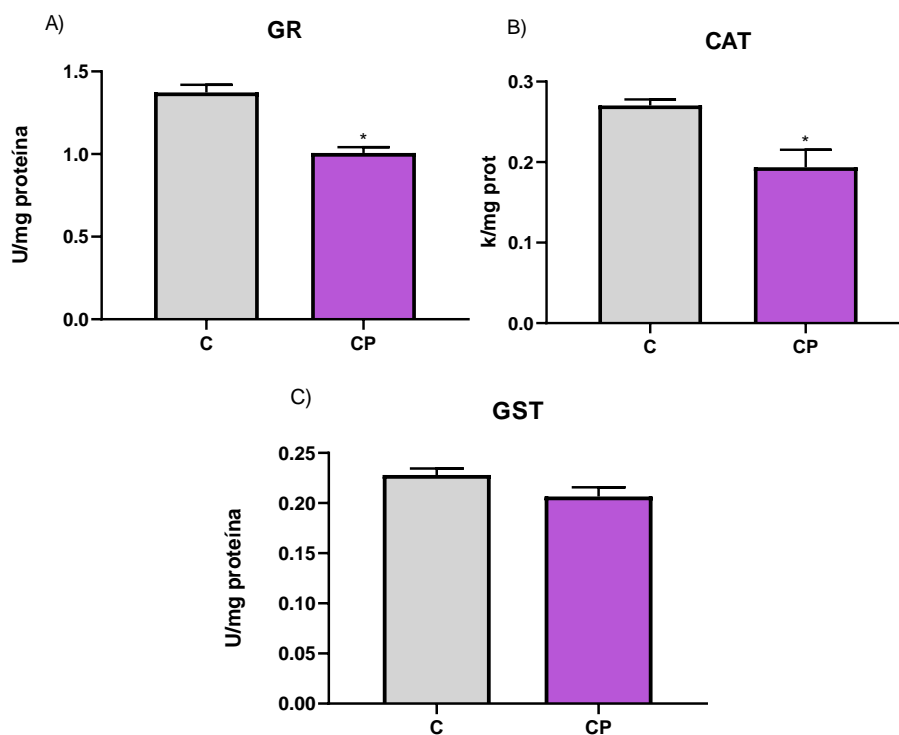


Figura 15. Actividad de la enzima Glutación reductasa (GR), catalasa (CAT) y glutatión S transferasa (GST). Datos promedio \pm EEM, n=3 ratas. *P<0.05 vs C. C: control; CP: cisplatino.

7.2.5 Correlaciones entre el daño renal y el estrés oxidante

Una vez analizada la actividad de las tres enzimas antioxidantes, se hicieron las correlaciones estadísticas para observar la relación que existe entre el daño renal y el estrés oxidante.

Se observó una correlación significativa entre la GR y los marcadores de daño renal (sCr y BUN) y entre la CAT y sCr. Sin embargo, en GST también se observa tendencia, aunque no significativa, de que una menor actividad enzimática corresponde a niveles elevados de sCr y BUN (Figura 17).

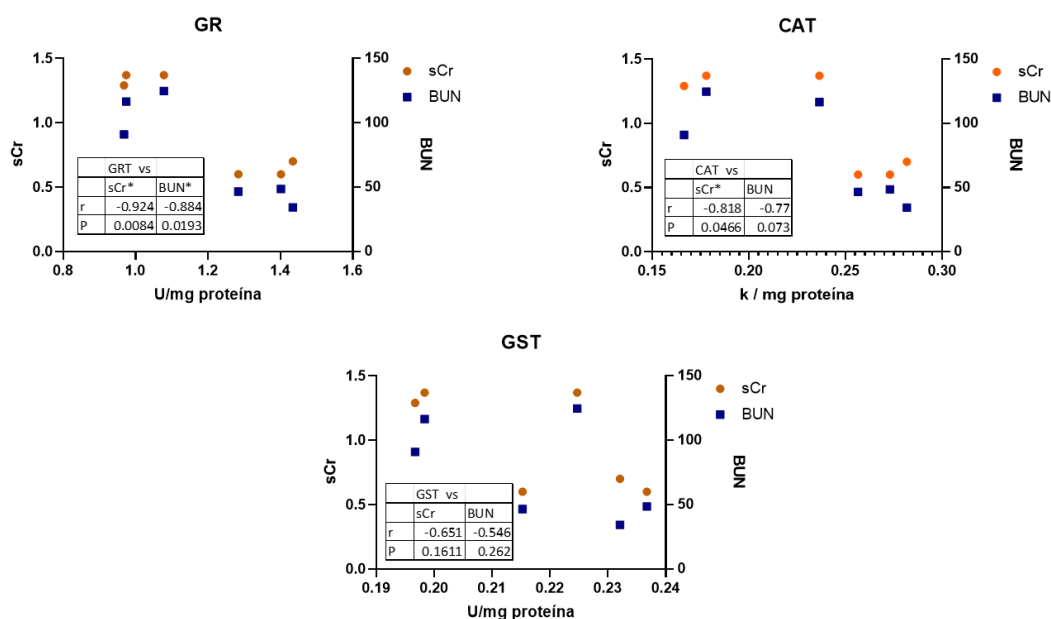


Figura 16. Correlación entre enzimas antioxidantes y marcadores de daño renal en el modelo de CP, n=3. A) glutatión reductasa (GR), B) catalasa (CAT), C) glutatión S-transferasa (GST). *P<0.05. sCr: creatinina sérica, BUN nitrógeno ureico en sangre.

7.2.6 Correlaciones entre estrés de retículo endoplásmico y estrés oxidante

Por último, se hicieron los análisis de correlación entre las enzimas antioxidantes y los marcadores de estrés de RE.

Se observó una correlación significativa entre GRP78 con GR y CAT y CHOP con CAT. Aunque no fue significativo para todos los marcadores, todos ellos muestran la misma tendencia, una menor actividad enzimática corresponde a una mayor expresión de los ARNm de los marcadores de estrés de RE (Figura 18).

