



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“DAÑO RENAL Y ESTRÉS OXIDANTE INDUCIDO POR  $\text{CdCl}_2$  EN  
RATAS WISTAR”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**MARÍA EUGENIA PAOLA ROSALES SOLAREZ**



**CDMX**

**2023**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: MARTÍNEZ BARAJAS J. ELEAZAR

**VOCAL:** Profesor: PEDRAZA CHAVERRI JOSÉ

**SECRETARIO:** Profesor: DEL VALLE PÉREZ PAULINA

**1er. SUPLENTE:** Profesor: GONZÁLEZ TRUJANO MARÍA EVA

**2° SUPLENTE:** Profesor: BERNAL GRACIDA LILIA ANGÉLICA

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO 315 (BIOQUÍMICA DE ANTIOXIDANTES), EDIFICIO F,  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.**

**ASESOR DEL TEMA:**

**DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI**

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

**M. EN C. OMAR NOEL MEDINA CAMPOS**

**SUSTENTANTE:**

**MARÍA EUGENIA PAOLA ROSALES SOLAREZ**

Yo no hago ciencia para el pueblo

Soy el pueblo haciendo ciencia.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por abrirme sus puertas desde el nivel bachillerato en el CCH y permitirme realizar mi licenciatura de QFB en la Facultad de Química.

Al Subprograma 127. Formación Básica en Investigación de la Facultad de Química, UNAM por la beca otorgada para la realización de mi tesis de licenciatura.

Este proyecto fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT, IN200922), el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, A1-S-7495) y el Programa de Apoyo a la Investigación y al Posgrado (PAIP, 5000-9105).

A mi tutor Dr. José Pedraza Chaverri que me abrió las puertas del Laboratorio F-315 de la Facultad de Química, UNAM permitiéndome aprender y trabajar en el laboratorio, y por el apoyo que me brindó durante la realización de mi tesis de licenciatura.

A mi supervisor técnico M. en C. Omar Noel Medina Campos por su asesoramiento técnico y apoyo durante la realización de mis experimentos en el laboratorio.

A la M. en C. Estefani Yaquelin Hernández Cruz por todo el asesoramiento técnico y teórico que me brindó para poder realizar mi tesis.

Al Dr. Juan Carlos León Contreras del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán por el apoyo en los estudios histológicos.

A la Dra. Diana Barrera por el apoyo en el bioterio de estudios toxicológicos agudos, subagudos y crónicos de la Facultad de Medicina de la UNAM.

A mi jurado asignado por las recomendaciones y observaciones para mi tesis.

## **DEDICATORIAS PERSONALES:**

A todo el personal del laboratorio F-315 de la Facultad de Química, UNAM que me apoyó desde el primer momento que llegué al laboratorio, me enseñaron diversas técnicas, a trabajar en ese laboratorio, me animaron múltiples veces y me hicieron sentir parte de ellos. Gracias Estefani, Diane, Tania Jarillo y Karla por apoyarme en todo lo que pudieron durante mi tesis en el laboratorio, por las risas y por las experiencias. Gracias Omar, Tania Gómez, Alexis, Ari y Ana por todo lo que me enseñaron, por su asesoramiento y su paciencia. Gracias Mayra, Nat y Fernando por su entusiasmo y por su apoyo incondicional.

A mis padres María Eugenia Solarez y Eduardo Rosales por todo lo que me pudieron ayudar para llegar hasta aquí y por los buenos principios que me inculcaron, gracias por enseñarme que las cosas que valen la pena cuestan un poco más y que no me debo rendir a pesar de las adversidades. A mi hermana Laura Rosales S. que ha estado en todo momento conmigo, en las buenas y en las malas, por todo su apoyo incondicional. También a mis dos amigos caninos que sin duda han sido de gran apoyo emocional para mí.

A mis mejores amig@s del CCH, gracias Iván, Montse y Enrique por acompañarme en este camino desde entonces y verme terminar la licenciatura, por todo su apoyo incondicional, por escuchar mis frustraciones, por las risas y los buenos momentos.

Gracias a todos los que acabo de mencionar por no dejarme sola en este camino y a los que en algún momento me ayudaron, porque sin ustedes no lo hubiera podido lograr, los quiero infinitamente.

## Índice de contenido

Índice de figuras y tablas.....	7
Índice de figuras suplementarias.....	8
Abreviaturas .....	9
Resumen.....	12
1. Introducción .....	13
2. Antecedentes (marco teórico).....	15
<b>2.1. Cd.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2. Nefrotoxicidad del Cd .....</b>	<b>19</b>
<b>2.3. Evaluación del daño renal inducido por Cd: biomarcadores ...</b>	<b>23</b>
<b>2.4. Hepatotoxicidad del Cd.....</b>	<b>30</b>
<b>2.5. Evaluación del daño hepático inducido por Cd.....</b>	<b>32</b>
<b>2.6. Papel del estrés oxidante en la nefrotoxicidad y hepatotoxicidad del Cd.....</b>	<b>34</b>
<b>2.7. Evaluación del estrés oxidante inducido por Cd.....</b>	<b>37</b>
<b>2.8. Modelo experimental de daño renal y hepático inducido por Cd en ratas Wistar .....</b>	<b>40</b>
3. Justificación .....	45
4. Hipótesis.....	46
5. Objetivo general.....	46
6. Objetivos particulares .....	46
7. Procedimiento experimental: materiales y métodos .....	47
<b>7.1. Reactivos .....</b>	<b>47</b>
<b>7.2. Animales .....</b>	<b>48</b>
<b>7.3. Diseño experimental y obtención de muestras. ....</b>	<b>48</b>
7.3.1. Preparación de homogenados de tejido.....	51
<b>7.4. Evaluación de daño renal .....</b>	<b>51</b>
7.4.1. Cuantificación de creatinina .....	51
7.4.2. Cuantificación de BUN .....	52
7.4.3. Determinación de la actividad de GPx en plasma.....	53
7.4.4. Cuantificación de NAG.....	53
7.4.5. Técnica analítica de western blot: determinación de KIM-1 y NGAL .....	54
7.4.6. Tinción H&E .....	55
<b>7.5. Evaluación de daño hepático .....</b>	<b>56</b>
7.5.1. Determinación de proteínas totales en plasma .....	56
7.5.2. Determinación de AST .....	56
7.5.3. Determinación de ALT .....	57
7.5.4. Análisis cualitativo de albúmina .....	57
<b>7.6. Evaluación de estrés oxidante .....</b>	<b>58</b>
7.6.1. Evaluación de la actividad de la enzima SOD.....	58
7.6.2. Evaluación de la actividad de la enzima CAT .....	58
7.6.3. Evaluación de la actividad de la enzima GR .....	59
7.6.4. Evaluación de la actividad de la enzima GST .....	59
7.6.5. Evaluación de la actividad de la enzima GPx.....	60
7.6.6. Determinación cuantitativa de MDA .....	60
7.6.7. Determinación de la capacidad antioxidante: ORAC .....	60
8. Análisis estadístico .....	61

9.	Resultados.....	61
9.1.	Toxicidad aguda a la exposición de CdCl <sub>2</sub> .....	61
9.2.	Efecto de la exposición aguda a CdCl <sub>2</sub> en los marcadores de daño renal.....	63
9.3.	Efecto de la exposición aguda a CdCl <sub>2</sub> en los marcadores de estrés oxidante en el riñón.....	65
9.4.	Efecto de la exposición aguda a CdCl <sub>2</sub> en los marcadores de daño hepático.....	66
9.5.	Efecto de la exposición aguda a CdCl <sub>2</sub> en los marcadores de estrés oxidante en el hígado.....	68
10.	Discusión.....	70
11.	Conclusión.....	77
12.	Perspectiva.....	78
13.	Referencias.....	79
14.	Anexos.....	96
14.1.	Anexo 1: ilustraciones complementarias.....	96
14.2.	Anexo 2: resultados de los modelos 1 y 2 <i>in vivo</i> .....	98
14.3.	Anexo 3: curvas de calibración.....	100

## Índice de figuras y tablas

<b>Figura 1.</b>	Sistema urinario de una mujer.....	19
<b>Figura 2.</b>	Estructura del riñón.....	20
<b>Figura 3.</b>	Fisiopatología general y mecanismo del daño renal inducido por cadmio (Cd).....	23
<b>Figura 4.</b>	Síntesis de la creatinina.....	25
<b>Figura 5.</b>	Ciclo de la urea.....	26
<b>Figura 6.</b>	Metodología de la tinción con hematoxilina y eosina.....	29
<b>Figura 7.</b>	Tipos de células del hígado.....	30
<b>Figura 8.</b>	Reacción catalizada por la superóxido dismutasa (SOD).....	37
<b>Figura 9.</b>	Reacciones catalizadas por la enzima catalasa (CAT).....	38
<b>Figura 10.</b>	Reacción catalizada por la enzima glutatión reductasa (GR).....	38
<b>Figura 11.</b>	Reacción catalizada por la enzima glutatión S-transferasa (GST).....	39
<b>Figura 12.</b>	Reacción catalizada por la enzima glutatión peroxidasa (GPx).....	39
<b>Figura 13.</b>	Planteamiento del diseño experimental <i>in vivo</i> .....	49
<b>Figura 14.</b>	Modelo experimental <i>in vivo</i> .....	50
<b>Figura 15.</b>	Fundamento de la determinación de creatinina.....	52
<b>Figura 16.</b>	Fundamento de la determinación de urea.....	53
<b>Figura 17.</b>	Actividad de la N-acetil-β-D-glucosaminidasa (NAG).....	54
<b>Figura 18.</b>	Reacciones del fundamento de la detección de la aspartato aminotransferasa (AST).....	56
<b>Figura 19.</b>	Reacciones del fundamento de la detección de la alanina aminotransferasa (ALT).....	57
<b>Figura 20.</b>	Fundamento de la determinación de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD).....	58
<b>Figura 21.</b>	Fundamento de la determinación de la actividad de la glutatión S-transferasa (GST).....	59
<b>Figura 22.</b>	Reacción que describe la determinación de malondialdehído (MDA).....	60



<b>Figura 23.</b> Cursos temporales de signos de toxicidad aguda a cloruro de cadmio (CdCl <sub>2</sub> ) .....	62
<b>Figura 24.</b> Evaluación de marcadores de daño renal .....	64
<b>Figura 25.</b> Imágenes representativas de la tinción con hematoxilina y eosina (H&E) en tejido renal observadas a 10X. ....	65
<b>Figura 26.</b> Evaluación de marcadores de estrés oxidante en riñón .....	66
<b>Figura 27.</b> Evaluación de marcadores de daño hepático.....	67
<b>Figura 28.</b> Imágenes representativas de la tinción con hematoxilina y eosina (H&E) en tejido hepático observadas a 10X .....	68
<b>Figura 29.</b> Evaluación de marcadores de estrés oxidante en hígado.....	69
<b>Figura 30.</b> Evaluación de la capacidad de absorción de radicales libres de oxígeno (ORAC) en plasma .....	70
<b>Figura 31.</b> Diagrama integrativo del modelo <i>in vivo</i> realizado .....	76
<b>Figura 32.</b> Distribución del cloruro de cadmio (CdCl <sub>2</sub> ) después de su administración por vía intraperitoneal (i.p.).....	77

#### **Tablas:**

<b>Tabla 1.</b> Propiedades físicas y químicas del cadmio (Cd) .....	15
<b>Tabla 2.</b> Propiedades químicas y físicas del cloruro de cadmio (CdCl <sub>2</sub> ) .....	15
<b>Tabla 3.</b> Características toxicodinámicas y toxicocinéticas del cadmio (Cd) .....	18
<b>Tabla 4.</b> Resumen de marcadores de daño renal .....	24
<b>Tabla 5.</b> Características de las diferentes formas de la glutatión peroxidasa (GPx) dependientes de selenio (Se).....	27
<b>Tabla 6.</b> Principales funciones del hígado .....	31
<b>Tabla 7.</b> Resumen de algunos marcadores de daño hepático .....	32
<b>Tabla 8.</b> Características de las especies reactivas de oxígeno (ERO) .....	35
<b>Tabla 9.</b> Características de las isoformas de la enzima superóxido dismutasa (SOD) que se encuentran en mamíferos.....	37
<b>Tabla 10.</b> Tipos de estudios toxicológicos .....	41
<b>Tabla 11.</b> Modelos de daño renal, hepático y estrés oxidante experimentales <i>in vivo</i> con ratas Wistar administradas con cloruro de cadmio (CdCl <sub>2</sub> ) informados en los últimos 10 años (2012-2022) .....	42
<b>Tabla 12.</b> Manifestaciones clínicas de la toxicidad aguda por cloruro de cadmio (CdCl <sub>2</sub> ) .....	62

#### **Índice de figuras suplementarias**

<b>Figura suplementaria 1.</b> Toxicocinética del cadmio (Cd). ....	96
<b>Figura suplementaria 2.</b> Relación entre las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR) en su actividad catalítica.....	97
<b>Figura suplementaria 3.</b> Peroxidación de lípidos .....	97
<b>Figura suplementaria 4.</b> Resultados de creatinina y nitrógeno de urea en sangre (BUN) de los modelos 1 y 2.....	98
<b>Figura suplementaria 5.</b> Resultados de toxicidad del modelo 2.....	99
<b>Figura suplementaria 3.</b> Curvas patrón representativas utilizadas .....	100

## Abreviaturas

$O_2^-$	Anión superóxido
<b>1M2F</b>	1-metil-2-fenilindol
<b>4-HNE</b>	4-hidroxinonenal
<b>aa</b>	Aminoácidos
<b>AAPH</b>	2,2'-Azobis (2-metilpropionamida)
<b>ABC</b>	Área bajo la curva
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ALP</b>	Fosfatasa alcalina
<b>ALT</b>	Alanina aminotransferasa
<b>As</b>	Arsénico
<b>ASB</b>	Albúmina sérica bovina
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferasa
<b>BHT</b>	Hidroxitolueno butilado
<b>BUN</b>	Nitrógeno de urea en sangre
$Ca^{2+}$	Calcio
<b>CAT</b>	Catalasa
<b>Cd</b>	Cadmio
$CdCl_2$	Cloruro de cadmio
<b>CDNB</b>	1-cloro-2,4-dinitrobenceno
$Cu^{2+}$	Cobre
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DMT-1</b>	Transportador de metal divalente 1
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EEM</b>	Error estándar de la media
<b>EGTA</b>	Etilenglicol-bis( $\beta$ -aminoetil éter)-ácido N,N,N', N' tetraacético
<b>ERC</b>	Enfermedad renal crónica
<b>ERO</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>FAD</b>	Flavin adenin dinucleótido
$Fe^{2+}$	Hierro
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
<b>GPx-C</b>	Glutación peroxidasa intracelular
<b>GPx</b>	Glutación peroxidasa
<b>GPx-P</b>	Glutación peroxidasa plasmática
<b>GPx-PH</b>	Glutación peroxidasa para fosfolipoperóxidos
<b>GR</b>	Glutación reductasa
<b>GSH</b>	Glutación
<b>GSSG</b>	Glutación disulfuro
<b>GST</b>	Glutación-S-transferasa
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina y eosina
$H_2O_2$	Peróxido de hidrógeno
<b>HCl</b>	Ácido clorhídrico
<b>Hg</b>	Mercurio
<b>hNGAL</b>	Receptor de la lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilo humano
<b>i.p</b>	Intraperitoneal

<b>IRA</b>	Insuficiencia renal aguda
<b>KCl</b>	Cloruro de potasio
<b>KIM-1</b>	Molécula 1 de lesión renal
<b>L·</b>	Radical lipídico
<b>LDH</b>	Lactato deshidrogenasa
<b>L-OO</b>	Radical peróxido
<b>LOO·</b>	Radical peroxilo
<b>LOOH</b>	Hidroperóxido
<b>MATE</b>	Proteínas de extrusión de múltiples fármacos y toxinas
<b>MDA</b>	Malondialdehído
<b>MDH</b>	Malato deshidrogenasa
<b>Mn<sup>2+</sup></b>	Manganeso
<b>MT</b>	Metalotioneínas
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	Carbonato de sodio
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Fosfato de sodio dibásico
<b>Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub></b>	Ortovanadato de sodio
<b>Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub></b>	Pirofosfato de sodio
<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b>NaF</b>	Fluoruro de sodio
<b>NAG</b>	N-acetil-β-D-glucosaminidasa
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Fosfato de sodio monobásico
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sodio
<b>NBT</b>	Nitroazul de tetrazoilo
<b>NGAL</b>	Lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NOX</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa
<b>Nrf2</b>	Factor de transcripción eritroide 2 relacionado con el factor 2
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxígeno
<b>OCT</b>	Transportador de cationes orgánicos
<b>OH</b>	Radical hidroxilo
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>ORAC</b>	Capacidad de absorción de radicales libres de oxígeno
<b>OUU</b>	Obstrucción unilateral de uréter
<b>Pb</b>	Plomo
<b>p.c</b>	Peso corporal
<b>PBS</b>	Amortiguador fosfato salino
<b>PHL-OOH</b>	Fosfolipoperóxidos
<b>PNP</b>	p-nitrofenol
<b>PVDF</b>	Fluoruro de polivinilideno
<b>RIPA</b>	Amortiguador de homogenización ensayo de radio inmunoprecipitación
<b>-ROOH</b>	Hidroperóxidos
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sodio
<b>Se</b>	Selenio
<b>SH</b>	Sulfhidrilo
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>TBS-T</b>	Amortiguador de tris base con tween

<b>TCP</b>	Túbulo contorneado proximal
<b>TFG</b>	Tasa de filtración glomerular
<b>TRPV6</b>	Canal selectivo de $\text{Ca}^{2+}$ de la familia de canales potenciales del receptor transitorio, miembro de subfamilia vanilloide 6
<b>VDCC</b>	Canales de calcio dependientes de voltaje
<b>XO</b>	Xantina oxidasa
<b>ZIP</b>	Proteína relacionada a Zrt e Irt
<b>Zn<sup>2+</sup></b>	Zinc

## Resumen

El cadmio (Cd) es un metal que induce nefrotoxicidad y hepatotoxicidad, ambas patologías se relacionan con el estrés oxidante como mecanismo de daño. En la literatura se describen modelos *in vivo* que lo demuestran, no obstante, presentan divergencia entre sus dosis y tiempo de administración, por lo que este trabajo tiene el objetivo de caracterizar un modelo *in vivo* agudo que haga evidente el daño renal, hepático y el estrés oxidante inducidos por cloruro de cadmio (CdCl<sub>2</sub>).

Se realizó la evaluación de creatinina y nitrógeno de urea en sangre (BUN), de tres modelos de diferentes dosis. Dado que en el último modelo se observó un cambio significativo en los niveles de BUN, se realizaron las demás determinaciones. Este modelo *in vivo* con ratas macho Wistar implicó la administración intraperitoneal (i.p.) de solución salina al 0.9%/día para el grupo control y de CdCl<sub>2</sub> 4 mg/kg de peso corporal (p.c.)/día para el grupo experimental, durante 4 días y al quinto día se realizó la eutanasia para obtener muestras de plasma, riñón e hígado.

Se encontró que no hay daño renal evidente pues sólo aumentó BUN, disminuyó la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) en plasma y la histología presentó un daño tubular local, mientras que no presentaron cambios significativos los marcadores de creatinina, la actividad de la N-acetil-β-D-glucosaminidasa (NAG) y los niveles de la molécula 1 de lesión renal (KIM-1) y de la proteína lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL). Por el contrario, se encontró daño hepático evidente ya que a pesar de no presentar cambios significativos de la alanina aminotransferasa (ALT) aumentó la aspartato aminotransferasa (AST), disminuyeron la abundancia de albúmina plasmática y las proteínas totales en plasma, y fueron evidentes un daño vacuolar en el citoplasma y alteraciones morfológicas. En cuanto al estrés oxidante, aumentó la concentración de malondialdehído (MDA) en ambos tejidos, además en hígado disminuyeron las actividades de GPx y de catalasa (CAT), sin embargo, las demás enzimas antioxidantes y la capacidad antioxidante en ambos tejidos no mostraron cambios significativos, aunque este último disminuyó en plasma. Por lo tanto, se sugiere que, para hacer evidente el daño renal, se empleen modelos crónicos por vía oral para el estudio de la toxicidad del Cd y así obtener resultados más contundentes.

## 1. Introducción

El cadmio (Cd) es un metal que últimamente ha cobrado importancia ya que su uso ha incrementado y el ser humano cada vez se encuentra más en contacto con este xenobiótico, pues debido a la contaminación por este metal se puede encontrar en los alimentos, en el aire y en el agua permitiendo el ingreso al organismo. China es el país con mayor contaminación por Cd [1] y México no es la excepción, pues se ha descrito acumulación de este metal en Coahuila por su actividad minera [2] y en las aguas costeras de la zona fronteriza y el sur de California por la advección del agua [3]. Dicha contaminación representa un problema de salud, porque la acumulación de este metal puede desencadenar trastornos como: infarto al miocardio, disfunción renal, neurodegeneración, Parkinson, Alzheimer, disfunción pulmonar y carcinogénesis [4].

Se han realizado estudios *in vitro* e *in vivo* que demuestran la nefrotoxicidad y hepatotoxicidad del Cd. El riñón y el hígado son órganos diana de este metal en los que se acumula tras una sobreexposición y como consecuencia genera efectos tóxicos [5]. Las alteraciones que suceden en estos órganos se han relacionado con el estrés oxidante, el cual se genera a partir del daño en la cadena respiratoria. El Cd induce indirectamente la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO). Además, este metal aumenta la expresión de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa (NOX) que catalizan la producción del anión superóxido ( $O_2^-$ ) y también ocasiona una alteración en las actividades de las enzimas antioxidantes como: glutatión peroxidasa (GPx), catalasa (CAT), glutatión reductasa (GR), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión S-transferasa (GST) [6], [7].

Los estudios *in vivo* son una aproximación más confiable a los efectos que tendría un xenobiótico en el organismo, no obstante, en el caso del Cd, se ha observado que presentan una divergencia en cuanto a sus dosis y tiempo de administración. En el caso de los modelos que proponen una vía de administración intraperitoneal (i.p.) para inducir el daño renal existen modelos agudos como el de Ansari et al. [8] que utilizaron una dosis de cloruro de cadmio ( $CdCl_2$ ) 3 mg/kg de peso corporal (p.c.)/día i.p. durante 7 días; modelos subagudos como el de Poontawee et al. [9] que utilizaron una dosis de  $CdCl_2$  2 mg/kg p.c./día i.p. durante 4 semanas y modelos

subcrónicos como el de Albasher et al. [10] que emplearon una dosis de CdCl<sub>2</sub> 3.5 mg/kg p.c./día i.p. durante 1 mes.

Dadas las diferencias entre los modelos descritos en la literatura para la inducción de la nefrotoxicidad y hepatotoxicidad del Cd, el objetivo de este trabajo es estandarizar un modelo de toxicidad aguda inducido por CdCl<sub>2</sub> *in vivo* en ratas macho Wistar que haga evidente los efectos nefrotóxicos, hepatotóxicos y de estrés oxidante del Cd que se han descrito hasta el momento. Se realizó mediante la administración i.p. de CdCl<sub>2</sub>. El daño renal se evaluó a través de la determinación de distintos biomarcadores como: nitrógeno de urea en sangre (BUN), creatinina, la actividad de la GPx en plasma, la N-acetil-β-D-glucosaminidasa (NAG), la molécula 1 de lesión renal (KIM-1), la lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL) y la evaluación histológica del riñón con la tinción con hematoxilina y eosina (H&E). El daño hepático se evaluó con los biomarcadores: proteínas totales en plasma, aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), albúmina plasmática y la evaluación histológica del hígado. Mientras que el estrés oxidante se evaluó por medio de los biomarcadores: malondialdehído (MDA), la capacidad de absorción de radicales libres de oxígeno (ORAC) y la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx, GR y GST.

## 2. Antecedentes (marco teórico)

### 2.1. Cd

- **Características generales del Cd y CdCl<sub>2</sub>**

El Cd es un metal blando, dúctil y maleable, con número atómico 48, ubicado en el grupo 12, bloque d y período 5 de la tabla periódica, siendo su configuración electrónica: [Kr] 4d<sup>10</sup> 5s<sup>2</sup> [11], [12]. En la Tabla 1 se presentan las principales características químicas y físicas del Cd.

**Tabla 1. Propiedades químicas y físicas del cadmio (Cd) [12], [13].**

Propiedad	Valor	Propiedad	Valor
Peso molecular	112.41 g/mol	Punto de fusión	321 °C
Color	Blanco plateado	Solubilidad	Es insoluble en agua y en algunos disolventes orgánicos como: alcoholes, éteres y cetonas
Olor	Inodoro	Densidad	8.6 g/cm <sup>3</sup>
Punto de ebullición	767°C	Estabilidad	Se oxida lentamente en presencia de humedad. Si se calienta desprende vapores de óxido de cadmio.

El Cd se encuentra principalmente en su forma iónica como Cd<sup>2+</sup> [14] y puede presentarse en diversos compuestos como el CdCl<sub>2</sub>, el cual es un compuesto soluble en agua y se encuentra en forma sólida cristalina [15]. En la Tabla 2 se presentan las principales características químicas y físicas del CdCl<sub>2</sub>.

**Tabla 2. Propiedades químicas y físicas del cloruro de cadmio (CdCl<sub>2</sub>) [15], [16].**

Propiedad	Valor	Propiedad	Valor
Peso molecular	183.32 g/mol	Punto de fusión	568°C
Color	Blanco	Solubilidad	Soluble en agua
Olor	Inodoro	Densidad	4.047 g/cm <sup>3</sup>
Punto de ebullición	960°C	Estabilidad	Cuando se calienta emite vapores tóxicos.

- **Fuentes de exposición al Cd y efectos tóxicos generales**

El ser humano se encuentra en contacto constante con el Cd principalmente a través de alimentos contaminados como el pescado, mariscos, champiñones, mejillones, cacao en polvo e hígado de animales comestibles, la inhalación de humos, el agua



contaminada, el tabaquismo, los combustibles fósiles, la producción de hierro y acero, la incineración de residuos, la actividad volcánica, la minería y el uso de algunos fertilizantes [5], [17], [18].

Más del 80% del Cd ingerido proviene de los cereales como el arroz y el trigo, de verduras de hoja y de raíces como papa y zanahoria. No obstante, existen cantidades permisibles de este metal dentro de la dieta, un valor límite permisible según la Organización Mundial de la Salud (OMS) es de máximo 7  $\mu\text{g}/\text{semana}/\text{kg}$  p.c. A partir de 100 mg ingeridos pueden aparecer síntomas de toxicidad y con 350 mg se considera una cantidad mortal. Otra de las principales fuentes de exposición a Cd es a través del cigarro, que puede contener de 1 a 2  $\mu\text{g}$  de Cd. Además, el humo del cigarro contribuye a la contaminación ambiental por este metal, por lo que es importante considerar que concentraciones ambientales superiores a 200  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  genera la aparición de los primeros síntomas de toxicidad y mayor a 5,000  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  se considera mortal [17].

El Cd es parte de los metales que contaminan el aire, el suelo y el agua en distintos países, siendo China mayormente afectado, pues se ha informado que existe acumulación de Cd en los cultivos de arroz (1.3 x 10<sup>4</sup> ha de suelo cultivado contaminado por Cd), lo que propicia que este metal sea ingerido por la población, pues este cereal es parte fundamental de su dieta. Las principales fuentes de contaminación por metales en suelo son por el fondo geológico y las actividades antropogénicas como actividades mineras, empleo de fertilizantes fosfatados y el riego de aguas residuales [1].

México no es la excepción respecto a las concentraciones de Cd, pues un ejemplo de ello es que se ha encontrado que existe una acumulación de este metal en las aguas costeras de la zona fronteriza y el sur de California, lo cual es consecuencia de procesos físicos de advección de agua [3]. Otro ejemplo es la zona de la ciudad de Torreón en el estado de Coahuila, la cual es de los lugares en la República Mexicana con mayor contaminación por metales como el Cd, debido a su gran actividad en la extracción de minerales, por lo que sus habitantes están expuestos al agua, suelo y aire que sobrepasan los límites permisibles para humanos [2].

Dada la gran exposición del ser humano a este metal es importante conocer los efectos tóxicos que genera, los cuales dependen de la dosis, el tiempo y el tipo de exposición, así como de las características y los hábitos de las personas. La intoxicación de este metal se clasifica de acuerdo al tiempo de exposición en agudas o crónicas, siendo predominante en la población la intoxicación crónica, también se puede clasificar con base en la vía de exposición en inhalatoria y enteral [17].

Las principales manifestaciones clínicas agudas causadas por la inhalación y/o ingestión de altas concentraciones de Cd son irritación de piel y ojos, fiebre, alteraciones digestivas, dolor torácico, disnea, edema agudo de pulmón, anemia, albuminuria, hepatitis y anuria. Por otro lado, los efectos crónicos ocasionados por este metal son enfisema pulmonar, enfermedad de los túbulos renales, daño glomerular, insuficiencia renal y cáncer de pulmón, entre otros más. El Cd provoca efectos en especial en pulmón, huesos, riñón e hígado, acumulándose principalmente en los últimos dos, siendo su tiempo de vida media biológica en humanos de 10-30 años [17], [18].

- **Toxicocinética del Cd**

En situaciones cotidianas, el Cd ingresa al organismo del ser humano principalmente por vía cutánea, por medio de la inhalación y/o de la ingestión. Posteriormente el Cd se retiene y se absorbe en su forma iónica ( $\text{Cd}^{2+}$ ) en el tracto gastrointestinal (a través del intestino) o en los pulmones dependiendo de la vía de ingreso. Una vez absorbido el  $\text{Cd}^{2+}$  entra a la circulación sistémica donde se une a proteínas como la albúmina y a metalotioneínas (MT) las cuales son proteínas de bajo peso molecular (6-7 kDa) que contienen una gran proporción de residuos de cisteína por lo que tienen 26 grupos sulfhidrilo (SH) libres por molécula y tienen la función de unirse a los metales pesados que ingresan al organismo. Se sabe que existen dos tipos de MT, de las cuales la MT-1 se une inestablemente al Cd que se encuentra en plasma y se dirige al riñón, en dicho órgano cuando se acumula el Cd se une a la MT-2 al igual que en el hígado [5], [19], [20].

La absorción del Cd está mediada por distintos transportadores, acarreadores y canales que tienen la misión de obtener nutrimentos indispensables como hierro ( $\text{Fe}^{2+}$ ), zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ), calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y manganeso ( $\text{Mn}^{2+}$ ). Algunos de éstos son el

transportador de metal divalente 1 (DMT-1), la proteína relacionada a Zrt e Irt (ZIP) de la familia de transportadores de zinc, el canal selectivo de  $\text{Ca}^{2+}$  de la familia de canales potenciales del receptor transitorio, miembro de la subfamilia vanilloide 6 (TRPV6) y el receptor de la lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilo humano (hNGAL). Se ha descrito que ZIP8, ZIP14 y la calbindina la cual es una proteína de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  participan en la mediación de la absorción del  $\text{Cd}^{2+}$  y en su transporte citoplasmático a la superficie de la célula basolateral y la salida del enterocito a la circulación [20].

El Cd se acumula en diversos órganos, en general primero llega al hígado por medio de la vena porta (cuando ingresa por medio de la ingesta) y con el tiempo se acumula en el riñón. El complejo albúmina-Cd llega al hígado y se degrada, por lo que el  $\text{Cd}^{2+}$  se une a las MT-2, posteriormente se transporta al riñón, en dicho órgano actúan la megalina y la cubilina como mediadores del transporte del complejo Cd-MT. También se forman vacuolas, las cuales se fusionan con los lisosomas dando como resultado que el complejo se disocie dejando libre al Cd, formando de nuevo el complejo con MT y se acumula, además al incrementar su concentración intracelular inhibe a las proteínas de extrusión de múltiples fármacos y toxinas (MATE) de las células renales. Finalmente, el Cd que no fue absorbido y/o acumulado se excreta por medio de orina, heces y sudor [5], [14], [19] (Figura suplementaria 1).

Para terminar de comprender la toxicocinética del Cd es importante considerar sus valores en los parámetros toxicocinéticos (Tabla 3).

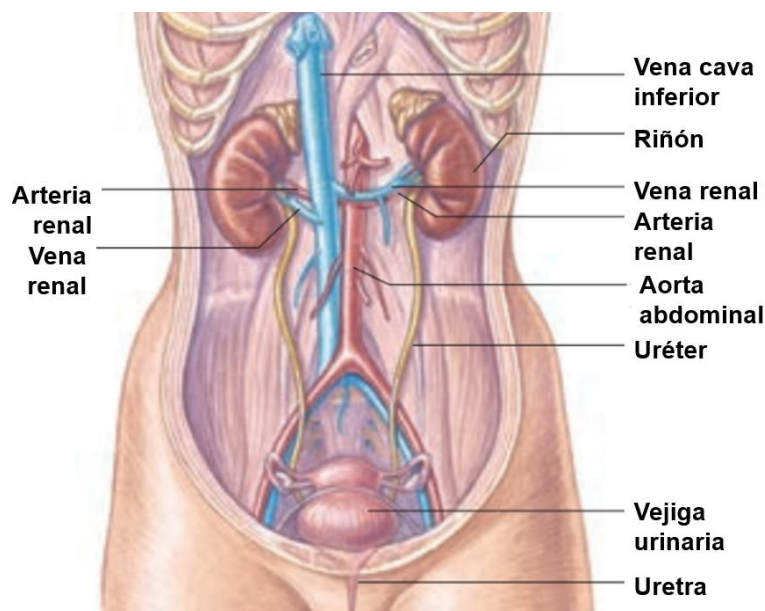
**Tabla 3. Características toxicodinámicas y toxicocinéticas del cadmio (Cd) [5].**

Parámetro toxicodinámico/toxicocinético del Cd	Valor
Vida media en nasofaringe y traqueobronquios	< 24 h
Vida media en sangre	2, 5 meses
Vida media en riñón	4 a 60 años
Vida media en hígado	4 a 19 años
Vida media en el organismo total	30 a 40 años
Promedio del periodo total de absorción	14 días
% absorción gastrointestinal	5 %
Excreción urinaria: vida media	10 a 40 años

## 2.2. Nefrotoxicidad del Cd

- **Morfología y fisiología renal y del sistema urinario**

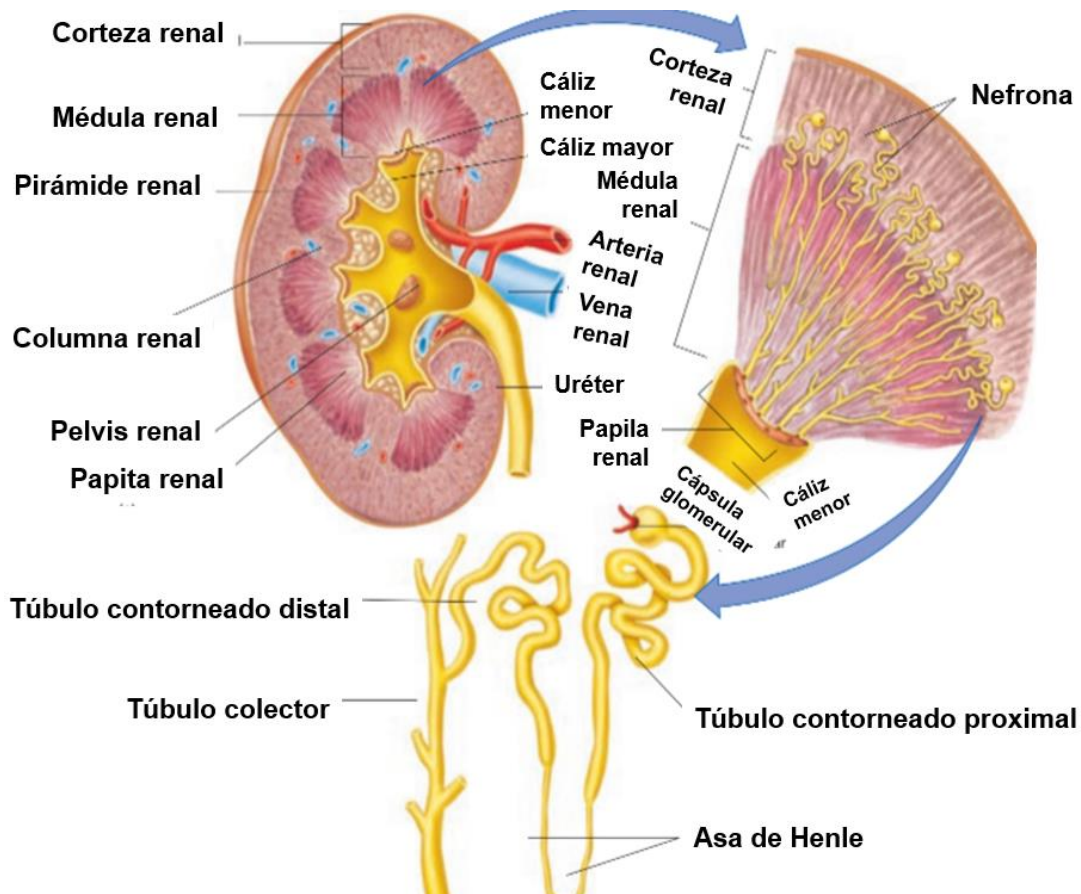
Macroscópicamente el sistema urinario (Figura 1) se compone de un par de riñones los cuales se encuentran en los costados de la columna vertebral, debajo del diafragma y el hígado, fuera de la cavidad peritoneal. El riñón consta de dos regiones: la corteza que es la más externa con una gran cantidad de capilares y la médula, la cual es la región más profunda y posee túbulos, vasos sanguíneos y 8-15 pirámides renales cónicas separadas por columnas renales. Cada uno de los riñones contienen túbulos que se vacían en una cavidad drenada por el uréter, estos reciben un filtrado de la sangre desde el glomérulo que conforme avanza en los túbulos se convierte en orina, cumpliendo con su función de eliminar los productos de desecho del metabolismo, además de regular el volumen sanguíneo, la concentración de los productos de desecho en el plasma, la presión arterial y la concentración de electrolitos en el plasma y su pH [21], [22]. El uréter, así como los cálices y la pelvis contribuyen al vaciamiento de la orina, la vejiga urinaria que es un lugar de almacenamiento para la orina, se drena por la uretra tubular [21].