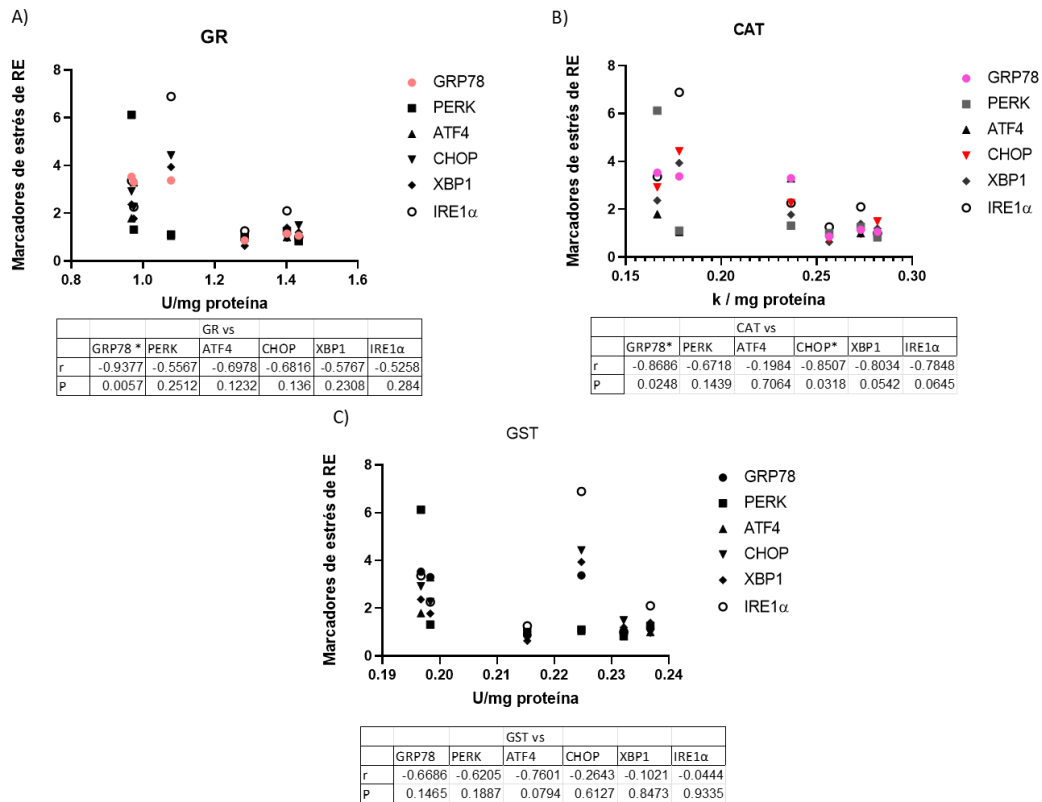


Figura 17. Correlaciones entre enzimas antioxidantes y marcadores de estrés de RE en el modelo de CP, n=3. A) glutatión reductasa (GR), B) catalasa (CAT) y C) glutatión S-transferasa (GST). *P<0.05. sCr: creatinina sérica, BUN nitrógeno ureico en sangre.

8. Resumen de resultados

- En ambos modelos se observaron niveles significativamente elevados de sCr y BUN, lo que confirma la inducción de IRA.
- Los ARNm de GRP78 y CHOP tuvieron una tendencia a la baja en el modelo de AF y un aumento significativo en el modelo de CP.
- La relación existente con los marcadores de lesión renal y el estrés de RE sólo se dio entre la expresión relativa de los transcritos de GRP78, CHOP y XBP1.
- La actividad de las enzimas antioxidantes GR y CAT mostraron una disminución significativa en ambos modelos, mientras que GST sólo disminuyó significativamente en el modelo de AF.
- El estrés oxidante y la lesión renal se correlacionaron de manera significativa para ambos modelos.
- La relación que existe entre el estrés de RE y el estrés oxidante fue significativa sólo entre la expresión relativa de GRP78, PERK y CHOP con la actividad de la CAT y GRP78 con la actividad de la GR.

9. Discusion

El principal objetivo de este trabajo fue evaluar las alteraciones que comprende la IRA en dos modelos diferentes *in vivo* analizando marcadores involucrados en la UPR del estrés de RE y la actividad de algunas enzimas como marcadores de estrés oxidante, ambos clave en la insuficiencia renal.

En primer lugar se identificó la lesión renal en ambos modelos. Se sabe que existen diferentes marcadores que identifican a la IRA (Sirota *et al.*, 2011; Espinoza-Sevilla *et al.*, 2013; Lombi *et al.*, 2016) y los más utilizados en ambos modelos son la concentración de sCr y BUN, ambos de importancia clínica. La producción de creatinina varía poco, sus niveles suelen ser estables y se elimina a través del riñón.

Por otro lado la urea es el resultado final del metabolismo de las proteínas. Cuando hay una insuficiencia renal, la urea y la creatinina se retienen en la sangre, por lo tanto, un aumento en sus niveles séricos son indicativos de una lesión renal (Lyman, 1986; Burtis, *et al.* 1999). Para ambos modelos hubo un aumento significativo de estos marcadores, lo que nos habla de un daño renal en ambos modelos. Sin embargo, el modelo de AF fue el que obtuvo la concentración más elevada de sCr y BUN, esto corresponde a lo reportado por Perales-Quintana, *et al.* (2019).

Una vez comprobada la lesión renal provocada en los diferentes modelos, se midieron los marcadores de estrés de RE. Cuando existe un estrés de RE se desencadena la UPR iniciada por tres sensores PERK, IRE1 α y ATF6, todos estos se activan por la liberación de la chaperona GRP78. Además, GRP78 junto a GRP94 son las chaperonas encargadas del plegamiento de las proteínas aberrantes acumuladas en la UPR. Ambas son excelentes marcadores del estrés de RE (Yan *et al.*, 2018).