**Figura 1. Sistema urinario de una mujer.** Imagen editada del libro *Fisiología humana* de Fox, S. (2011) [21].

Microscópicamente el riñón se conforma de nefronas, las cuales son su unidad funcional y se encuentra formada de túbulos y vasos sanguíneos. Las nefronas constan de un cúmulo de capilares glomerulares (glomérulo cubierto de la cápsula

de Bowman), un túbulo contorneado proximal (TCP), una rama descendente del asa de Henle, una rama ascendente del asa de Henle y un túbulo contorneado distal (Figura 2) [21], [22].



**Figura 2. Estructura del riñón.** Sección coronal del riñón, una pirámide renal y un túbulo nefrónico. Imagen editada del libro *Fisiología humana* de Fox, S. (2011) [21].

El líquido filtrado de los capilares glomerulares circula hacia la cápsula de Bowman y posteriormente ingresa al TCP (lugar donde se lleva a cabo la reabsorción) pasa al asa de Henle en donde es conducido hacia la médula renal por la rama descendente del asa y se regresa a la corteza por medio del asa ascendente, cuando esto sucede el túbulo tiene una disposición helicoidal y se denomina túbulo contorneado distal, éste se une a un túbulo colector el cual recibe y drena el líquido avanzando hacia el cáliz menor para así vaciar la orina a través de la pelvis renal y fuera del riñón hacia el uréter [21], [22].

Cabe mencionar que la excreción de diferentes sustancias por medio de la orina depende de la filtración glomerular, la reabsorción de los túbulos renales hacia la

sangre y la secreción de sustancias. En la homeostasis los electrolitos se reabsorben en mayor medida por lo que se desecha una mínima cantidad de éstos por la orina, y respecto a los aminoácidos y a la glucosa se reabsorben por completo por lo tanto no aparecen en la orina [22].

- **Nefrotoxicidad y daño renal agudo**

Se denomina nefrotoxicidad a la afectación renal por sustancias tóxicas que pueden ingresar al organismo por distintas vías (enteral, parenteral e inhalatoria) que generalmente se caracterizan por generar directamente o indirectamente (con sus metabolitos) alteraciones funcionales como es el caso de la insuficiencia renal aguda (IRA), o estructurales como es el caso de la necrosis tubular aguda [23].

En general las alteraciones renales se consideran como un conjunto de patologías diversas con un cuadro sintomático específico. Dentro de estas patologías se encuentran 9 principales síndromes renales los cuales son: hematuria, proteinuria, síndrome nefrótico, síndrome nefrítico, hipertensión arterial, falla renal aguda, enfermedad renal crónica (ERC), tubulopatías e infecciones urinarias [24].

Se ha descrito que el número de pacientes que padecen enfermedades renales aumentó hasta una cifra de más del 10% de la población a nivel mundial que presentan la ERC, es decir que más de 800 millones de personas tienen este padecimiento, siendo más propensas las personas que tienen diabetes mellitus, presión arterial alta, tabaquismo y obesidad [25], [26]. Dado lo anterior es importante que las enfermedades renales sean detectadas, monitoreadas y tratadas [26], [27].

Cabe mencionar que el daño renal agudo se define como una disminución abrupta del filtrado glomerular, con el consiguiente aumento de la concentración de productos nitrogenados en circulación [28].

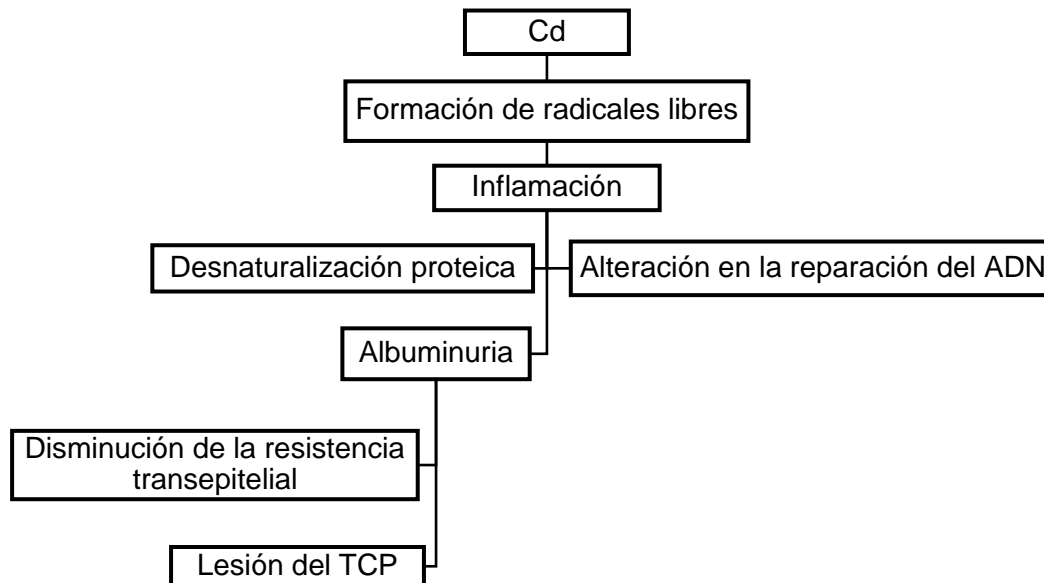
- **Nefrotoxicidad y Cd**

Actualmente la insuficiencia renal crónica se considera como un problema creciente de salud pública, el cual ha incrementado conforme el paso del tiempo, siendo más susceptibles a la nefrotoxicidad del Cd las personas con nefropatía diabética o un daño renal previo. Una de las principales fuentes de la insuficiencia renal es la

exposición a metales pesados que afectan al riñón como el Cd, plomo (Pb), arsénico (As) y mercurio (Hg) [27], [29].

El Cd es un xenobiótico nefrotóxico no indispensable para el organismo que tiende a dañar y a acumularse en el riñón, siendo su blanco el TCP (Figura 3). Posterior a una exposición a este metal se une en circulación a la albúmina, después se transporta al hígado en donde forma un complejo MT-Cd que es secretado en la bilis, posteriormente es filtrado en el glomérulo y reabsorbido por el TCP. El complejo MT-Cd se disocia en los lisosomas dejando al Cd libre que se acumula principalmente en el epitelio, en la parte intracelular de las células del TCP y en la mitocondria, en esta última actúa inhibiendo principalmente el complejo III de la cadena respiratoria, aunado a esto propicia la formación de radicales libres, la activación de la vía de las caspasas, la apoptosis y la necrosis de las células del TCP. Además, el Cd compite con otros metales que son indispensables como el  $Zn^{2+}$ , cobre ( $Cu^{2+}$ ),  $Fe^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  y tiene afinidad a los grupos SH de las proteínas alterando su estructura y por ende su función. Cuando llega a niveles que rebasan la tolerancia a Cd y la capacidad de desintoxicación del organismo se manifiestan signos y síntomas de nefrotoxicidad, lo cual se expresa clínicamente con proteinuria de bajo y alto peso molecular, presencia de enzimas como NAG, modificaciones en la filtración glomerular, calciuria, aminoaciduria, bicarbonaturia, glucosuria, fosfaturia, alteraciones en los niveles de marcadores de daño renal como creatinina, urea y BUN, entre otros más [5], [19], [20], [27], [29].

El daño renal generado por Cd se expresa generalmente en alteraciones funcionales de la tubulopatía, las cuales son principalmente una alteración en la reabsorción de proteínas filtradas, es decir que el Cd afecta a las células del TCP, éstas pierden su función de reabsorción y las proteínas son filtradas por los glomérulos por lo que al no ser reabsorbidas son excretadas por medio de la orina, pérdida de nefronas reduciendo la tasa de filtración glomerular (TFG) [20].



**Figura 3. Fisiopatología general y mecanismo del daño renal inducido por cadmio (Cd).** El cadmio (Cd) se acumula en la mitocondria dañando a la cadena respiratoria y aumenta la producción de radicales libres. Además, activa la vía de las caspasas generando apoptosis e inflamación. El Cd también se une a los grupos sulfhidrido (SH) de las proteínas alterando su estructura y función, de manera simultánea inhibe la respuesta al daño en el ácido desoxirribonucleico (ADN). Dentro de las manifestaciones clínicas que aparecen es la excreción de albúmina y la disminución de la resistencia transepitelial. Finalmente, el daño renal generado por el Cd se concentra principalmente en el túbulo contorneado proximal (TCP). Imagen modificada del artículo de Días, J. y Arceo, E., publicado en 2017 [29].

### 2.3. Evaluación del daño renal inducido por Cd: biomarcadores

En las investigaciones que pretenden la evaluación de los efectos tóxicos de xenobióticos ya sean estudios *in vivo* o *in vitro* se hace uso de biomarcadores los cuales se consideran como cualquier respuesta biológica a un xenobiótico que se puede cuantificar, ya sea a nivel funcional o molecular con el que se pueda identificar una alteración en las condiciones normales [30].

Un biomarcador debe cumplir al menos con las siguientes características [30]:

- Relación de causalidad.
- Magnitud dosis-dependiente.
- Existencia de un método de evaluación y forma precisa de expresar toxicidad.

Los biomarcadores se pueden clasificar en biomarcadores de exposición, de efecto y de susceptibilidad, en este caso, los biomarcadores empleados para el daño renal son en general de efecto, los cuales se definen como aquellos componentes



endógenos, medidas de capacidad funcional o algún indicador del estado del organismo o de un órgano en específico [30]. Los marcadores de daño renal mayormente empleados en investigación y/o en la clínica se presentan resumidos en la Tabla 4.

**Tabla 4. Resumen de marcadores de daño renal.**

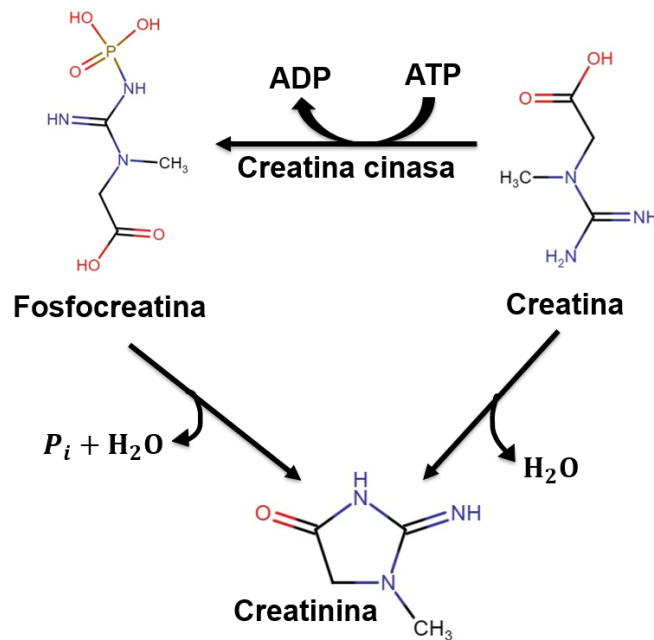
Marcador / parámetro de daño renal	Tipo de daño que detecta	Limitaciones / desventajas
Creatinina sérica [28]	Filtración glomerular [28]	<ul style="list-style-type: none"> <li>No es específico ni sensible al daño renal.</li> <li>Es afectada por otros factores.</li> <li>Se necesita de al menos el 50% de disminución en la filtración glomerular para que eleven sus niveles [28].</li> </ul>
BUN [28], [31]	Filtración glomerular [28]	<ul style="list-style-type: none"> <li>No es específico de daño renal.</li> <li>Sus valores son afectados por otros factores [28], [31].</li> </ul>
GPx en plasma [32]–[34]	Daño en túbulos proximales [33]	<ul style="list-style-type: none"> <li>Se relaciona también con el estrés oxidante [34].</li> </ul>
NAG [27], [35]	Daño tubular [27]	<ul style="list-style-type: none"> <li>Existe la contribución de las enzimas provenientes del plasma en la NAG urinaria [50].</li> </ul>
KIM-1 [28], [36]	Daño tubular proximal [36]	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tiene un efecto protector al inicio del daño renal y después genera un efecto perjudicial.</li> <li>Su incremento está influenciado por la regeneración del riñón [36].</li> </ul>
NGAL [37]–[39]	Daño tubular tanto proximal como distal [38]	<ul style="list-style-type: none"> <li>Afectado por otras condiciones como la inflamación sistémica y la sepsis [38].</li> </ul>
Tinción H&E [40]	Daño tubular y en glomérulos, necrosis y alteración en morfología [40].	<ul style="list-style-type: none"> <li>La técnica no permite ver de forma adecuada algunos componentes estructurales como elastina, fibras reticulares, membranas basales y lípidos [40].</li> </ul>

Abreviaturas: BUN: nitrógeno de urea en sangre, GPx: glutatión peroxidasa, NAG: N-acetil-β-D-glucosamina, KIM: molécula 1 de lesión renal, NGAL: lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos, H&E: hematoxilina y eosina.

#### • Creatinina

La creatinina es un producto metabólico no enzimático de la creatina (componente de los músculos) y la fosfocreatina. En condiciones normales se produce desde el tejido muscular esquelético, se filtra a nivel glomerular, no se reabsorbe y se secreta

por el túbulo proximal [41]. La creatina es un ácido orgánico nitrogenado que se encuentra en equilibrio con el fosfato de creatina para finalmente por medio de una reacción de deshidratación obtener creatinina (Figura 4) [42].

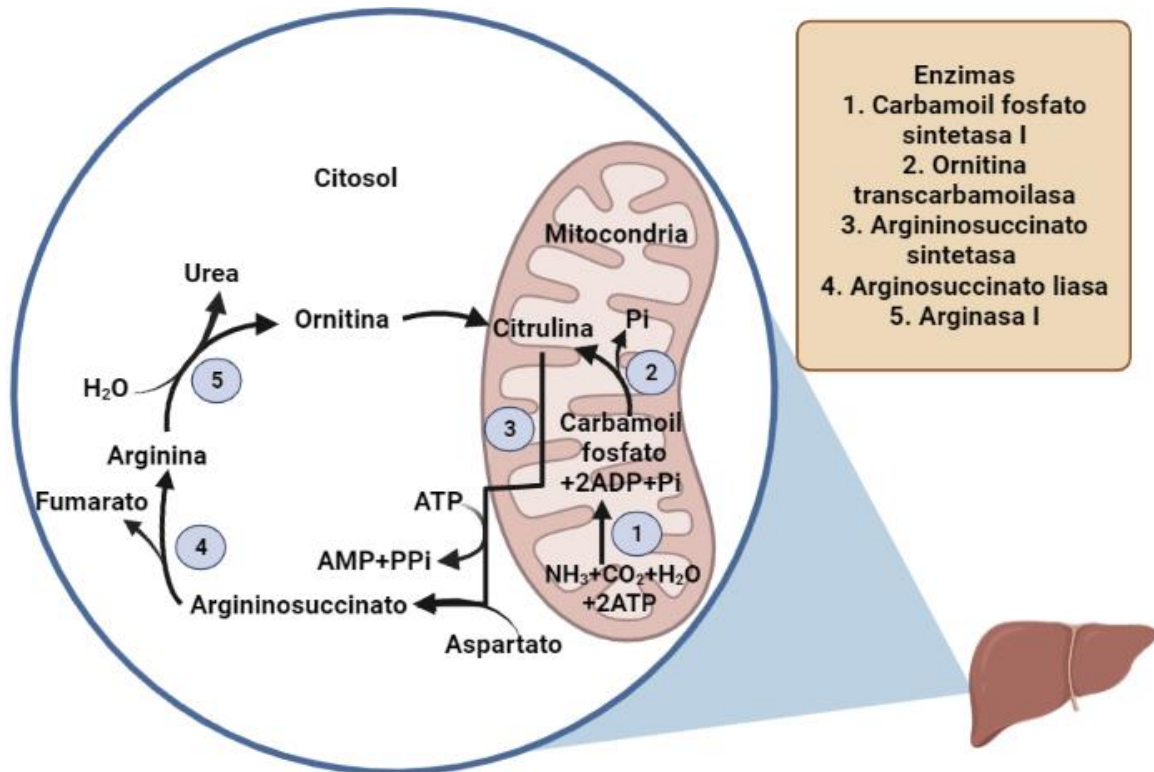


**Figura 4. Síntesis de la creatinina.** La creatina se transporta al músculo esquelético y cardíacos donde la creatina cinasa la convierte en fosfocreatina. Posteriormente a través de una reacción de deshidratación espontánea de la creatina o de la fosfocreatina en el músculo dan lugar a creatinina. Finalmente, la creatinina se elimina por medio de del riñón [42]. La figura fue creada con <https://www-reaxys-com.pbidi.unam.mx:2443/#/structure-editor>.

Es considerado como un marcador de daño renal, en específico de filtración glomerular, ya que en la insuficiencia renal la creatinina se retiene en la sangre por lo que incrementan sus niveles séricos, sin embargo no es sensible ni específico debido a que es necesario que exista una disminución del 50% de la filtración glomerular para que incremente significativamente su concentración, además de que existen otros factores de los que depende, por ejemplo la masa muscular (con gran masa muscular aumenta y con sarcopenia disminuye), la función hepática, el volumen de distribución, edad, sexo, dieta (rica en proteína aumenta los niveles y dietas vegetarianas los disminuyen), metabolismo muscular, ejercicio (ejercicio extenuante la aumenta), consumo de medicamentos (cimetidina y trimetoprima bloquean la secreción tubular de creatinina) e hidratación [28], [41] por lo que es necesario emplear otros marcadores para corroborar el diagnóstico de una enfermedad renal.

- **BUN**

El BUN es un subproducto sérico del metabolismo de productos nitrogenados como las proteínas. La urea es formada por las enzimas del ciclo de la urea y se forma en el hígado, después se dirige por circulación al riñón y se filtra en el glomérulo. El ciclo de la urea se da en cinco reacciones, de los cuales las dos primeras ocurren en las mitocondrias y las demás en el citosol (Figura 5) [43], [44].



**Figura 5. Ciclo de la urea.** La síntesis de urea se da en el hígado. Se forma en dos fases, la primera ocurre en las mitocondrias de las células hepáticas, en donde se forma el carbamoil fosfato y posteriormente la citrulina, la segunda fase se lleva a cabo en el citosol, donde se forma el argininosuccinato, la arginina y la ornitina, en esta última reacción también se forma la urea [44]. La figura fue creada con BioRender.com.

En la clínica se utiliza la cuantificación de BUN como un índice de la función renal [44]. Un aumento en sus valores séricos significa un daño en la filtración glomerular, sin embargo, no es un marcador específico debido a que puede elevarse por una insuficiencia cardíaca, una hipovolemia, una dieta hiperproteica, una hemorragia digestiva, por mencionar algunos ejemplos [28], [31], [44], [45]. Dado lo anterior, es necesario medir al menos la concentración de creatinina para un diagnóstico más certero para descartar la influencia de factores externos [45].

- **GPx en plasma**

La GPx es una familia de enzimas antioxidantes que consta de tres formas: una forma intracelular (GPx-C), una forma extracelular o plasmática (GPx-P) y una forma con actividad específica para los fosfolipoperóxidos (GPx-PH). Las GPx desintoxican del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y/o de los hidroperóxidos lipídicos utilizando como agente reductor al glutatión (GSH) [32]–[34], [46].

La GPx es dependiente del selenio (Se) que se encuentra principalmente en plasma y contiene un residuo de selenocisteína en cada una de sus subunidades idénticas [33], [46]. La GPx-P cataliza la reducción del  $H_2O_2$  a expensas del GSH, también ayuda a eliminar las ERO. Esta proteína se secreta de las células tubulares proximales renales y de las células epiteliales parietales de la cápsula de Bowman [34], [47]. Dado lo anterior se ha relacionado la actividad de la enzima GPx con la condición en la que se encuentra el riñón, de modo que una disminución de ésta indicaría un daño renal [32]. En el caso de las GPx-PH tiene como sustratos principales a los fosfolipoperóxidos (PHL-OOH), esta enzima evita la oxidación de los lipoperóxidos (L-OOH) ya que éstos son tóxicos y generan ERO como los radicales peroxilo [34]. En la Tabla 5 se encuentran las características de las diferentes formas de la GPx.

**Tabla 5. Características de las diferentes formas de la glutatión peroxidasa (GPx) dependientes de selenio (Se) [34].**

Característica	GPx -C	GPx-P	GPx-PH
Estructura	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enzima tetramérica.</li> <li>• Cada subunidad contiene un átomo de Se unido a una molécula de cisteína.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enzima tetramérica.</li> <li>• Cada subunidad contiene un átomo de Se unido a una molécula de cisteína.</li> <li>• Proteína glicosilada con puentes disulfuros intracelulares.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enzima monomérica.</li> <li>• Posee un átomo de Se.</li> </ul>
Peso molecular	22 kD por subunidad	25 kD por subunidad	18 kD
Actividad biológica	Tiene mayor afinidad por el $H_2O_2$ que por los L-OOH.	Tiene afinidad similar por el $H_2O_2$ y L-OOH.	Los PHL-OOH son sus sustratos principales.

Abreviaturas: GPx -C: glutatión peroxidasa intracelular, GPx-P: glutatión peroxidasa plasmática, GPx-PH: glutatión peroxidasa para fosfolipoperóxidos,  $H_2O_2$ : peróxido de hidrógeno, L-OOH: lipoperóxidos, PHL-OOH: fosfolipoperóxidos.

- **NAG**

La NAG es un enzima lisosomal que tiene un peso molecular de 130 kDa, posee tres isoenzimas: A, B e I, de las cuales las A y B se localizan en el túbulo proximal, la forma A es comúnmente excretada por la orina con trazas de la forma B prácticamente indetectables y de la forma I. Dado que la actividad de NAG en orina (especialmente de la isoenzima B) aumenta debido al daño en el túbulo renal y que el alto peso molecular que posee afecta a la filtración glomerular, se considera un marcador de daño renal. No obstante, se ha descrito que tiene poca especificidad y puede haber una contribución variable en la NAG urinaria por parte de las enzimas tubulares que se presentan en la orina a partir de las enzimas filtradas del plasma. Además, la NAG puede incrementar en orina debido a la exposición a metales pesados, infecciones del tracto urinario, reflujo vesicoureteral, rechazo de injerto renal, hipertensión arterial y diabetes mellitus, [27], [35], [48]–[50].

- **KIM-1**

La KIM-1 es una glicoproteína transmembrana del túbulo proximal, que en condiciones normales tiene una muy baja o nula expresión, por el contrario, cuando hay un daño en el túbulo proximal, incrementa su expresión en las células epiteliales de los túbulos proximales, principalmente en orina y sangre, por ello es considerado como un biomarcador de daño renal, no obstante se ha descrito que el incremento en su actividad también puede ser consecuencia del uso de fármacos nefrotóxicos, isquemia y el proceso de restauración del riñón [20], [27], [28], [36], [37], [51], [52]. Esta proteína participa en el proceso de regeneración después de presentarse un daño epitelial y cuando incrementa su expresión inhibe la proliferación y la actividad de las células T efectoras conduciendo al aumento del contenido de las células Treg en el tejido renal [28], [51], [52]. Cabe mencionar que se ha descrito que KIM-1 puede tener un efecto protector al inicio del daño renal y después generar un efecto perjudicial por la proliferación celular excesiva causada por la reparación renal inducida por la misma [36].

- **NGAL**

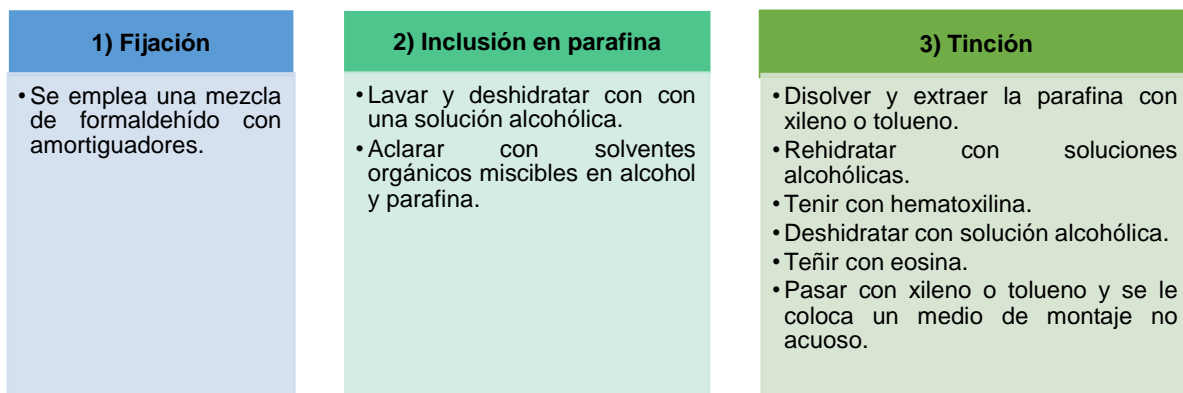
La NGAL es una proteína perteneciente a la familia de las lipocalinas, las cuales transportan pequeñas moléculas hidrófobas y se relacionan con el proceso de inflamación, la síntesis de prostaglandinas y el transporte de feromonas. Tiene tres

isoformas: un monómero de 25 kDa, un homodímero disulfuro de 45 kDa y un heterodímero de 135 kDa. El monómero y el homodímero son sintetizados por los neutrófilos mientras que las células epiteliales tubulares renales sintetizan el monómero y en menor cantidad el heterodímero [37]–[39], [53].

Es considerado un biomarcador para la predicción temprana de la lesión renal aguda con mayor rapidez en su respuesta a comparación de otros biomarcadores como la creatinina, debido a que se filtra a nivel tubular proximal por endocitosis y cuando se presenta una lesión del epitelio tubular proximal se altera su reabsorción, por lo tanto, se incrementa su expresión por células epiteliales tubulares en respuesta a lesiones y daño tubulointersticial, daño en glomérulos y túbulos proximales. Es importante considerar que se encuentra influenciado por otras condiciones como la preeclamsia, el cáncer, la inflamación sistémica y la sepsis [37]–[39], [53], [54].

- **Tinción H&E**

La tinción H&E es un método que se emplea para evidenciar características estructurales de los tejidos. La tinción se realiza con dos colorantes los cuales son hematoxilina que tiene propiedades similares a los colorantes básicos (tiene una carga neta positiva) y la eosina que es un colorante ácido (tiene una carga neta negativa). Los colorantes básicos reaccionan con los componentes aniónicos de las células y de los tejidos mientras que los colorantes ácidos reaccionan con los grupos catiónicos en las células y los tejidos, en especial con los grupos amino ionizados de las proteínas [40]. Los pasos que conforman la metodología de esta tinción se presentan en la Figura 6 [40]:



**Figura 6. Metodología de la tinción con hematoxilina y eosina (H&E) [40].**

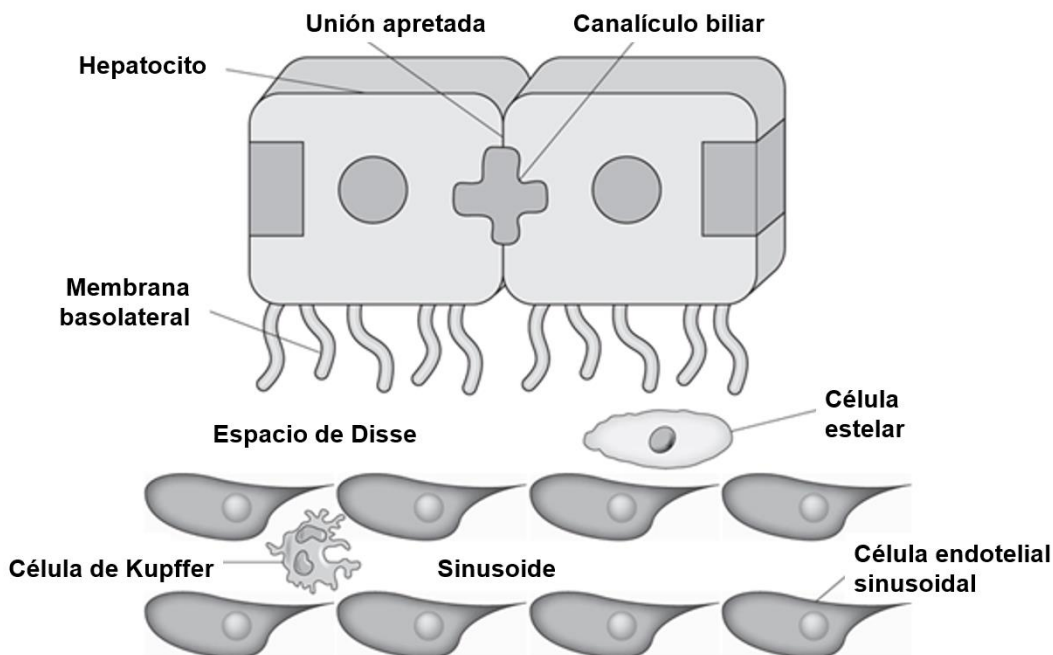
## 2.4. Hepatotoxicidad del Cd

### • Morfología y fisiología hepática

El hígado es un órgano que se conforma macroscópicamente de los lóbulos derecho, izquierdo, caudado y cuadrado. Los lóbulos izquierdo y derecho se subdividen en ocho segmentos (cuatro para cada lóbulo) y en general tiene dos superficies principales denominadas diafragmática y visceral, las cuales son separadas por un borde inferior [55], [56].

Las unidades funcionales son los lobulillos hepáticos, los cuales tienen en el centro ramas de la vena porta hepática y de la arteria hepática que se abren a los sinusoides localizados que se encuentran entre las láminas hepáticas. Cabe mencionar que el camino que recorren los productos de la digestión es pasar a los capilares del tubo digestivo los cuales los envían en la vena porta que conduce a los capilares del hígado y después llegan a circulación sistémica por medio de la vena hepática [55].

Existen diversos tipos de células que se encuentran en el hígado, tal como se presenta en la Figura 7, además es un órgano que tiene una amplia gama de funciones las cuales se resumen en la Tabla 6 [55].



**Figura 7. Tipos de células del hígado.** Diversos tipos de células componen al hígado, las cuales en general son las células del parénquima conformadas por los hepatocitos, las células de Kupffer y las que conforman el epitelio biliar, las células

sinusoidales que son las células endoteliales y las células perisinusoidales que son las células estelares. Imagen editada del *Capítulo 40. Fisiología hepática en: Gastroenterología* de Chávez N, Méndez N, Uribe M. (2010) [55].

**Tabla 6. Principales funciones del hígado.** Tabla modificada del *Capítulo 40. Fisiología hepática en: Gastroenterología* de Chávez N, Méndez N, Uribe M. (2010) [55].

Tipo de función	Acciones
Detoxificación de la sangre	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fagocitosis por las células de Kupffer.</li> <li>• Modificación química de moléculas con actividad biológica (hormonas y fármacos).</li> <li>• Producción de urea y ácido úrico.</li> </ul>
Metabolismo de los carbohidratos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gluconeogénesis.</li> </ul>
Metabolismo lipídico	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Síntesis de triglicéridos y colesterol.</li> <li>• Excreción de colesterol en la bilis.</li> <li>• Producción de cuerpos cetónicos.</li> </ul>
Metabolismo proteínico	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Producción de albúmina.</li> <li>• Producción de proteínas plasmáticas de transporte.</li> <li>• Producción de algunos factores de coagulación como fibrinógeno y protrombina.</li> </ul>
Secreción de bilis	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Síntesis de sales biliares.</li> <li>• Conjugación y excreción de bilirrubina.</li> </ul>

- **Hepatotoxicidad**

Se define hepatotoxicidad como una lesión en el hígado o deterioro de la función hepática como consecuencia de una exposición a xenobióticos, siendo esta una patología común pues dada su función en el metabolismo, el hígado se encuentra mayormente expuesto a los múltiples xenobióticos [57].

- **Hepatotoxicidad y Cd**

El Cd es un metal que además de afectar al riñón, también afecta al hígado pues el Cd es metabolizado en este órgano donde se une a las MT las cuales tienen la capacidad de reaccionar y almacenar metales como Zn, Cd, Hg, Cu, Pb, etc. Se ha descrito que el efecto tóxico generado por distintos metales en el organismo es consecuencia del estrés oxidante, en especial por la producción de ERO, dentro de los efectos que causan se encuentra el daño hepático. Dentro de las manifestaciones a causa de metales pesados en el hígado es colestasis, necrosis hepática, lesiones vasculares, infiltración de grasa e hinchazón de los hepatocitos, fibrosis, cirrosis, inflamación, entre otros más [27], [58], [59].



Después de una alta exposición de Cd se encuentra en mayor medida en el hígado a comparación del riñón, sin embargo, su vida media es menor respecto al riñón [60]. El Cd genera daño hepático mediante dos principales mecanismos denominados como mecanismo primario y mecanismo secundario. El mecanismo primario involucra la inactivación del grupo SH la cual se da por la interacción entre el Cd y los grupos SH de las mitocondrias, la peroxidación de lípidos y el estrés oxidante generados por la formación de ERO, por otro lado, el mecanismo secundario lo conforman la activación de las células de Kupffer ya que éstas pueden liberar citocinas proinflamatorias que promueven la migración y acumulación de neutrófilos y monocitos en el hígado [59], [61], [62].

## 2.5. Evaluación del daño hepático inducido por Cd.

Algunos biomarcadores para evaluar el daño hepático se presentan en la Tabla 7.

**Tabla 7. Resumen de algunos marcadores de daño hepático.**

Marcador/parámetro de daño hepático	Tipo de daño que detecta	Limitaciones
Concentración de proteínas totales en plasma [63]	Función hepática [63]	<ul style="list-style-type: none"> <li>No se pueden identificar las concentraciones individuales de las proteínas, por ejemplo, de albúmina [63].</li> </ul>
AST [64], [65]	Lesión hepática o del tejido extrahepático [65]	<ul style="list-style-type: none"> <li>Es menos específica que ALT [65].</li> <li>Tanto AST como ALT pueden ser influenciados por otros factores como el ejercicio, edad y dieta [65].</li> </ul>
ALT [64]	Necrosis hepática [64]	<ul style="list-style-type: none"> <li>Elevaciones de ALT pueden reflejar lesiones del músculo esquelético [64].</li> </ul>
Cuantificación de albúmina plasmática [64], [66]	Función hepática [64]	<ul style="list-style-type: none"> <li>Los valores pueden estar disminuidos en pacientes sometidos a tratamientos con alopurinol, cisplatino, nitrofurantoína, etc. Así como por el embarazo [66].</li> </ul>
Tinción H&E [40]	Alteraciones en morfología de células hepáticas [40].	<ul style="list-style-type: none"> <li>La técnica no permite ver de forma adecuada algunos componentes estructurales como elastina, fibras reticulares, membranas basales y lípidos [40].</li> </ul>

Abreviaturas: AST: aspartato aminotransferasa, ALT: alanina aminotransferasa, H&E: tinción hematoxilina y eosina.