Es así que se decidió cuantificar, en primer lugar, la abundancia de GRP78 y GRP94 por western blot. En ambos modelos se observó un patrón de abundancia similar, no observamos cambios en la abundancia de GRP78 entre grupo control y el grupo con IRA. La GRP78, aunque se expresa en mayor medida cuando existe un estrés, se expresa de manera constitutiva en las células sanas ya que realiza funciones necesarias en el plegamiento de las proteínas (Dickhout y Krepinsky, 2009); es probable que esa sea la razón de no observar un cambio en su expresión. Por otro lado la ATF4, involucrada en la vía de PERK, presentó una disminución significativa en su expresión y GRP94 presentó un aumento significativo en su expresión en el grupo con IRA.

GRP94 es la chaperona más abundante del RE, se encuentra en el lumen del RE, transmembranalmente y en la superficie celular. Además de su participación en el plegamiento de proteínas aberrantes, tiene un papel de unión al calcio y participa en otras vías metabólicas, como en la resupuesta inmune innata y adaptativa, el cáncer y la metastasis (Marzec *et al.*, 2012; Zhu y Lee, 2014; Kim *et al.*, 2021).

También se ha determinado que los factores de crecimiento similares a insulina (IGF) dependen de GRP94 para su maduración. Los IGF son mediadores que afectan el inicio de la UPR y su vía de señalización es pro-crecimiento y anti-apoptótica, es decir, promueven la recuperación del estrés y la supresión de la apoptosis (Eletto *et al.*, 2010; Marzec *et al.*, 2012). La expresión de los IGF es proporcional a la expresión de GRP94 y esto podría explicar por qué aumentó sólo GRP94 en el análisis de Western blot. Esto concuerda con lo reportado por Paris *et al.*, (2005) quienes observaron un aumento de GRP94 como respuesta a estrés generado por hipoxia en células endoteliales.

Los resultados en el modelo de AF no concuerdan con lo reportado con Fan *et al.* (2017), en donde ellos observan un aumento en CHOP en ratones administrados con una dosis de 250 mg/kg por vía intraperitoneal de AF sacrificados a las 72 h. Con esto, se podría pensar que el tiempo durante el cual se desarrolla la enfermedad es clave para la activación de la UPR.

Con el fin de continuar investigando el papel de la UPR, medimos la expresión relativa de los ARNm de GRP78, GRP94, PERK, ATF4, CHOP, IRE1 α y XBP1 por PCR en tiempo real.

En primer lugar se midió la expresión relativa del transcrito de GRP78 como iniciador de las vías de la UPR. En el modelo de AF observamos una disminución de la expresión en el grupo con IRA, aunque este cambio no fue significativo. Por otro lado, en el modelo de CP observamos un aumento de la expresión en el grupo con IRA. La medición del transcrito de GRP94 sólo se hizo en el modelo de AF y no mostró ningún cambio en su expresión.

En el modelo de AF, no se observaron cambios en la expresión de las dos chaperonas, sin embargo en la abundancia relativa de ambas proteínas, GRP94 sí mostró un aumento significativo. Esto puede deberse a que la actividad proteica de ésta última ha sido suficiente para combatir la acumulación de proteínas aberrantes y no ha sido necesario, en este modelo, aumentar la síntesis de estas proteínas. Por otro lado, en el modelo de CP se observó que el transcrito de GRP78 sí tiene un

aumentó significativo, por lo que, el estrés generado en este modelo sí propició una acumulación de proteínas aberrantes que deben ser plegadas o eliminadas del RE para evitar que el daño continúe afectando el metabolismo en la célula.

Después se cuantificaron los transcritos de proteínas involucradas en la vía de PERK: PERK, ATF4 y CHOP. En el modelo de AF no observamos ningún cambio significativo en los tres marcadores, sin embargo CHOP tiende a disminuir. Por otro lado en el modelo de CP todos los marcadores tuvieron una tendencia al aumento, pero sólo CHOP tuvo un aumento significativo en su expresión. Se ha reportado que a diferentes dosis (24 mg/kg y 20 mg/kg) de CP en ratones, aumenta la expresión de los ARNm de GRP78 y CHOP (Long *et al.*, 2017; Zahedi *et al.*, 2017, respectivamente). Sin embargo, Peyrou *et al.* (2007), no observaron un cambio en la expresión de ARNm de GRP78 en el modelo de cisplatino con dosis de 5 mg/kg al día, durante 2 o 7 días.

Por último medimos el factor XBP1 y el iniciador de la vía de IRE1 α los cuales no presentaron un cambio en su expresión en ninguno de los dos modelos. Lo que corresponde a lo descrito por Ferrè *et al.* (2019), donde mencionan que no se observan cambios en la expresión del ARNm de XBP1s en los modelos de IRA inducidos por AF.

Con estos resultados, se puede proponer que en el modelo de AF a una dosis de 300 mg/kg en un tiempo de 24 h no se activa la UPR en el estrés de RE y esto puede ser debido al tiempo de desarrollo de la enfermedad. Contrario a esto, en el modelo de CP a una dosis de 7.5 mg/kg en un tiempo de 72 h, sí se activa la UPR como respuesta a un estrés de RE.

Se hicieron análisis de correlación para encontrar la relación existente entre el daño renal y el estrés de RE. En el modelo de AF, no se encontró una correlación significativa, pero se observó que la expresión del transcrito de GRP78 es significativamente mayor en el grupo control. Esto puede deberse a que la actividad de ésta se da de manera constitutiva en las funciones normales del RE y al

presentarse un daño renal, la maquinaria de transcripción y traducción no está trabajando de manera correcta.

En el modelo de CP se observó una correlación significativa entre los niveles de sCr y BUN con la expresión relativa de los ARNm de GRP78, CHOP y XBP1, es decir, que una mayor lesión renal corresponde a una mayor expresión de GRP78, CHOP y XBP1. CHOP es un factor pro-apoptótico y XBP1 regula los genes implicados en el plegamiento de las proteínas de RE, biogénesis del RE y la UPR (Bravo *et al.*, 2013).