- **Proteínas totales en plasma**

La cuantificación de proteínas totales en plasma se considera un indicador de la función hepática debido a que el hígado tiene un papel importante en la síntesis de proteínas y éstas conforman alrededor del 85-90% del volumen de la proteína circulante [55], [67]. No obstante, esta determinación refleja la suma de las proteínas séricas [63], [68].

- **Aminotransferasas: AST y ALT**

La AST es una enzima transaminasa que cataliza la conversión de aspartato y  $\alpha$ -cetoglutarato en oxalato y glutamato. Esta enzima se encuentra predominantemente en el hígado y en el músculo esquelético, sin embargo, se encuentra presente también en otros tejidos. Normalmente la concentración de la AST se encuentra elevada como consecuencia de hematomas, traumas, necrosis, infección o neoplasia del hígado o del músculo [68]. Por su parte la ALT de igual manera es una enzima transaminasa, la cual cataliza la transferencia de un grupo amino de la alanina a  $\alpha$ -cetoglutarato para formar piruvato y glutamato. La ALT se encuentra principalmente en el hígado y sus niveles séricos se elevan cuando se presenta necrosis celular significativa, hepatitis, insuficiencia cardíaca congestiva y/o daño hepático [68], sin embargo, un alto nivel de la ALT puede significar también lesiones del músculo esquelético [64].

Se ha descrito que ALT es un marcador más específico que AST, debido a que tiene una expresión tisular más restringida, no obstante AST se considera que tiene mayor sensibilidad puesto que es más abundante en el hígado que ALT [65], [69].

- **Análisis cualitativo de la albúmina plasmática**

La albúmina es la proteína de mayor abundancia en circulación (aproximadamente el 60%) y tiene un peso molecular de 66 kDa. Su síntesis se encuentra regulada por la presión coloidosmótica y la osmolaridad del espacio extravascular [70]. Es un acarreador inespecífico que se une a ácidos grasos y biliares [55], y mantiene la presión oncótica intravascular, por lo que concentraciones excesivamente bajas de esta proteína inducen edema en las extremidades inferiores, ascitis y edema pulmonar [66], [67]. Dado que la albúmina es producto de la síntesis hepática se puede considerar como un indicador de la función hepática. Las lesiones hepáticas

normalmente presentan hipoalbuminemia, pero también se puede presentar hiperglobulinemia como una compensación a la caída de esta proteína [55], [64].

## **2.6. Papel del estrés oxidante en la nefrotoxicidad y hepatotoxicidad del Cd**

- **Estrés oxidante y ERO**

El estrés oxidante se refiere al desbalance entre especies oxidantes y antioxidantes, con tendencia favorable hacia las primeras, induciendo un daño a las moléculas del organismo conocido como daño oxidante [71], [72]. Existen factores que propician el estrés oxidante, los cuales se pueden dividir en tres: los de tipo celular los cuales abarca a la disminución de antioxidantes, el incremento en la producción de especies reactivas y la liberación de los complejos iónicos, los factores endógenos como el ejercicio exhaustivo, el cáncer, los procesos inflamatorios crónicos y la isquemia, y los factores exógenos como por ejemplo alimentos (ricos en proteínas), contaminantes (humo de cigarro, hidrocarburos, plaguicidas y exposición a metales) y algunos fármacos como anticancerígenos [71], [73].

Las consecuencias que genera el estrés oxidante dependen de la gravedad, el tejido o tipo de células que se evalúen y el curso temporal del estrés oxidante. Como resultado del estrés oxidante podemos encontrar: aumento de la proliferación, lesión celular y a moléculas como lípidos, ácido desoxirribonucleico (ADN), proteínas y carbohidratos, senescencia y muerte celular por apoptosis o necrosis [71], [73].

Las ERO son especies más reactivas que el oxígeno molecular ya que contienen oxígeno incompletamente reducido o con una distribución electrónica diferente, además pueden ser radicales libres o no radicales libres, es decir que todos los radicales libres son ERO, pero no todas las ERO son radicales libres, siendo característico de los radicales libres que tienen un número impar de electrones, son inestables y más reactivos que los no radicales libres [72]–[74]. En la Tabla 8 se presentan las principales características de las ERO.

**Tabla 8. Características de las especies reactivas de oxígeno (ERO) [71]–[73].**

Especie reactiva	Características principales
$O_2^{\cdot-}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No es altamente reactivo.</li> <li>• Es un agente reductor porque reduce al hierro de su forma férrica a ferrosa.</li> <li>• Se forma en las células aeróbicas.</li> <li>• Su vida media es de <math>10^{-6}</math> s.</li> </ul>
$\cdot OH$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Es altamente reactivo a comparación de otras ERO.</li> <li>• Tiene una vida media corta de <math>10^{-9}</math> s.</li> <li>• Su generación se encuentra favorecida por metales de transición a través de la reacción de Fenton.</li> <li>• Actúa en los sitios cercanos de donde se produce.</li> </ul>
$H_2O_2$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agente oxidante.</li> <li>• No es un radical libre.</li> <li>• Tiene una alta difusión.</li> </ul>

Abreviaturas:  $O_2^{\cdot-}$ : anión superóxido,  $\cdot OH$ : radical hidroxilo,  $H_2O_2$ : peróxido de hidrogeno.

Las ERO pueden provenir de fuentes biológicas, principalmente de la mitocondria a través de la cadena de transporte de electrones, en este proceso de fosforilación oxidativa el oxígeno es el último aceptor de electrones [74], [75]. En el caso de algunas ERO como el  $O_2^{\cdot-}$ , el  $H_2O_2$  y el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ) se forman como intermediarios en la reducción del oxígeno [73], [74].

El sistema antioxidante actúa en respuesta del estrés oxidante, con la finalidad de mantener el equilibrio entre especies reactivas y especies antioxidantes. Los mecanismos se clasifican como enzimáticos y no enzimáticos, estos mecanismos se emplean para contrarrestar el efecto del estrés oxidante. El mecanismo antioxidante se basa en la activación de las enzimas antioxidantes como GPx, CAT, SOD, GST y GR, mientras que el mecanismo no enzimático incluye a los antioxidantes de bajo peso molecular como las vitaminas C y E, el GSH, los flavonoides,  $\beta$  caroteno, por mencionar algunos ejemplos [72]–[75].

- **Estrés oxidante y Cd**

El daño renal y el daño hepático generados por el Cd están estrechamente relacionados al estrés oxidante que genera este metal [19], [76]. El Cd posee diversos mecanismos mediante los cuales genera estrés oxidante, entre ellos se encuentra la generación indirecta de ERO como  $\cdot OH$ ,  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  [14], [60], la

expresión de las NOX en riñón, neuronas y en hepatocitos y la alteración en el sistema antioxidante alterando la actividad de las enzimas antioxidantes [77].

El Cd compite con otros metales que son indispensables como el Fe y Cu por la unión a las proteínas de membrana y citosólicas, generando un incremento de  $\cdot\text{OH}$  por vía de la reacción de Fenton. Este metal también posee afinidad por los grupos SH de las proteínas de membrana, dando como resultado una disminución en el potencial de membrana, además de inhibir principalmente al complejo III de la cadena de transporte de electrones [7], [77]. Cabe mencionar que se ha informado que el Cd puede inducir la acumulación de semiubiquinonas inestables dando como resultado la transferencia de un electrón al oxígeno para formar el  $\text{O}_2^-$  [14].

Las NOX son una familia de enzimas transmembranales que se activan a través de fosforilaciones [77] y se caracterizan por ser agentes reductores que generan  $\text{O}_2^-$ , el cual cuando hay una sobreproducción de éste, se presentan efectos tóxicos [14].

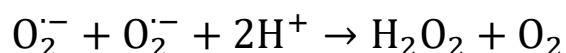
Otro mecanismo del Cd para la generación de estrés oxidante, es la alteración en la actividad de las enzimas antioxidantes como SOD, CAT, GPx, GR y GST como consecuencia del efecto del Cd, además de la reducción del GSH, lo que genera una alteración en la homeostasis redox [14], [59], [60], [77]. Las alteraciones en la enzima SOD se han relacionado con la alteración en la topografía enzimática la cual tiene una relevancia en su función catalítica [14], [78], en cuanto a la enzima CAT, su alteración se debe a la interacción entre el Cd con su centro catalítico, ya que el Cd está vinculado a la deficiencia de Fe y además compite con este metal que es indispensable en el centro catalítico de la enzima por lo que al disminuir puede abatir su actividad [14]. Respecto a la enzima GPx recordando que es una enzima dependiente de Se, ocurre algo similar que, con la CAT, pues existe una disminución de Se por la formación del complejo Cd-Se-Cys [14].

Una de las consecuencias del estrés oxidante del Cd es la lipoperoxidación de los lípidos causando alteraciones en las funciones de las proteínas y del ADN [77].

## 2.7. Evaluación del estrés oxidante inducido por Cd

### • Enzima SOD

Las SOD son enzimas que catalizan la transformación del  $O_2^{\cdot-}$  en  $H_2O_2$  (Figura 8) [79]. Esta enzima tiene tres isoformas que se presentan en células eucariotas, las cuales se denominan: SOD extracelular (EC-SOD) la cual contiene Cu y Zn en su sitio activo, la SOD citosólica o cobre-zinc-SOD (Cu-Zn-SOD) que necesita del Cu para su actividad catalítica y del Zn para su estabilización molecular, y la SOD mitocondrial o manganeso-SOD (Mn-SOD) la cual requiere del Mn para su actividad (Tabla 9) [71], [74], [79].



**Figura 8. Reacción catalizada por la superóxido dismutasa (SOD).** La reacción que lleva a cabo esta enzima es la conversión del anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) [71].  $H^+$ : protón ácido,  $O_2$ : oxígeno.

**Tabla 9. Características de las isoformas de la enzima superóxido dismutasa (SOD) que se encuentran en mamíferos [71], [79].**

Isoforma	Localización	Estructura	Peso molecular total
EC-SOD	Extracelular	Homotetrámero	135 kDa
Cu-Zn-SOD	Citosol	Homodímero	32 kDa
Mn-SOD	Matriz mitocondrial	Homotetrámero	96 kDa

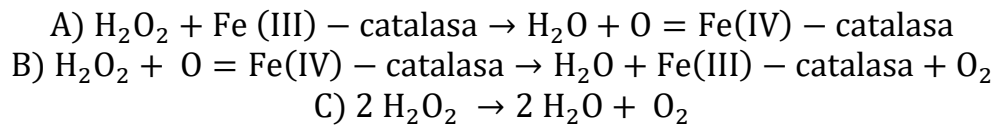
Abreviaturas: EC-SOD: extracelular-superóxido dismutasa, Cu-Zn-SOD: cobre-zinc-superóxido dismutasa, Mn-SOD: manganeso-superóxido dismutasa.

### • Enzima CAT

La enzima CAT es una hemoproteína tetramérica con un peso molecular de 240 kDa que se encuentra en los peroxisomas, es abundante principalmente en el hígado, se encarga de realizar la reacción de la descomposición del  $H_2O_2$  en agua y oxígeno (Figura 9), es importante tener en cuenta que requiere de NADPH para llevar a cabo su función [71], [74]. Además, posee otras propiedades como favorecer la desintoxicación de fenoles, ácido fórmico, metanol y etanol [79]. La CAT en animales se compone por cuatro subunidades que contienen Fe(III)-hemo en el sitio activo [71].

Cabe mencionar que la CAT es una enzima que en mamíferos también puede llevar a cabo reacciones de peroxidasa de manera restringida por la accesibilidad de los

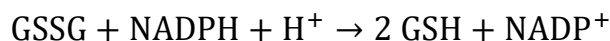
sustratos hemo, pues está involucrada en la oxidación de compuestos donadores de protones como metanol, etanol y ácido fórmico [71].



**Figura 9. Reacciones catalizadas por la enzima catalasa (CAT).** CAT lleva a cabo su función catalítica mediante dos fases, (A) primero en la que actúa como un agente oxidante y (B) después en la que actúa como un agente reductor, para así llegar a su reacción neta (C) la cual consiste en la descomposición del peróxido de hidrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) [71]. Fe: hierro,  $\text{O}_2$ : oxígeno.

- **Enzima GR**

GR es una flavoenzima encargada de mantener los niveles de GSH en la célula [80] mediante la reacción que lleva a cabo de la conversión de glutatión disulfuro (GSSG) a GSH (Figura 10) [71]. En animales, esta enzima posee dos subunidades que tienen un peso molecular de 51.569 kDa por cada una [80] y contiene flavin adenin dinucleotido (FAD) en su sitio activo. Su actividad se basa en que la NADPH reduce al FAD transfiriendo sus electrones a un puente disulfuro en el sitio activo; los grupos SH interactúan con el GSSG y lo reducen a 2 moléculas de GSH [71]. De forma que una alteración en la actividad de la GR implicaría una reducción de los niveles de GSH resultando un incremento en los niveles de ERO [80]. Es importante considerar que el GSH obtenido, lo emplea la enzima GPx para la reducción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  y de lipoperóxidos [80].

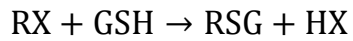


**Figura 10. Reacción catalizada por la enzima glutatión reductasa (GR).** GR realiza la transformación del glutatión disulfuro (GSSH) a glutatión (GSH), en la cual requiere de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) [71].

- **Enzima GST**

GST es abundante en el hígado [71], tiene un peso molecular de 26 kDa, es dimérica, no alostérica, tiene un sitio activo por monómero [81] y se encarga de la conjugación del GSH (Figura 11), la cual se considera como el primer paso para la detoxificación de un xenobiótico, no obstante, algunos conjugados con GSH de hidrocarburos halogenados como dibromo y el diclorometano generan daño renal [71]. La función de GST consiste en unir el GSH y el sustrato electrofílico al sitio activo de la GST, activando el grupo SH del GSH, por lo que se generará un ataque

electrofílico del GSH en el sustrato electrofílico, además tiene la actividad de una GPx con los peróxidos orgánicos (excepto H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [71].

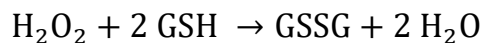


**Figura 11. Reacción catalizada por la enzima glutatión S-transferasa (GST).** La GST conjuga el glutatión (GSH) con algún xenobiótico (RX) [71].

La familia de las GST se divide en tres subfamilias: citosólica, mitocondrial y microsomal unida a la membrana [82]. A su vez se ha informado que en animales existen 7 familias citosólicas: alfa (α), zeta (ζ), mu (μ), pi (π), omega (Ω), sigma (Σ) y theta (θ), siendo las más abundantes en mamíferos las clases α, μ y π, que son las de mayor abundancia, y conforme se encuentran en contacto con algún xenobiótico incrementan sus niveles [71].

- **Enzima GPx**

La GPx es una familia de enzimas que se encuentran principalmente distribuidas en los tejidos de animales específicamente en el citoplasma o en la membrana dependiendo de la isoforma de la GPx (Tabla 5). Esta enzima necesita de Se para llevar a cabo su actividad pues este elemento se encuentra presente como selenocisteína en los sitios activos de estas enzimas [71], [74], su función de la GPx consiste en reducir hidroperóxidos (-ROOH) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en alcoholes o agua, utilizando GSH el cual oxida a GSSG (Figura 12). El GSSG es utilizado por la enzima GR con ayuda del NADPH, lo cual ayuda a mantener el ciclo de GSH y así prevenir el agotamiento de los tioles celulares y mantener la homeostasis redox [79].



**Figura 12. Reacción catalizada por la enzima glutatión peroxidasa (GPx).** La GPx cataliza la reacción de reducción del peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) o de otros peróxidos orgánicos a agua (H<sub>2</sub>O) y a su vez oxida al glutatión (GSH) convirtiéndolo en glutatión disulfuro (GSSG) [71].

Es importante destacar que GPx, GR, SOD y CAT se encuentran relacionadas entre sí, pues los productos que generan algunas de estas enzimas en sus reacciones para llevar a cabo su función principal en el sistema antioxidante pueden ser reactivos o intermediarios importantes en las reacciones que realizan otras de estas enzimas (Figura suplementaria 2).



- **MDA**

El MDA se genera en el proceso de síntesis de prostaglandina, también es un producto de la lipoperoxidación de ácidos grasos poliinsaturados (Figura suplementaria 3), el cual es una consecuencia del estrés oxidante, razón por la cual se considera como un indicador de peroxidación de lípidos. Uno de sus precedentes es el ácido araquidónico el cual se peroxida para generarlo y también al 4-hidroxinonenal (4-HNE) [83]–[85]. Este aldehído en altas concentraciones puede desencadenar enfermedades patológicas, dada su capacidad de formar aductos por adición de Michael y por formación de bases de Schiff, en condiciones fisiológicas, el MDA reacciona principalmente con los grupos amino de los residuos de lisina, además de propiciar la reticulación de proteínas [86].

- **ORAC**

El método ORAC sirve para evaluar la capacidad antioxidante, por ello es empleado en el campo del estrés oxidante, dicho método emplea fluoresceína para la oxidación del radical peroxilo, estos radicales buscarán apagar la sonda fluorescente, de forma que si se emplea un antioxidante se inhibirá la oxidación del radical peroxilo [87].

## **2.8. Modelo experimental de daño renal y hepático inducido por Cd en ratas Wistar**

- **Estudios toxicológicos *in vivo***

En la investigación a menudo se hace uso de modelos de distinta índole como los modelos *in vitro*, *in vivo* e *in silico*. Los modelos *in vitro* consisten en estudios que se realizan fuera del organismo vivo, es decir que se hacen utilizando muestras aisladas de tejidos, células o moléculas provenientes de un organismo vivo, los modelos *in vivo* implican hacer uso de organismos vivos como animales, siendo los favoritos en la comunidad científica los roedores como ratones, cobayos y ratas Wistar o Sprague Dawley, y finalmente los modelos *in silico* que se caracterizan por emplear programas informáticos o modelos matemáticos que simulan un modelo *in vitro* o *in vivo* [88].

Como ya se mencionó los estudios *in vivo* son los favoritos en la investigación pues normalmente se espera que los efectos producidos en animales sean muy similares

a los que pasarían en los seres humanos, no obstante, hay que considerar que estos estudios están sujetos a la influencia de muchos factores [89]. Dadas las distintas condiciones que existen para plantear un modelo experimental, existe una clasificación de los modelos respecto al tiempo de tratamiento, los cuales son agudos, subagudos, crónicos y subcrónicos, además de considerar la frecuencia de exposición ya sea con una dosis única (una sola administración) o con dosis fraccionada (varias administraciones en distintos periodos de tiempo) [90], [91] (Tabla 10).