Como se ha informado, existe una relación importante entre el estrés oxidante y el estrés de RE en la enfermedad renal (Plaisance *et al.*, 2016; Poplawski *et al.*, 2019; Begum *et al.*, 2013; Mota *et al.*, 2015). Se sabe que la actividad de las enzimas antioxidantes puede dañarse al presentarse un estrés oxidante por un largo plazo o si este es muy elevado (Farhat, *et al.* 2018; Cecerska-Heryc, *et al.* 2021), y, además, el estrés oxidante genera daño a las proteínas haciendo modificaciones estructurales o dando lugar a la desnaturalización de receptores, proteínas de transporte, enzimas, etc. (Sharapov, *et al.* 2021).

Con todo esto, se midió la actividad de tres enzimas antioxidantes, GR, CAT y GST para tener una idea del grado de estrés oxidante que se pueda estar generando en los modelos de IRA estudiados en este trabajo. GR es la enzima responsable de mantener las concentraciones de GSH reduciendo al GSSG (Cecerska-Heryc, *et al.* 2021). De igual modo, GST participa en la reducción de hidroperóxidos utilizando GSH como reductor (Sharapov, *et al.* 2021), eliminan el GSSG producido por la reducción de H₂O₂ y participan en la segunda fase de desintoxicación por xenobióticos (Cecerska-Heryc, *et al.* 2021).

Por otro lado, la enzima CAT es la encargada de transformar dos moléculas de H₂O₂ en dos moléculas de agua y una de oxígeno. Debido a que el H₂O₂ se genera a partir del metabolismo aerobio, es importante poder oxidar esta molécula a moléculas no reactivas (Glorieux y Buc, 2017).

Las tres presentaron una disminución significativa en su actividad en ambos modelos a excepción de la GST que no mostró cambios significativos en el modelo de CP. Esto confirma que el estrés oxidante en la célula es característico de la IRA, lo que corresponde a lo descrito en varios trabajos anteriores (Gupta *et al.*, 2012; Gallegos-Sánchez, 2019; Aparicio-Trejo, 2020; Gómez-Sierra, 2022). Sin embargo, Gupta *et al.* (2012), no observaron cambio significativo en la actividad de GST después de la administración de AF.

Si el estrés oxidante es característico de la IRA, se buscó confirmar que existe una relación entre este y el daño renal y para ello analizamos las tres enzimas antioxidantes (GR, CAT y GST) y los niveles de sCr y BUN. En el modelo de AF observamos una correlación significativa en la actividad de la GST y los dos marcadores de daño renal, mientras que CAT sólo presentó correlación con BUN.

Por otro lado, en el modelo de CP, GR tuvo correlación significativa con los marcadores de daño renal y la CAT presentó correlación solo con el marcador de sCr. Encontrando que cuando existe una lesión renal la actividad de estas enzimas disminuye.

Por último, analizamos la relación que existe entre el estrés de RE y el estrés oxidante. En el modelo de AF sólo GRP78 se correlacionó significativamente con las tres enzimas de manera negativa, al igual que PERK con la GR. Los demás marcadores no mostraron ninguna relación entre ellos. En el modelo de CP, la actividad de la enzima GR si mostró una correlación significativa con GRP78 y la actividad de la CAT también tuvo una correlación significativa con GRP78 y CHOP. Solo GST no mostro una correlación significativa con ninguno de los ARNm de las proteínas involucradas en la UPR activada por el estrés de RE.

10. Conclusión

En el modelo de IRA inducida por AF con una dosis única de 300 mg/kg con un tiempo de 24 h, algunas proteínas involucradas en la UPR no aumentan su expresión como respuesta a la inducción de IRA. Sólo la proteína GRP94 presentó un aumento en su expresión. Al estar involucrada en otras vías de respuesta al estrés y su actividad como chaperona, parece ser suficiente para contrarrestar el estrés de RE provocado por este modelo de IRA.

En el modelo de IRA inducida por CP con una dosis única de 7.5 mg/kg con un tiempo de 72 h, la UPR se activa como respuesta al estrés de RE. Existió una correlación significativa entre la lesión renal, el estrés de RE y el estrés oxidante.

Estos datos permiten concluir que la vía de estrés de retículo endoplásmico es muy dinámica y la célula tiene otros mecanismos para recuperar su homeostasis. El estrés oxidante tiene un papel importante en la IRA y éste es proporcional al daño renal existente. Mientras que la relación entre el estrés oxidante y el estrés de RE no está del todo identificada.

11. Perspectivas

Se propone aumentar el número de individuos en ambos modelos para continuar con el análisis de estos y otros marcadores de estrés de RE.

Cambiar las dosis de los compuestos de AF y CP para la inducción de IRA. Generar la IRA y coleccionar las muestras a diferentes tiempos para averiguar si el estrés de RE se activa de manera dependiente del tiempo.