**Tabla 10. Tipos de estudios toxicológicos [90], [91].**

Estudio / Característica	Agudo	Subagudo	Subcrónico	Crónico
Duración de exposición [90], [91]	<24 h (dosis única) También se puede realizar por sesiones de repetidas de hasta 14 días.	<1 mes (14-28 días)	1-3 meses (90 días)	>3 meses (180 días)
Número de animales [90]	Número pequeño de animales (por ejemplo 5 roedores por grupo).	10 animales, por sexo, por grupo.	20-25 animales por sexo, por grupo.	20-25 animales por sexo, por grupo

- **Modelo de daño renal y hepático inducido por CdCl<sub>2</sub> en ratas Wistar**

En la última década se han realizado diversos estudios sobre los efectos tóxicos del Cd mediante la administración de CdCl<sub>2</sub> tanto *in vitro* como *in vivo*, siendo de mayor interés los últimos pues como se mencionó en el inciso anterior, son lo más cercanos a los efectos que podría tener un ser humano. En estos estudios han centrado su atención en demostrar el efecto nefrotóxico y hepatotóxico relacionándolos a los cambios en la homeostasis redox que se presentan acompañados de estos efectos además de la búsqueda de propuestas de tratamientos que protejan de este daño. Los animales preferidos en estos estudios son ratones y ratas, de estos últimos se describen principalmente en ratas Wistar o Sprague Dawley.

En los estudios *in vivo* en los que se administra CdCl<sub>2</sub> a ratas Wistar para la evaluación de la nefrotoxicidad, hepatotoxicidad y estrés oxidante se observa una gran discrepancia en cuanto a las dosis administradas y frecuencia de administración, que en el caso de la vía i.p. ocurre a pesar de tener la misma vía de administración, dichos estudios se presentan en la Tabla 11.

**Tabla 11. Modelos de daño renal, hepático y estrés oxidante experimentales *in vivo* con ratas Wistar administradas con cloruro de cadmio (CdCl<sub>2</sub>) informados en los últimos 10 años (2012-2022).**

Modelo	Dosis de CdCl <sub>2</sub> y v.a	Evaluación de biomarcadores de daño			Ref
		Hepático	Renal	Estrés oxidante	
36 ratas Wistar macho (9 animales por grupo), con un peso de 200-215 g.	25 mg/kg p.c./día i.p. durante 7 días.	N/D	↑KIM en riñón ↑ Cantidad de Cd en riñón ↑Creatinina sérica ↑BUN sérico	En riñón: ↑MDA ↓GSH ↓Act. GR ↑GSSG/GSH ↓Act. GPx ↓Act. CAT	[92]
24 ratas Wistar (6 animales por grupo), con un peso de 170-200 g.	3 mg/kg/p.c /día subcutáneo durante 21 días.	N/D	↑Urea sérica ↑Ácido úrico sérico ↑Creatinina sérica ↑NAG ↑Cantidad de Cd en riñón.	En riñón: ↓Act. SOD ↓Act. CAT ↓Act. GPx ↓Act. GR ↓Act. GST ↓GSH total	[93]
20 ratas Wistar macho (5 animales por grupo), con un peso de 80-120 g.	4 mg/kg/p.c, dosis única intravenosa.	↑AST sérica ↑ALT sérica ↓Proteínas totales séricas.	↑Urea sérica ↑Creatinina sérica	En riñón: ↑MDA en riñón y suero. ↓GSH ↓Act. GPx ↓Act. SOD ↓Act. CAT	[94]
40 ratas Wistar macho (8 animales por grupo), con un peso de 145±15 g.	50 mg/L por vía oral en el agua que bebían durante 8 semanas.	N/D	↑Urea sérica ↑Creatinina sérica y ↓ en orina ↑Albúmina en orina ↑NAG en orina	En riñón: ↑MDA ↓Act. SOD ↓Nrf2	[95]

30 ratas Wistar (6 animales por grupo), con un peso de 180-220 g.	3 mg/kg p.c./día i.p. durante 7 días.	N/D	↑Urea sérica ↑BUN sérico ↑Ácido úrico sérico ↑Creatinina sérica	En riñón: ↑MDA ↓GSH	[8]
24 ratas Wistar (6 animales por grupo), con un peso de 140-170 g.	6.5 mg/kg p.c./día i.p. durante 5 días.	N/D	↑Cantidad de Cd en el riñón ↑Urea sérica ↑Ácido úrico sérico ↑Creatinina sérica	En riñón: ↓Act. CAT ↓Act. SOD ↓Act. GPx ↓Act. GR	[96]
28 ratas Wistar (7 animales por grupo) con un peso de 200-250 g.	6.5 mg/kg p.c./día i.p. durante 5 días.	↑ALT sérica ↑AST sérica ↑ALP sérica ↑Bilirrubina total sérica	↑Ácido úrico sérico ↑Urea sérica ↑Creatinina sérica	En hígado y riñón: ↑MDA ↑NO ↓GSH ↓Act. SOD ↓Act. GPx ↓Act. GR	[97]
24 ratas Wistar macho (6 animales por grupo) con un peso de 200-250 g.	3 mg/kg p.c./día i.p. durante 7 días.	N/D	↓Volumen de orina ↓Urea urinaria y sérica ↓Creatinina urinaria y sérica	En riñón: ↑MDA ↓GSH ↓Act. SOD ↓Act. GST	[4]
40 ratas albinas (10 animales por grupo) con un peso de 200-220 g.	3.5 mg/kg p.c./día i.p. durante 30 días.	N/D	↑Urea sérica ↑Creatinina sérica ↑KIM	En riñón: ↑NO ↓GSH ↓Act. SOD ↓Act. CAT ↓Act. GPx ↓Act. GR ↓Nrf2 ↓Act. CAT	[98]
36 ratas Wistar macho (6 animales por grupo) con un peso de 180-200 g.	2 mg/kg p.c./día i.p. durante 4 semanas.	N/D	↑BUN ↑Creatinina sérica	En riñón: ↑NO ↑MDA ↓Act. SOD ↓Act. CAT	[9]
24 ratas Wistar (6 animales por grupo) con un	20 mg/kg/p.c dosis única	N/D	↑BUN ↑Creatinina	En riñón: ↓GSH ↓Act. CAT	[99]

peso de 150-200 g.	por vía subcutánea (se sacrificaron después de 2 días).			↓Act. SOD	
45 ratas albinas macho (15 por grupo) con un peso de 230±30 g.	5 mg/kg p.c./día por vía oral durante 9 semanas.	↑ALP	↓Volumen urinario ↑BUN sérico ↑Creatinina sérica ↑Cantidad de Cd en riñón ↑Proteinuria ↑NAG en orina	En riñón: ↑NO ↓Act. SOD ↓Act. CAT	[100]
30 ratas albinas (10 animales por grupo) con un peso de 140-180 g.	4 mg/kg p.c. dosis única i.p. durante 24 h.	↑ALT sérica ↑AST sérica	↑Creatinina sérica ↑Urea sérica	↑MDA en plasma ↓Act. SOD en plasma	[101]
20 ratas macho Wistar (5 animales por grupo) con un peso de 250 g.	1.2 mg/kg p.c. dosis única i.p. y después de 15 días, se administró 1 mL de agua durante 15 días.	N/D	N/D	En riñón: ↑Expresión génica de CAT ↓Expresión génica de SOD	[102]
30 ratas Wistar hembra (5 animales por grupo) con un peso de 180±10 g.	2 mg/kg p.c./3 veces por semana i.p. durante 4 semanas.	↑ALT en plasma ↓ALT en hígado ↓AST en hígado ↑AST en plasma	↑Ácido úrico en plasma ↓ALT en riñón ↓AST en riñón	En hígado y riñón: ↓Act. CAT ↓Act. SOD	[103]
32 ratas Wistar macho (8 animales por grupo) con un peso de 150±10 g.	15 ppm/día durante 30 días por vía oral.	↑ALT sérica ↑AST sérica ↑Bilirrubina total	N/D	En hígado: ↓Act. SOD ↓GSH ↑MDA	[104]

56 ratas macho Wistar (8 animales por grupo) con un peso de 200-220 g.	3 mg/kg i.p. durante 8 días.	↑AST ↑ALT ↑ALP	N/D	En hígado (concentración): ↑MDA ↓GSH ↓SOD ↓GPx	[105]
Ratas macho Wistar (8 ratas por grupo) con un peso de 160-180 g.	Dosis única de 6.5 mg/kg p.c. i.p. sacrificados a las 48 h.	↑AST ↑ALT	N/D		[106]
Ratas macho Wistar (12-14 animales por grupo) de 160-180 g.	Dosis única de 3.5 mg/kg p.c i.p durante 48 h	↑AST ↑ALT	N/D		[107]
24 ratas macho Wistar (4 grupos) con un peso de 200-250 g.	3 mg/kg p.c/día i.p. durante 7 días.	↑AST ↑ALT	N/D	En hígado: ↑MDA ↓GSH ↓Act. SOD ↓Act. CAT ↓Expresión de GST	[108]

Abreviaturas: Ref: referencia, v.a: vía de administración, p.c: peso corporal, N/D: no determinado, i.p: intraperitoneal, Act: actividad, Cd: cadmio, KIM: molécula 1 de lesión renal, BUN: nitrógeno de urea en sangre, MDA: malondialdehído, GSH: glutatión, GSSG: glutatión disulfuro, GPx: glutatión peroxidasa, GR: glutatión reductasa, CAT: catalasa, SOD: superóxido dismutasa, GST: glutatión S-transferasa, AST: aspartato aminotransferasa, ALP: fosfatasa alcalina, ALT: alanina aminotransferasa, Nrf2: factor de transcripción eritroide 2 relacionado con el factor 2, NO: óxido nítrico, ↑: aumenta el valor del marcador en animales con CdCl<sub>2</sub> respecto a los controles, ↓: disminuye el valor del marcador en animales con CdCl<sub>2</sub> respecto a los controles.

### 3. Justificación

El Cd es un metal tóxico cuya importancia ha incrementado por la actividad industrial a nivel mundial [77], y a su vez ha incrementado la exposición del ser humano a este metal por vía de los alimentos, contaminación ambiental, tabaco, etc. Tiende a acumularse en el hígado y el riñón causando daño renal y hepático, el cual se ha descrito en distintas investigaciones que se encuentra relacionado con el estrés oxidante que genera principalmente por medio de la generación indirecta de ERO, la inactivación de enzimas antioxidantes, la expresión de NOX, la competencia con

metales esenciales, la afinidad por grupos SH y la inhibición principalmente del complejo I y III de la cadena de transporte de electrones [7], [77].

Dada la nefrotoxicidad y hepatotoxicidad del Cd surge la necesidad de proponer alternativas para su tratamiento o prevención de su efecto, no obstante, antes se debe contar con un modelo experimental *in vivo*, que asemeje el daño que propicia este metal en dichos órganos. En la literatura se encuentran descrita una gran variedad de modelos *in vivo*, en los que claramente demuestran este efecto, sin embargo, presentan una discrepancia respecto a sus dosis y tiempos de administración, por lo que la relevancia de este trabajo es la resolución de este problema caracterizando un modelo *in vivo* agudo que presente las alteraciones en los biomarcadores de daño renal, daño hepático y de estrés oxidante además de ser reproducible, para así corroborar y comprender el efecto tóxico de este metal en el riñón e hígado en el menor tiempo posible y así en un futuro, este modelo sea de utilidad para ascender al siguiente nivel que sería la propuesta de tratamientos contra estos padecimientos.

#### **4. Hipótesis**

La administración de una dosis aguda de CdCl<sub>2</sub> en ratas macho Wistar inducirá daño renal y hepático a través de la generación de estrés oxidante o de la alteración de la homeostasis redox.

#### **5. Objetivo general**

- Caracterizar en nuestro laboratorio un modelo *in vivo* con ratas macho Wistar de daño agudo por CdCl<sub>2</sub> que sea reproducible y nos permita en un futuro evaluar el potencial efecto protector de diversos compuestos sobre el daño renal y hepático y sobre el estrés oxidante inducidos por este metal.

#### **6. Objetivos particulares**

- Diseñar un modelo experimental *in vivo* de daño renal y hepático relacionado a la alteración de la homeostasis redox después de una exposición aguda a CdCl<sub>2</sub> en ratas macho Wistar.

- Evaluar marcadores de daño renal y de estrés oxidante en muestras de plasma y riñón de ratas macho Wistar después de una exposición aguda de CdCl<sub>2</sub>.
- Evaluar marcadores de daño hepático y de estrés oxidante en muestras de plasma e hígado de ratas macho Wistar después de una exposición aguda de CdCl<sub>2</sub>.

## 7. Procedimiento experimental: materiales y métodos

### 7.1. Reactivos

Los siguientes reactivos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA): CdCl<sub>2</sub>, dimetilsulfóxido (DMSO), persulfato de amonio, glicerol, etilenglicol-bis(β-aminoetil éter)-ácido N, N, N', N'-tetraacético (EGTA), tween-20, paraformaldehído, tris base, dodecil sulfato de sodio (SDS), NADPH, GR, GSH, GSSG, hidroxitolueno butilado (BHT), p-nitrofenol (PNP), albúmina sérica bovina (ASB), xantina oxidasa (XO), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), azida de sodio, 1-cloro-2,4-dinitrobenzenu (CDNB), 4-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosaminido, acrilamida, metilenbisacrilamida, 1-metil-2-fenilindol (1M2F), 2,2'-Azobis (2-metilpropionamida) (AAPH), triton X-100, fluoruro de sodio (NaF), desoxicolato de sodio, pirofosfato de sodio (Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>), ortovanadato de sodio (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>), nitroazul de tetrazolo (NBT) y el coctel de inhibidores de proteasas.

Los siguientes estuches comerciales fueron adquiridos de Spinreact (Barcelona, España): estuche comercial urea-37, estuche comercial creatinina-J, estuche comercial GOT (AST)-LQ y el estuche comercial GPT (ALT)-LQ.

El pentobarbital sódico fue adquirido de Pisa farmacéutica (Ciudad de México, México). La leche Svelty proviene de Nestle. Los reactivos cloruro de potasio (KCl), cloruro de sodio (NaCl), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, fosfato de sodio dibásico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), fosfato de sodio monobásico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), citrato de sodio, metanol, acetonitrilo y ácido clorhídrico (HCl) concentrado provienen de J.T. Baker (Center valley, PA, EUA). La glicina proviene de Biotech (Ottawa, Canadá), el reactivo de Folín proviene de MP Biomedicals (Francia), el hidróxido de sodio (NaOH) proviene de MACRON (Suecia), el ácido acético glacial



proviene de Alfonso marht (Ciudad de México, México) y el marcador de peso molecular (estándares de doble color de proteína) proviene de BIO-RAD (EUA) así como el equipo que se utilizó para realizar la electroforesis y el análisis de western blot.

El anticuerpo anti-gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) proveniente de conejo (cat. SC-25778) y anti-KIM-1 proveniente de cabra (cat. SC-210922) se adquirieron de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, EUA). El anticuerpo anti-NGAL proveniente de ratón (MA5-41650) se adquirió de ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, EUA). Los anticuerpos secundarios fluorescentes anti-conejo, anti-ratón y anti-cabra fueron adquiridos de LICOR Biosciences (Lincoln, NE, USA).

## **7.2. Animales**

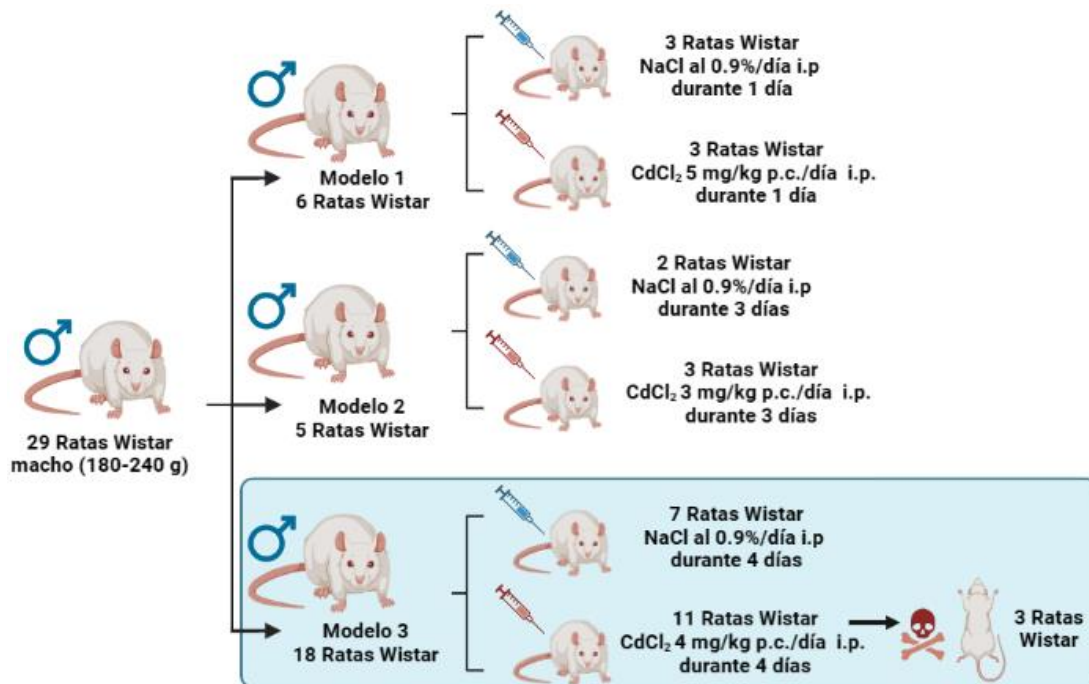
Para diseñar el modelo experimental *in vivo* se utilizaron 29 ratas macho Wistar con un peso corporal de 180-240 g, las cuales fueron criadas en el banco genético del bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Fueron mantenidas en ambientes convencionales con un macroambiente controlado a una temperatura de entre 22-24°C, humedad relativa de 40 a 70%, control de luz/oscuridad 12 h/12 h, y con ruido menor a 85 decibeles. Posteriormente se aclimataron durante aproximadamente una semana en el bioterio de estudios toxicológicos agudos, subagudos y crónicos de la Facultad de Medicina, UNAM, con una temperatura controlada, agua y comida *ad libitum*.

## **7.3. Diseño experimental y obtención de muestras.**

El protocolo experimental fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (OFICIO/FQ/CICUAL/512/22) de la Facultad de Química, UNAM y fue conducido bajo la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 para el cuidado y uso de los animales de laboratorio y bajo la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 para el adecuado manejo y desecho de residuos peligrosos biológico-infecciosos.