12. Referencias

1. Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105: 121–126. Doi: doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05016-3
2. Aparicio-Trejo, O. (2020). Tesis: Efecto de la preadministración de N-acetilcisteína en la función mitocondrial y la S-glutationilación en la insuficiencia renal aguda experimental. Tesis de doctorado en Ciencias Bioquímicas, UNAM. México.
3. Aksu, U., Demirci, C. y Ince, C. (2011). The pathogenesis of acute kidney injury and the toxic triangle of oxygen, reactive oxygen species and nitric oxide. *Pathophysiology of Sepsis-Induced Acute Kidney Injury*. 174: 119-128. <https://doi.org/10.1159/000329249>.
4. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts K. y Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*, 4 ed. Garland Science, Nueva York.
5. Almanza, A., Carlesso, A., Chinthra, C., Creedican, S., Doultsinos, D., Leuzzi, B., Luís, A., McCarthy, N., Montibeller, L., More, S., Papaioannou, A., Püschel, F., Sassano, M., Skoko, J., *et al.*, (2019). Endoplasmic reticulum stress signalling – from basic mechanisms to clinical applications. *The FEBS Journal*. 286 (2): 241- 278.
6. Bashir, S., Banday, M., Qadri, O., Bashir, A., Hilal, N., Fatima, N., Rader, S. y Majid, K. (2021). The molecular mechanism and functional diversity of UPR signaling sensor IRE1. *Life Sciences*. 265: 118740. Doi: doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118740.
7. Beck, D. y Brubaker, R. (1973). Effect of cis-platinum (II) diamminodichloride on wild type and deoxyribonucleic acid repair deficient mutants of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 116 (3): 1247-1252. Doi: 10.1128/jb.116.3.1247-1252.1973.
8. Begum, G., Harvey, L., Dixon, C. y Sun, D. (2013). ER stress and effects of DHA as an ER stress inhibitor. *Translational Stroke Research*. 4: 635-642. Doi: doi.org/10.1007/s12975-013-0282-1.
9. Bellodomo, R., Kellum, J., Ronco, C. (2012). Acute kidney injury. *The Lancet*. 380 (9843): 756-766. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61454-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61454-2).
10. Bonventre, J. y Zuk, A. (2004). Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? *Kidney International*. 66 (2): 480-485.
11. Bravo, R., Parra, V., Gatica, D., Rodríguez, A., Torrealba, N., Paredes, F., Wang, Z., Zorzano, A., Hill, J., Jaimovich, E., Quest, A. y Lavandero, S. (2013). *Chapter Five- Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration*. *International Review of Cell and Molecular Biology*. 301: 215-290. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407704-1.00005-1>
12. Burtis, A. et al. 1999. *Tietz textbook of clinical chemistry*. 3a ed. AACC.
13. Burton, G. y Jauniaux, E. (2011). Oxidative stress. *Best Practice y Research Clinical Obstetrics y Gynaecology*. 25 (3): 287-299. Doi: doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016.
14. Carlberg, I. y Mannervik, E. (1975). Glutathione Level in Rat Brain. 250: 4475–4480.
15. Cecerska-Heryc, E., Surowska, O., Heryc, R., Serwin, N., Napiontek-Balinska, S. y Dolegowska, B. (2021). Are antioxidant enzymes essential markers in the diagnosis and monitoring of cancer patients – A review. *Clinical Biochemistry*. 93. 1-8.

16. Chawla, L., Eggers, P., Star, R., Kimmel, P. (2014). Acute kidney injury and chronic kidney disease as interconnected syndromes. *The New England Journal of Medicine*. 317: 58-66. Doi: 10.1056/NEJMra1214243.
17. Ciarimboli, G. (2012). Membrane transporters as mediators of cisplatin side-effects. *Anticancer Research*. 34 (1): 547-550. PMID: 24403515
18. Curthoys, N. y Moe, O. (2013). Proximal tubule function and reponse to acidosis. *Clinical Journal of American Society of Nephrology*. 9 (9): 1627-1638. Doi: 10.2215/CJN.10391012.
19. Dasari, S. y Tchounwou, P. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*. 740: 364-378. Doi: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025.
20. De Jongh, F., van Venn, R., Veltman, S., de Wit, R., van der Burg, M., van den Bent, M., Planting, A., Graveland, W., Stoter, G. y Verweij, J. (2003). Weekly high-dose cisplatin is a feasible treatment option: analysis on prognostic factors for toxicity in 400 patients. *British Journal Cancer*. 88 (8): 1199-1206. Doi: 10.1038/sj.bjc.6600884.
21. Díaz de León-Ponce, M., Briones-Garduño, J. Carrillo-Esper, R. Moreno-Santillán, A. y Pérez-Calatayud A. (2017). Insuficiencia renal aguda (IRA) clasificación, fisiopatología, histopatología, cuadro clínico diagnóstico y tratamiento una versión lógica. *Revista Mexicana de Anestesiología*. 40 (4): 280-287.
22. Dickhout, J y Krepinsky, J. (2009). Endoplasmic reticulum stress and renal disease. *Antioxidants and redox signaling*. 11 (9): 2341-2352.
23. Eletto, D., Dersh, D. y Argon, Y. (2010). GRP94 in ER quality control and stress responses. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 21 (5): 479-485. Doi: 10.1016/j.semcd.2010.03.004.
24. Enfermedades renales. 2019. Centro Estatal de Vigilancia Epidemiológica y Control de enfermedades. Recuperado de: www.salud.edomexico.gob.mx/cevece/.
25. Escaso, F., Martínez, J. y Planelló, M. (2010). *Fundamentos básicos de fisiología vegetal y animal*. Pearson. Madrid, España.
26. Espinosa-Sevilla, A., Amezcua-Macías, I., Ruiz-Palacios, P., Rodríguez-Weber, F. y Días-Greene, E. (2013). Nuevos marcadores de lesión renal aguda en el enfermo grave. *Medicina Interna de México* 29: 513-517.
27. Fan, Y., Xiao, W., Lee, K., Salem, F., Wen, J., He, L., Zhang, J., Fei, Y., Cheng, D., Bao, H., Liu, Y., Lin, F., Jiang, G., Guo, Z., Wang, N. y He, J. (2017). Inhibition of reticulon-1A-mediated endoplasmic reticulum stress in early AKI attenuates renal fibrosis development. *Journal of the American Society of Nephrology*. 28 (7): 2007-2021. Doi: 10.1681/ASN.2016091001.
28. Farhat, Z., Browne, R., Bonner, M., Tian, L., Deng, F., Swanson, M. y Mu, L. (2018). How do glutathione antioxidant enzymes and total antioxidant status respond to air pollution exposure? *Environment International*. 112, 287-293. Doi: 10.1016/j.envint.2017.12.033.
29. Fels, D. y Koumenis, C. (2006) The PERK/eIF2 α /ATF4 module of the UPR in hypoxia resistance and tumor growth. (2006). *Cancer Biology y Therapy*. 2 (7): 723-728. Doi: doi.org/10.4161/cbt.5.7.2967.

30. Ferrè, S., Deng, Y., Huen, S., Lu, C., Scherer, P., Igarashi, P. y Moe, O. Renal tubular cell spliced X-box binding protein 1 8Xbp1s) has a unique role in sepsis-induced acute kidney injury and inflammation. *Kidney International*. 96 (6): 1359-1373. Doi: doi.org/10.1016/j.kint.2019.06.023
31. Fink, M., Henry, M. y Tange, J. (1987). *Experimental folic acid nephropathy*. *Pathology*. 19 (2): 143-139. Doi: 10.3109/00313028709077125.
32. Gallegos-Sánchez, A. (2019). Efecto de la N-acetilcisteína sobre la bioenergética mitocondrial en el daño renal inducido por ácido fólico. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM, Ciudad de México.
33. Ghosh, S. (2019). Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorg Chemistry*. Doi: 0.1016/j.bioorg.2019.102925
34. Glorieux, C. y Buc, P. (2017). Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biological Chemistry*. 398 (10): 1095-1108. Doi: doi.org/10.1515/hsz-2017-0131
35. Gómez-Sierra, T. (2022). *Mecanismos de protección de la Isoliquiritigenina en la toxicidad renal inducida por cisplatino*. Tesis de doctorado. Facultad de Química, UNAM.
36. Gonzalez-Enders, E. (1997). Autorregulación renal: nuevos aportes sobre el funcionamiento del aparato yuxtglomerular. *Revista Médica Herediana*. 8 (4). http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X1997000400006
37. Goormaghtiegh, N. L'appareil neuro-myo-artériel juxtaglomérulaire du rein; ses réactions en pathologie et ses rapports avec le tube urinifère. (1997). *Compt Rend Soc Biol*. 124: 293-296. In Gonzalez-Enders, E. (1997).
38. Gupta, A., Puri, V., Sharma, R. y Puri, S. (2012). *Folic acid induces acute renal failure (ARF) by enhancing renal prooxidant state*. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 64 (3): 225-232.
39. Habig, W., Pabst, M. y Jakoby, W. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*. 249(22): 7130–7139.
40. Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*. 141 (2): 312-322.
41. Hoenig, M. y Zeidel, M. (2014). Homeostasis, the Milieu Intérieur, and the Wisdom of the Nephron. *Clinical Journal of American Society of Nephrology*. 9 (7):1272-1281. Doi: 10.2215/CJN.08860813.
42. Holditch, S., Brown, C., Lombardi, A., Nguyen, K. y Edelstein, C. (2019). Recent advances in models, mechanisms, biomarkers, and interventions in cisplatin-induced acute kidney injury. *International Journal of Molecular Sciences*. 20 (12): 3011. Doi: 10.3390/ijms20123011.
43. Hukriede, N., Soranno, D., Sander, V., Perreau, T., Starr, M., Yuen, P., Siskind, L., Hutchens, M., Davidson, A., Burmeister, D., Faubel, S. y Caestecker, M. (2022). Experimental models of acute kidney injury for translational research. *Nature Reviews nephrology*. 18 (5): 277-293. Doi: doi.org/10.1038/s41581-022-00539-2

44. Karp, G. (2011). *Biología celular y Molecular*. 6 ed. McGraw-Hill Interamericana. México.
45. Kaufman, D., Basit, H. y Hnohl, S. (2021). Physiology, glomerular filtration rate. Stat Pearls (Internet). www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500032
46. Kellum, J., Unruh, M. y Murugan, R. (2011). Acute kidney injury. *BMJ Clinical Evidence*. 2011, 2001: 1-36.
47. Kim, B. (2017). Western blot techniques. Chapter 6. *Molecular Profiling*. 133-139. Doi: doi.org/10.1007/978-1-4939-6990-6_9
48. Kim, J., Cho, Y. y Lee, S. (2021). Cell surface GRP94 as a novel emerging therapeutic target for monoclonal antibody cancer therapy. *Cells*. 10 (5): 1198. Doi: doi.org/10.3390/cells10030670.
49. Klingler, E., Evan, A. y Anderson, R. (1980). *Folic acid-induced renal injury and repair. Correlation of structural and functional abnormalities*. *Archives of Pathology y Laboratory Medicine*. 104 (2): 87-93.
50. Kruger, N. (2009) The Bradford method for protein quantitation. *The Protein Protocols Handbook*. 17-22p. Doi: doi.org/10.1007/978-1-59745-198-7_4
51. KDIGO, (2012). *Kidney international supplements*. Official Journal of the International Society of Nephrology. 2 (1).
52. Levey, A., Matthew, T. y James, M. (2017). Acute kidney injury. *Annals of Internal Medicine*. <https://doi.org/10.7326/AITC201711070>.
53. Lombi, F., Muryan, A., Canzonieri, R. y Trimachi, H. (2016). Biomarcadores en la lesión renal aguda: ¿paradigma o evidencia? *Revista de la Sociedad Española de Nefrología*. 36 (4): 339-346. Doi: 10.1016/j.nefro.2016.01.012.
54. Long, Y., Zhen, X., Zhu, F., Hu, Z., Lei, W., Li, S., Zha, Y. y Nie, J. (2017). Hyperhomocysteinemia exacerbates cisplatin-induced acute kidney injury. *International Journal of Biological Sciences*. 13 (2): 219-231. Doi: 10.7150/ijbs.16725
55. Lyman, J. 1986. Blood urea nitrogen and creatinine. *Emergency medicine clinics of North America*. 4 (2): 223-233.
56. Maiden, M. (2019). Chapter 17, Experimental models of acute kidney injury. *Critical Care Nephrology*. 3: 99-105.
57. Makris, C. y Spanou, L. (2016). Acute kidney injury: definition, pathophysiology and clinical phenotypes. *The Clinical Biochemistry Reviews*. 37 (2): 85-98. PMID: PMC5198510.
58. Marzec, M., Eletto, D. y Argon, Y. GRP94: An HSP90-like protein specialized for protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Molecular Cell Research*. 1823 (3): 774-787. Doi: doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.10.013
59. McCormick, J. y Ellison, D. (2015). Distal convoluted tubule. *Comprehensive physiology*. 5 (1). Doi: doi.org/10.1002/cphy.c140002
60. Mejías, M., Molist, P. y Pombal, M. (2020). *Atlas de histología vegetal y animal. La célula*. Universidad de Igo, España. Recuperado el 15 de enero del 2020 de: <http://mmegias.webs.uvigo.es/5-celulas/1-introduccion.php>.
61. Miller, R., Tadagavi, R., Ramesh, G., Reeves, W. (2010). Mechanisms of cisplatin nephrotoxicity. *Toxins (Basel)*. 2 (11): 2490-2518. Doi: 10.3390/toxins2112490.