Para establecer el modelo experimental *in vivo* se emplearon un total de 29 animales, divididos en 3 modelos diferentes con base en los datos informados en la literatura. En cada modelo se tuvo un grupo control y un grupo administrado con

CdCl<sub>2</sub>. Las dosis de CdCl<sub>2</sub> fue diferente entre los modelos. El modelo 1 consistió en una única administración i.p. de CdCl<sub>2</sub> 5 mg/kg p.c./día, el modelo 2 consistió en una administración de CdCl<sub>2</sub> 3 mg/kg p.c./día durante 3 días y el modelo 3 consistió en una administración de CdCl<sub>2</sub> 4 mg/kg p.c./día durante 4 días (Figura 13).

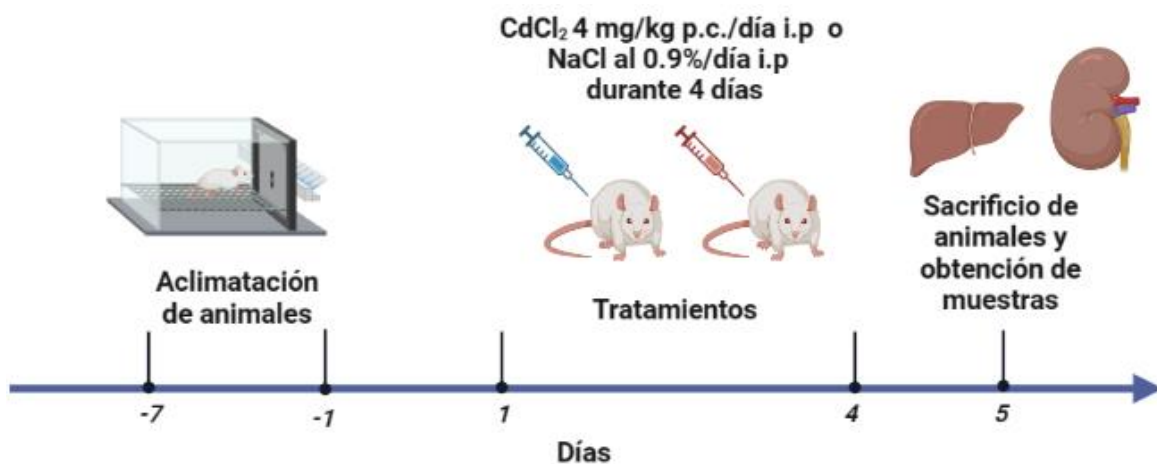


**Figura 13. Planteamiento del diseño experimental *in vivo*.** Para establecer el modelo que se empleó en las determinaciones de daño renal, daño hepático y estrés oxidante se propusieron 3 modelos con diferentes dosis. En todos los modelos los animales se dividieron en dos grupos: el grupo control al que se le administró solución salina (NaCl al 0.9%) intraperitoneal (i.p.) y el grupo experimental al que se le administró una dosis de cloruro de cadmio (CdCl<sub>2</sub>) i.p. dependiendo del modelo en cuestión. El modelo 3 fue el que tuvo un efecto por parte del CdCl<sub>2</sub>, por lo tanto, fue el modelo a emplear en las demás determinaciones, con un total de 15 animales ya que tres animales no sobrevivieron al tratamiento con CdCl<sub>2</sub>. Abreviaturas: p.c: peso corporal. La figura fue creada con BioRender.com.

En todos los modelos se realizó la determinación de BUN y creatinina. Dado que el modelo 3 (Figura 14) fue el que presentó un efecto por parte del CdCl<sub>2</sub> en sus niveles de BUN, fue seleccionado para llevar a cabo todas las determinaciones de daño renal, daño hepático y estrés oxidante. Este modelo consistió en dos grupos de animales (7-8 animales por grupo) denominados como grupo control y grupo experimental. Al grupo control se le administró solución salina (NaCl al 0.9%/día durante 4 días i.p. y al grupo experimental se le administró una dosis de CdCl<sub>2</sub> 4 mg/kg p.c./día i.p. durante 4 días. Los tratamientos fueron administrados con jeringas de 1 mL de calibre 27G. Durante la realización del protocolo experimental

los animales contaron con acceso libre a alimento y agua, temperatura controlada, ciclos de luz/oscuridad de 12 h y se colocaron en cajas metabólicas con la finalidad de obtener un registro de datos de alimento consumido, agua consumida y orina excretada.

Después de 24 h de la última administración se sacrificaron a los animales por medio de una exsanguinación bajo anestesia con pentobarbital sódico 50 mg/kg, i.p. Para ello se realizó una disección abdominal para exponer los órganos y así obtener muestras de sangre con una punción en la vena cava inferior del corazón empleando una jeringa previamente heparinizada de 5 mL, calibre 21G para después centrifugarlas a 3,216 xg durante 10 minutos y obtener muestras de plasma las cuales se almacenaron a -70°C. Asimismo, se obtuvieron muestras de riñón e hígado de las cuales se tomaron muestras representativas para realizar un análisis histológico, dichas muestras fueron sometidas a un pretratamiento que consistió en colocar los tejidos en el fijador de paraformaldehído al 6% en amortiguador fosfato salino (PBS) pH 7.4 (NaCl 0.14 M, KCl 2.68 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1 M y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 17.6 mM).



**Figura 14. Modelo experimental *in vivo*.** El modelo seleccionado para realizar todas las pruebas de daño renal, daño hepático y estrés oxidante consistió en dos grupos de animales que fueron sometidos a un período 7 días de aclimatación y al término de este, empezó el tratamiento. El grupo control fue administrado con solución salina (NaCl al 0.9%)/día intraperitoneal (i.p.) y el grupo experimental fue administrado con cloruro de cadmio (CdCl<sub>2</sub>) 4 mg/kg de peso corporal (p.c.)/día i.p. de durante un periodo de 4 días. Después de 24 h de la última administración se sacrificaron a los animales por exsanguinación bajo anestesia con pentobarbital sódico 50 mg/kg i.p. y se obtuvieron muestras de plasma, hígado y riñón. La figura fue creada con BioRender.com.

### **7.3.1. Preparación de homogenados de tejido.**

Para la determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes se realizó un homogenado 1:10 (p/v) en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.4 con tritón X-100 al 0.05%, se centrifugó a 20.1 xg durante 30 minutos a 4°C, mientras que para la evaluación de MDA fue un homogenado 1:5 (p/v) en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.4 y 10 µL de BHT 0.5 M en acetonitrilo, y se centrifugó a 3000 xg durante 10 minutos a 4°C. Para el caso de la determinación de NAG y ORAC, el homogenado se preparó de la misma forma que para la determinación de la actividad de enzimas antioxidantes.

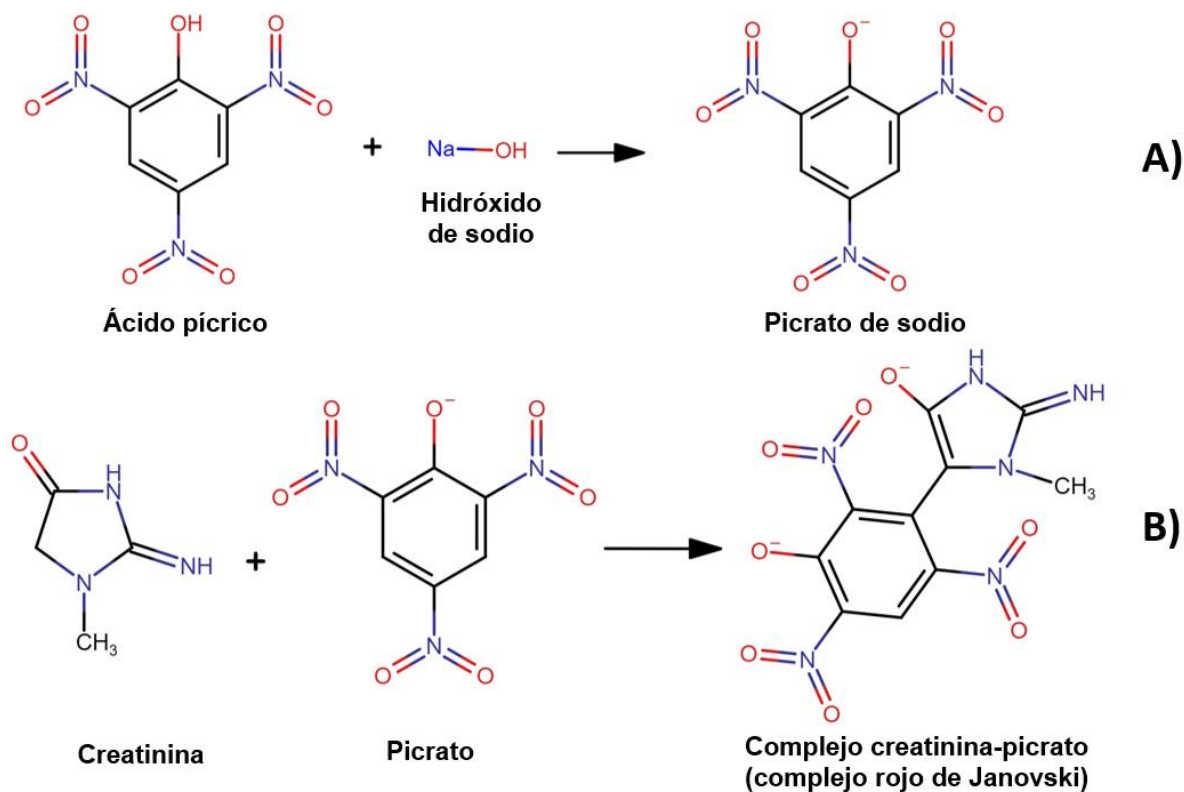
En el caso de los homogenados de riñón para la técnica de western blot para la determinación de KIM-1 y NGAL, se realizaron a una relación 1:10 (p/v) con una mezcla que contiene amortiguador de homogenización *ensayo de radio inmunoprecipitación* (RIPA) (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, EGTA 1 mM, desoxicolato de sodio al 0.5%, SDS al 0.1%, NP-40 al 1%, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, NaF 5 mM, Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>·10 H<sub>2</sub>O 1 mM, PMSF 0.05 mM y coctel de inhibidores de proteasas), y se centrifugó a 15,000 xg durante 30 minutos a 4°C.

La concentración de proteínas totales en las muestras se determinó por medio del método de Lowry et al. [109].

## **7.4. Evaluación de daño renal**

### **7.4.1. Cuantificación de creatinina**

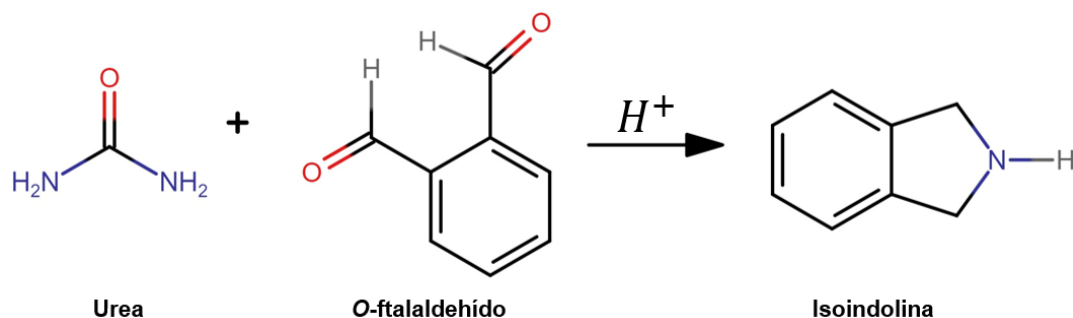
La creatinina fue evaluada en muestras de plasma heparinizado por medio de un método espectrofotométrico empleando un estuche comercial de Spinreact. Este método se basa en la reacción entre la creatinina presente en la muestra con picrato alcalino (previamente generado con ácido pícrico 17.5 mM y NaOH 0.29 M) formando un complejo rojizo (Figura 15) el cual se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 492 nm, a 37°C, cada 30 segundos durante 90 segundos. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de creatinina en la muestra. Los resultados se expresaron como mg/dL de creatinina.



**Figura 15. Fundamento de la determinación de creatinina.** El método de determinación de creatinina de Spinreact se basa en el principio de la reacción de Jaffé A) en donde primero se genera el picrato alcalino a partir de la reacción entre el ácido pícrico con el hidróxido de sodio para posteriormente B) reaccionar el picrato con la creatinina que contiene la muestra para formar el complejo rojo de Janovski. La figura fue creada con <https://www-reaxys-com.pbidi.unam.mx:2443/#/structure-editor>.

#### 7.4.2. Cuantificación de BUN

El BUN se evaluó en muestras de plasma heparinizado a través de un método colorimétrico empleando un estuche comercial de Spinreact. Este método se basa en la reacción entre la urea presente en la muestra con el o-ftalaldehído 4.8 mM en medio ácido (mezcla de una solución de borato 87 mM con ácido sulfúrico 3 M) generando un complejo coloreado (Figura 16) que puede cuantificarse espectrofotométricamente a una  $\lambda=510$  nm después de la incubación por 15 minutos a 37°C. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de urea en la muestra. Por medio de un factor de conversión (urea x 0.466) se puede obtener el valor de BUN expresado en mg/dL.



**Figura 16. Fundamento de la determinación de urea.** El método de determinación de urea de Spinreact se basa en la reacción entre la urea presente en la muestra y una solución de O-ftalaldehído en medio ácido, dando como resultado la isoindolina que es un complejo rojo el cual se puede leer espectrofotométricamente siendo su intensidad proporcional a la concentración de urea en la muestra. La figura fue creada con <https://www-reaxys-com.pbidi.unam.mx:2443/#/structure-editor>.

#### 7.4.3. Determinación de la actividad de GPx en plasma

Se determinó en muestras de plasma heparinizado de manera indirecta por medio de una reacción acoplada con la enzima GR, empleando el método descrito por Lawrence y Burk [110]. Dicho método se basa en la disminución de la absorbancia a 340 nm por la desaparición del NADPH, pues la GPx al reducir los hidroperóxidos consume GSH, el cual es regenerado por la GR partiendo del GSSG, este proceso consume NADPH (Figura 12). Se utilizó una microplaca de 96 pozos en la que se mezclaron 20  $\mu$ L de una dilución 1:20 de la muestra la cual reaccionó con 175  $\mu$ L de la mezcla de reacción (EDTA 1 mM, azida de sodio 1 mM, NADPH 0.2 mM, GSH 1 mM y GR 1 U/mL en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.4) y con  $\text{H}_2\text{O}_2$  2.5 mM. Posteriormente las absorbancias se leyeron a 340 nm cada minuto durante 3 minutos. Los datos se expresaron como U/mg de proteína, donde U es la cantidad de enzima que oxida 1  $\mu$ mol de NADPH por minuto.

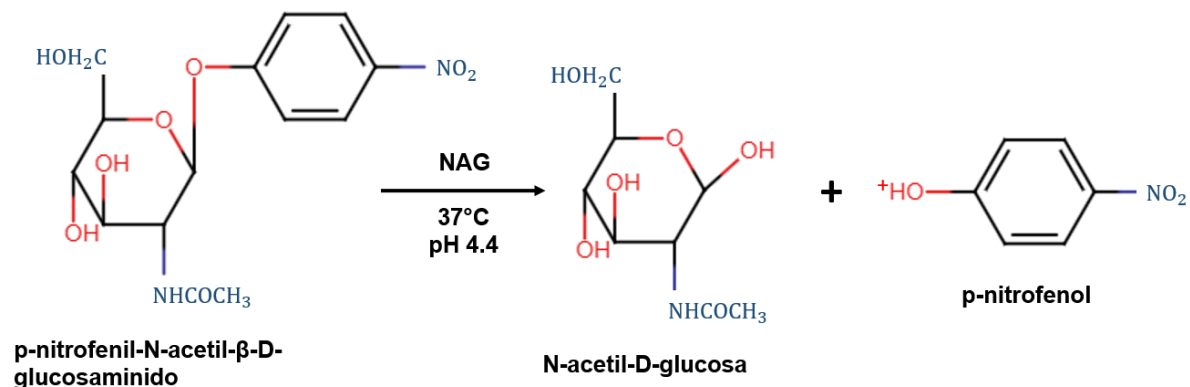
#### 7.4.4. Cuantificación de NAG

Se evaluó en el sobrenadante del homogenado 1:10 (p/v) de riñón, diluido 1:50. Este método se basa en la medición de la forma aniónica del PNP a 405 nm a pH alcalino, el cual se forma a partir del p-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminido [111] (Figura 17). La prueba se realizó en una microplaca de 96 pozos, en la que se colocaron cantidades crecientes de PNP 0.5 mM (0-80 nmol de PNP), amortiguador de citratos 0.1 M, pH 4.4 y amortiguador de carbonatos 0.2 M, pH 10.4 para obtener

una curva patrón de PNP (Figura suplementaria 6C). Se prepararon los siguientes pozos:

- Blanco de la hidrólisis no enzimática: 159  $\mu\text{L}$  de amortiguador de citratos 0.1 M, pH 4.4 y 15.9  $\mu\text{L}$  de agua.
- Hidrólisis no enzimática: 119  $\mu\text{L}$  de amortiguador de citratos 0.1 M, pH 4.4, 15.9  $\mu\text{L}$  de agua y 39  $\mu\text{L}$  de p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucosaminido 6.8 mM.
- Blanco de muestra: 159  $\mu\text{L}$  amortiguador de citratos 0.1 M, pH 4.4 y 15.9  $\mu\text{L}$  de la muestra.
- Muestra: 15.9  $\mu\text{L}$  de muestra, 119  $\mu\text{L}$  de amortiguador de citratos 0.1 M, pH 4.4 y 39  $\mu\text{L}$  de p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucosaminido 6.8 mM.

Se dejó incubar a 37°C durante 15 min y se añadieron 175  $\mu\text{L}$  de amortiguador de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.2 M, pH 10.4 a todos los pozos, finalmente se leyó a una  $\lambda=405$  nm. Los datos se expresaron como  $\mu\text{mol}$  PNP/mg proteína.



**Figura 17. Actividad de la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa (NAG).** La enzima NAG libera p-nitrofenol del sustrato p-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminido que a pH ácido está protonado, mientras que a pH alcalino se encuentra en su forma aniónica que puede detectarse a 405 nm. La figura fue creada con <https://www-reaxys-com.pbidi.unam.mx:2443/#/structure-editor>.