62. Moreno-Santillán, A., Díaz de León-Ponce, M., Briones-Garduño, J. y Briones-Vega, C. (2006). La insuficiencia renal aguda en México. *Nefrología Mexicana*. 27 (2): 54-56.
63. Mota, S., Costa, R., Ferreira, I., Santana, I., Caldeira, G., Padovano, C., Fonseca, A., Baldeiras, I., Cunha, C., Letra, L., Oliveira, C., Pereira, C. y Rego, A. (2015). Oxidative stress involving changes in Nrf2 and ER stress in early stages of Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease*. 1852 (7): 1428-1441. Doi: doi.org/10.1007/s12975-013-0282-1
64. Nielsen, S., Kwon, T., Fenton, R. y Praetorius, J. (2012). *Brenner and Rector's; The Kidney. Anatomy of the kidney*. Elsevier Saunders.
65. Ochoa, C., FengWulance, R. y Terrada, S. (2018). ROS signaling and ER stress in cardiovascular disease. *Molecular Aspects of Medicine*. 63: 18-29. Doi: 10.1016 / j.mam.2018.03.002
66. Oh, G., Kim, H., Shen, A., Lee, S., Khadka, D., Pandit, A., So, H. (2014). Cisplatin-induced kidney dysfunction and perspectives on improving treatment strategies. *Electrolyte Blood Press*. 12 (2): 55-65. Doi: 10.5049/EBP.2014.12.2.55
67. Paris, S., Denis, H., Delaive, E., Dieu, M., Dumont, V., Ninane, N., Raes, M. y Michiels, C. (2005). Up-regulation of 94-kDa glucose-regulated protein by hipoxia-inducible factor-1 in human endotelial cells in response to hypoxia. *FEBS Letters*. 579 (1): 105-114. Doi: doi.org/10.1016/j.febslet.2004.11.055
68. Peña, J. (2021). La sabiduría del riñón II. La concentración de la orina y el mecanismo multiplicador por contracorriente del asa de Henle. *Acta médica Grupo los Ángeles*. 19 (2): 304-312. Doi: doi.org/10.35366/100465.
69. Perales-Quintana, M., Saucedo, A., Lucio-Gutiérrez, J., Waksman, N., Alarcon-Galvan, G., Govea-Torres, G., Sanchez-Martinez, C., Pérez-Rodríguez, E., Guzman-de la Garza, F. y Cordero-Pérez, P. (2019). *Metabolomic and biochemical characterization of a new model of the transition by folic acid*. *PeerJ*. 7e7113. Doi: doi.org/10.7717/peerj.7113
70. Peyrou, M., Hanna, P. y Cribb, A. (2017). *Cisplatin, gentamicin, and p-aminophenol induce markers of endoplasmic reticulum stress in the rat kidneys*. *Toxicological sciences*. 99 (1): 346-353. Doi: doi.org/10.1093/toxsci/kfm152.
71. Plaisance, V., Brajkovic, S., Tenebaum, M., Favre, D., Ezanno, H., Bonnefond, A., Bonner, C., Gmyr, V., Kerr-Conte, J., Gauthier, B., Widmann, C., Waeber, G., Pattou, F., Froguel, P. y Abderrahmani, A. (2016). *Endoplasmic reticulum stress links oxidative stress to impaired pancreatic Beta-cell function caused by human oxidized LDL*. *Plos One*. 11 (9): e0163046. Doi: 10.1371/journal.pone.0163046.
72. Plascencia-Pimentel, K., Bernárdez-Zapata, I., Gerardo-Del Hoyo, M., Iglesias-Leboreiro, J., Rendón-Macías, M., Romo-Vázquez, J., Vicencio-Rivas, J. y Lozano-Duau, C. (2019). *Niveles normales del marcador lipocalina asociada con gelatinase de neutrófilo (NGAL) en orina en recién nacidos pretérmino y de término a las 24 y 72 horas de vida*. *Revista Mexicana de pediatría*, 86 (6): 223-228.
73. Plotnikov, E., Kazachenko, A., Vyssokikh, M., Vasileva, A., Tcvirkun, D., Isaev, N., Kirpatovsky, V. y Zorov, D. (2007). The role of mitochondria in oxidative and

- nitrosative stress during ischemia/reperfusion in the rat kidney. *Kidney International*. 72 (12): 1493-1502. Doi: <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002568>
74. Pollak, M., Quaggin, S., Hoenig, M. y Dworkin, L. (2014). The glomerulus: The sphere of influence. *Clinical Journal of American Society of Nephrology*. 9 (8): 1461-1469. Doi: 10.2215/CJN.09400913.
 75. Poplawski, T., Pytel, D., Dziadek, J. y Majsterek, I. (2019). Interplay between redox signaling, oxidative stress, and unfolded protein response (UPR) in pathogenesis of human diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019: 6949347 Doi: doi.org/10.1155/2019/6949347
 76. Rattanasinganchan, P., Sopitthummakhun, L., Doi, K., Hu, X., Michael, D., Pisitkun, T. y Leelahavanichkul, A. (2016). *A folic acid-induced rat model of renal injury to identify biomarkers of tubulointerstitial fibrosis from urinary exosomes*. *Asian Biomedicine*. 10 (5): 491-502. Doi: <https://doi.org/10.5372/1905-7415.1005.513>.
 77. Reyes-Fermín, L., Aparicio-Trejo, O., Ávila-Rojas, S., Gómez-Sierra, T., Martínez-Klimova, E. y Pedraza-Chaverri, J. (2020). *Natural antioxidants' effects on endoplasmic reticulum stress-related diseases*. *Food and Chemical Toxicology*. 138: 111229 Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111229>.
 78. Sanz, A., Sánchez-Niño, M., Martín-Cleary, C., Ortiz, A. y Ramos, A. (2013). Progress in the development of animal models of acute kidney injury and its impact on drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 8 (7): 879-895. Doi: 10.1517/17460441.2013.793667.
 79. Schrier, R., Wang, W., Poole, B. y Mitra, A. (2004). Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *The Journal of Clinical Investigation*. 114 (1): 5-14. <https://doi.org/10.1172/JCI22353>.
 80. Sharapov, M., Gudkov, S. y Lankin, V. (2021). Hydroperoxide-reducing enzymes in the regulation of free-radical processes. *Biochemistry (Moscow)*. 86. 1256-1274. Doi: 10.1134/S0006297921100084
 81. Sherwood, L. (2011). *Fisiología humana. De las células a los sistemas*. CENGAGE Learning. 7 ed. México, D.F., 515-517.
 82. Sirota, J., Klawitter, J. y Edelstein, C. (2011). *Biomarkers of acute kidney injury*. *Journal of Toxicology*. 2011. Doi: 10.1155/2011/328120
 83. Slot, C. (1965). *Plasma creatinine determination*. A new and specific Jaffe reaction method.
 84. Stallons, L., Whitaker, R. y Schnellmann, R. (2014). *Suppressed mitochondrial biogenesis in folic acid-induced acute kidney injury and early fibrosis*. *Toxicol Letters*. 224 (3): 326-332.
 85. Subramanya, A. y Ellison, D. (2014). Distal convoluted tubule. *Clinical Journal of American Society of Nephrology*. 9 (12): 2147-2163. Doi: 10.2215/CJN.05920613.
 86. Szeto, H., Liu, S., Soong, Y., Wu, D., Darrach, S., Cheng, F., Zhao, Z., Ganger, Tow, C. y Seshan, S. (2011). *Mitochondria-Targeted peptide accelerates ATP recovery and reduces ischemic kidney injury*. *Journal of the American Society of Nephrology*. 22 (6): 1041-1052. Doi: <https://doi.org/10.1681/ASN.2010080808>.
 87. Tam, A., Roberts, L., Chandra, V., Rivera, I., Nomura, D., Forbes, D. y Niwa, M. (2018). The UPR activator ATF6 responds to proteotoxic and lipotoxic stress by

- distinct mechanisms. *Developmental Cell*. 46 (3): 327-343. Doi: doi.org/10.1016/j.devcel.2018.04.023
88. Taylor, D., Threlfall, G. y Buck, A. (1966). *Stimulation of renal growth in the rat by folic acid*. *Nature*. 212 (5061): 472-474. Doi: 10.1038/212472a0.
89. Thureau, K. y Boylan, J. (1976). The unexpected logic of oliguria in acute renal failure. *The American Journal of Medicine*. 61 (3): 308-315. Doi: 10.1016/0002-9343(76)90365-X.
90. Tomsa, A., Alexa, A., Junie, M., Rachisan, A. y Ciumarnean, L. (2019). Oxidative stress as a potential target in acute kidney injury. *PeerJ*: 7:E8046 Doi: doi.org/10.7717/peerj.8046
91. Vélez, H., Rojas, W., Borrero, J., Restrepo, J., Borrero, F. y Ruíz, M. (2012) *Fundamentos de medicina: Nefrología. Corporación para investigaciones biológicas*. 5 ed. Colombia, Medellín. 215-248.
92. Welsch, U. (2009). *Histología*. 2 ed. Médica panamericana. Madrid, España.
93. Wirz, H., Hargitay, B. y Kuhn, W. (1951). Lokalisation des konzentrierungsprozesses in der niere durch direkte kryoskopie. *Helv Physiol Acta*. In Peña, J. (2021).
94. Yan, M., Shu, S., Guo, C., Tang, C. y Dong, Z. (2018). Endoplasmic reticulum stress in ischemia and nephrotoxic acute kidney injury. *Annals of Medicine*. 50 (5): 381-390. Doi: 10.1080/07853890.2018.1489142
95. Zahedi, K., Barone, S., Destefano-Shields, C., Brools, M., Murray-Stewart, T., Dunworth, M., Li, W., Dohery, J., Hall, M., Smith, R., Cleveland, J., Casero, R. y Soleimani, M. (2017). *Activation of endoplasmic reticulum stress response by enhanced polyamine catabolism is important in the mediation of cisplatin-induced acute kidney injury*. *Plos One*. 12 (9): Doi: doi.org/10.1371/journal.pone.0184570
96. Zhang, K. (2010). *Integration of ER stress, oxidative stress and the inflammatory response in health and disease*. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 3 (1): 33-40.
97. Zhu, G. y Lee, A. (2014). *Role of the unfolded protein response, GRP78 and GRP94 in organ homeostasis*. *Journal of Cellular Physiology*. 230 (7): 1413-1420.
98. Zuk, A. y Bonventre, J. (2016). Acute Kidney Injury. *Annual Review of Medicine*. 678 (1): 293-307. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-050214-013407>.