#### 7.4.5. Técnica analítica de western blot: determinación de KIM-1 y NGAL

Este método se emplea para la inmunodetección y la cuantificación de proteínas específicas en muestras complejas [112] y depende de la especificidad de la interacción antígeno-anticuerpo y del peso molecular de las proteínas [113]–[115].

Para esta técnica se utilizó el homogenado 1:10 (p/v) de riñón, al cual se le agregó una relación 1:1 del amortiguador Laemmli (Tris-HCl 60 mM, pH 6.8, glicerol al 18%, SDS 0.06 M, azul de bromofenol 2 mM y  $\beta$ -mercaptoetanol al 9%) y se desnaturalizó

a 70°C durante 10 minutos. Posteriormente se realizó una electroforesis a 100 V en geles de poliacrilamida (12% gel separador y 4% gel concentrador), y en amortiguador de corrida (tris base 24 mM, glicina 1.92 M y SDS 3.47 mM), se cargó en uno de los pozos 1.5 µL del marcador de peso molecular y en los pozos posteriores se cargó la muestra equivalente a 25 µg en cada pozo. Después se llevó a cabo la transferencia con un amortiguador de transferencia (tris base 24 mM y glicina 1.92 M) sometida a un voltaje de 100 V durante 1:30 h, dicha transferencia se realizó del gel de poliacrilamida a la membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) la cual fue activada con metanol. Al terminar se bloqueó al menos 1 h la membrana en una solución de leche al 5% preparada con amortiguador de tris base con tween pH 7.6 (TBS-T) (tris base 20 mM, NaCl 0.1 M). Posteriormente se realizaron tres lavados con TBS-T y se incubó la membrana durante 48 h con el respectivo anticuerpo primario a 4°C, para después de enjuagar con TBS-T por triplicado e incubar en oscuridad con el anticuerpo secundario durante 3 h, se lavó nuevamente con TBS-T por triplicado. Las proteínas de interés se detectaron con el sistema de imágenes infrarrojo LI-COR Odyssey Sa (Lincoln, NE, EUA). El análisis de imágenes se realizó con la versión 5.2 del software Image Studio Lite.

Para la determinación de KIM-1 se empleó un anticuerpo primario anti-KIM-1 (1:800), un anticuerpo secundario anti-cabra (1:15,000) y se empleó un anticuerpo anti-GAPDH (1:500) y su respectivo anticuerpo secundario anti-conejo (1:15,000) como control de carga. Mientras que para NGAL se empleó un anticuerpo primario anti-NGAL (1:500), un anticuerpo secundario anti-ratón (1:15,000) y un anticuerpo anti-GAPDH (1:720) y su respectivo anticuerpo secundario anti-conejo (1:15,000) como control de carga. Los datos se expresaron a partir del análisis densitométrico como NGAL/GAPDH.

#### **7.4.6. Tinción H&E**

Como ya se mencionó en el punto 7.3 se llevó a cabo la fijación de los tejidos (riñón e hígado) con paraformaldehído al 6%. Posteriormente se llevó a cabo la deshidratación en alcoholes etílicos graduados (80°, 90°, 96° y 100°), se realizó el aclaramiento, la infiltración y la inclusión del tejido con parafina. Después el tejido se cortó a un tamaño de 5 micras y se realizó la tinción H&E (Figura 6).



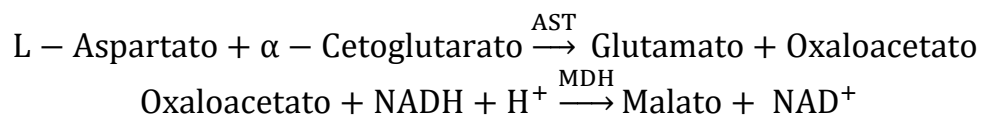
## 7.5. Evaluación de daño hepático

### 7.5.1. Determinación de proteínas totales en plasma

Se realizó con muestras de plasma heparinizado empleando el método descrito por Lowry et al. [109], el cual se basa en la reacción de acomplejamiento en condiciones alcalinas del  $\text{CuSO}_4$  con el nitrógeno de los enlaces de peptídicos de las proteínas produciendo un complejo azul, dejando expuestos los residuos de tirosina y triptófano, los cuales reducen al reactivo de Folin dando una coloración azul intensa que depende de la cantidad de dichos residuos presentes en la muestra. El método se realizó en una microplaca de 96 pozos, se agregó en algunos pozos 31  $\mu\text{L}$  de concentraciones crecientes (5-100  $\mu\text{g}/0.2 \text{ mL}$ ) de ASB al 0.05% para construir una curva patrón (Figura suplementaria 6B) y en otros pozos se agregaron 31  $\mu\text{L}$  de las muestras, para todos los pozos se añadieron 150  $\mu\text{L}$  de la solución C [10 mL sol A ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2%,  $\text{NaOH}$  al 0.4% y 0.1 g de tartrato de sodio y potasio) + 200  $\mu\text{L}$  sol B ( $\text{CuSO}_4$  al 0.5%)], se dejó reposar 10 min, posteriormente se agregaron 20  $\mu\text{L}$  de sol D (reactivo de Folin 1 N), se dejó reposar nuevamente por 30 min y se leyó a  $\lambda=660 \text{ nm}$ .

### 7.5.2. Determinación de AST

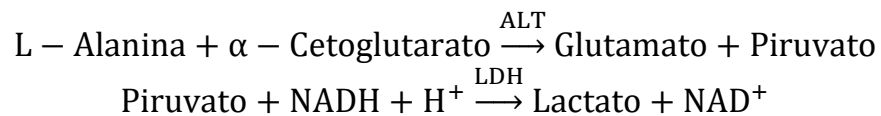
Se evaluó en muestras de plasma heparinizado a través de un método colorimétrico con un estuche comercial de Spinreact. Este método se basa en que esta aminotransferasa cataliza la transferencia reversible de un grupo amino del aspartato  $\alpha$ -cetoglutarato formando glutamato y oxaloacetato, este último se reduce a malato en presencia de malato deshidrogenasa (MDH) y nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) (Figura 18). La velocidad de disminución de la concentración de la NADH es proporcional a la concentración de AST en la muestra, la cual se detectó a 37 °C y una  $\lambda=340 \text{ nm}$ , cada minuto durante 3 minutos. Los resultados se expresaron como U/L de AST.



**Figura 18. Reacciones del fundamento de la detección de la aspartato aminotransferasa (AST).** La AST convierte el L-aspartato y el  $\alpha$ -cetoglutarato en glutamato y oxaloacetato, este último es reducido a malato por acción de la malato deshidrogenasa (MDH). NADH: nicotinamida adenina dinucleótido.

### 7.5.3. Determinación de ALT

Se evaluó en muestras de plasma heparinizado a través de un método colorimétrico empleando un estuche comercial de Spinreact. El método se basa en que la ALT cataliza una transferencia reversible de un grupo amino de la alanina al  $\alpha$ -cetoglutarato con formación de glutamato y piruvato, este último es reducido a lactato en presencia de lactato deshidrogenasa (LDH) y NADH (Figura 19). La velocidad de disminución de la concentración de NADH es proporcional a la concentración de ALT en la muestra, la cual se detectó cada minuto durante 3 minutos a 37°C y una  $\lambda=340$  nm. Los resultados se expresaron como U/L de ALT.



**Figura 19. Reacciones del fundamento de la detección de la alanina aminotransferasa (ALT).** La ALT convierte a la L-alanina y el  $\alpha$ -cetoglutarato en glutamato y piruvato, este último se reduce por la lactato deshidrogenasa (LDH) generando lactato. NADH: nicotinamida adenina dinucleótido.

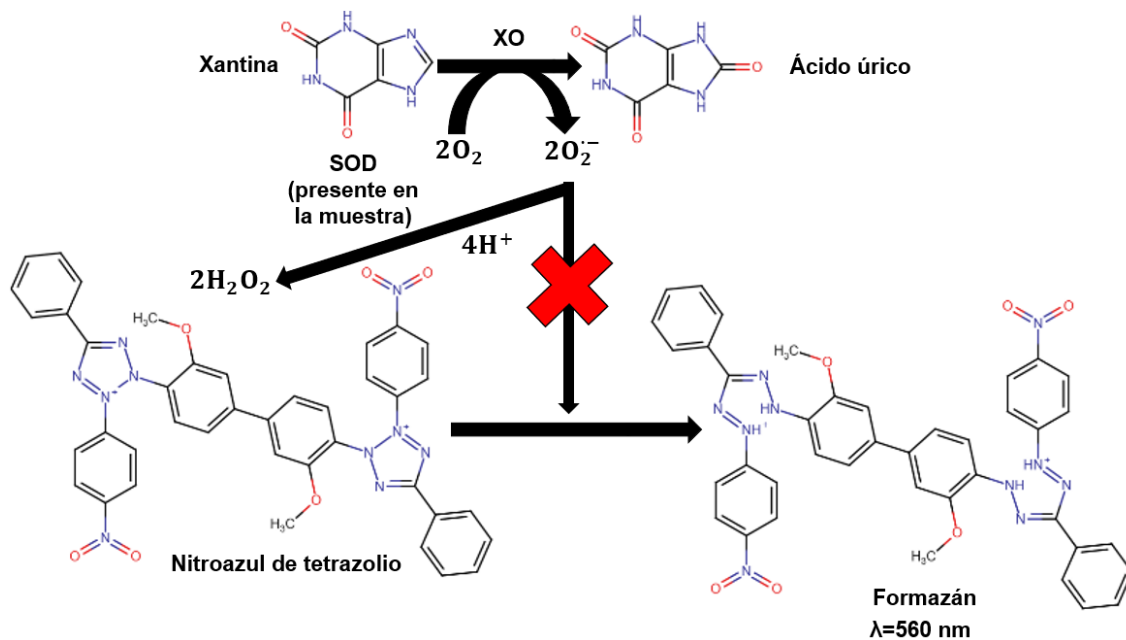
### 7.5.4. Análisis cualitativo de albúmina

Se realizó mediante una tinción con una solución de azul de comassie durante 24 h (0.4 g de azul de Comassie, 90 mL de metanol, 20 mL ácido acético glacial y 90 mL de agua) de geles de poliacrilamida (7.5% gel separador y 4% gel concentrador) que fueron sometidos a una electroforesis con un voltaje de 100 V con un amortiguador de corrida (tris base 24 mM, glicina 1.92 M y SDS 3.47 mM). Se cargó en diferentes pozos de los geles: 1.5  $\mu$ L del marcador de peso molecular, 15  $\mu$ L de ASB [10  $\mu$ L ASB al 0.05% con 5  $\mu$ L amortiguador Laemmli (Tris-HCl 60 mM, pH 6.8, glicerol al 18%, SDS 0.06 M, azul de bromofenol 2 mM y  $\beta$ -mercaptoetanol al 9%)] y 10  $\mu$ L de cada muestra diluida (3  $\mu$ L plasma diluido 1:10 con 10  $\mu$ L amortiguador Laemmli), cabe mencionar que las muestras y la ASB se desnaturalizaron a 70°C durante 5 min. Al finalizar la tinción se retiró el exceso de azul de Comassie con una solución para desteñir (90 mL metanol, 20 mL ácido acético glacial, 90 mL agua). El lavado se realizó por triplicado.

## 7.6. Evaluación de estrés oxidante

### 7.6.1. Evaluación de la actividad de la enzima SOD

Se evaluó en muestras de homogenado de tejido 1:10 (p/v) de riñón diluido 1:80 y de hígado diluido 1:40, por medio de un método espectrofotométrico. Para ello se utilizó una microplaca y se preparó una mezcla de reacción (8.36 mL xantina 0.3 mM, 4.18 mL NBT 150  $\mu$ M, 4.18 mL EDTA 0.6 mM, 2.09 mL  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.4 M, 1.25 mL agua) de la cual se añadieron 150  $\mu$ L de la mezcla de reacción a 20  $\mu$ L de la muestra diluida, se adicionaron 20  $\mu$ L de XO (0.1 U/mL) y se leyó en un espectrofotómetro a  $\lambda=560$  nm. El método se basa en la capacidad de la SOD de inhibir indirectamente la formación del formazán a partir de la reducción de NBT ya que esta enzima dismuta el  $\text{O}_2^-$  generados por el sistema xantina-XO (Figura 20). Los resultados se expresaron como U/mg de proteína, en la que U indica la cantidad de NBT reducido.



**Figura 20. Fundamento de la determinación de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD).** SOD inhibe la reducción del azul de tetrazolio (NBT) por medio de su reacción con los aniones superóxido ( $\text{O}_2^-$ ). XO: xantina oxidasa,  $\text{O}_2$ : oxígeno,  $\text{H}_2\text{O}_2$ : peróxido de hidrógeno. La figura fue creada con <https://www-reaxys-com.pbidi.unam.mx:2443/#/structure-editor>.

### 7.6.2. Evaluación de la actividad de la enzima CAT

Se determinó en muestras del homogenado de tejido 1:10 (p/v) diluido 1:20 tanto para riñón como para hígado. Se siguió el método de Aebi [116], el cual se basa en la disminución de la absorbancia del  $\text{H}_2\text{O}_2$  por su degradación debido a la CAT

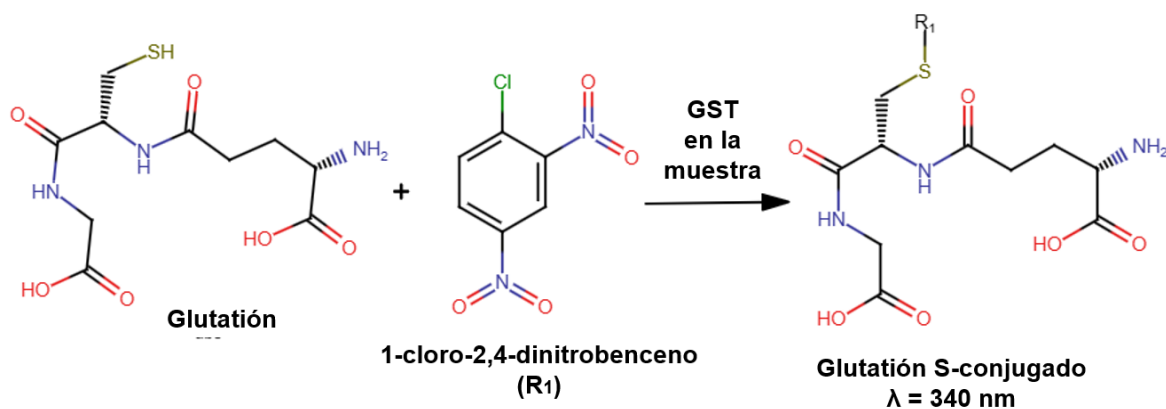
presente en la muestra (Figura 7). Para ello se utilizó una microplaca UV en la que se colocaron 11.66  $\mu\text{L}$  de la muestra diluida, se agregaron 338  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30 mM preparado con amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 7.0 y se leyó en un espectrofotómetro cada 15 segundos durante 30 segundos a una  $\lambda=240$  nm. Los resultados se expresaron como k/mg de proteína.

### 7.6.3. Evaluación de la actividad de la enzima GR

Se evaluó en muestras del homogenado de tejido 1:10 (p/v) diluido 1:20 para riñón y 1:3 para hígado. Se realizó de acuerdo al método descrito por Carlberg y Mannervik [117] el cual se basa en la desaparición de NADPH (Figura 10), en una microplaca de 96 pozos, se agregaron 11.47  $\mu\text{L}$  de muestra diluida y se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción (EDTA 0.5 mM, GSSG 1.25 mM y NADPH 0.1 mM en amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 7.6) y se leyó a una  $\lambda=340$  nm cada minuto durante 3 minutos. Los resultados se expresaron como U/mg de proteína, donde U es 1  $\mu\text{mol}$  de NADPH oxidado por minuto.

### 7.6.4. Evaluación de la actividad de la enzima GST

Se determinó mediante la metodología descrita por Habig et al. [118], la cual se basa en la reacción de conjugación que cataliza la GST entre el GSH y el CDNB (Figura 21). Para ello en una microplaca de 96 pozos se mezclaron 200  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción (137  $\mu\text{L}$  GSH 100 mM en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.5, 257  $\mu\text{L}$  CDNB 20 mM en DMSO) con 5  $\mu\text{L}$  de la muestra que es el homogenado de tejido 1:10 (p/v) y se leyó a una  $\lambda=340$  nm cada minuto durante 3 minutos. Los resultados se expresaron como U/mg de proteína, en donde U representa los mol de CDNB conjugado por minuto.



**Figura 21. Fundamento de la determinación de la actividad de la glutatión S-transferasa (GST).** GST cataliza la conjugación del 1-cloro-2,4-dinitrobenzenceno (R<sub>1</sub>)

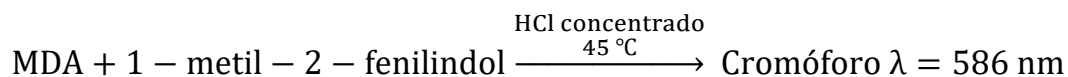
dando como resultado el glutati6n S-conjugado el cual absorbe a 340 nm. La figura fue creada con <https://www-reaxys-com.pbidi.unam.mx:2443/#/structure-editor>.

### 7.6.5. Evaluaci6n de la actividad de la enzima GPx

Para esta evaluaci6n se sigui6 la misma metodologfa descrita en el punto 7.4.3 pero utilizando como muestras los homogenados de los tejidos 1:10 (p/v), diluidos a 1:30 tanto para ri6n como para hfgado.

### 7.6.6. Determinaci6n cuantitativa de MDA

Se utiliz6 el homogenado de los tejidos 1:5. La concentraci6n de MDA se determin6 por medio de una curva estandar de tetrametoxipropano (Figura suplementaria 6D). A 200  $\mu$ L de muestra se agregaron 650  $\mu$ L de una soluci6n de 1M2F 15 mM (79.8 mg 1M2F en una mezcla acetnitrilo/metanol 3:1) y 150  $\mu$ L de HCl concentrado, se incub6 a 45°C durante 40 minutos, despu6s se centrifug6 5 minutos a 3000 xg y finalmente se ley6 a una  $\lambda$ =586 nm. Los resultados se expresaron como nmol de MDA/mg de protefna. El fundamento del m6todo se basa en la formaci6n del crom6foro formado entre el MDA y el 1M2F (Figura 22) [119].



**Figura 22. Reacci6n que describe la determinaci6n de malondialdehido (MDA).** El MDA cuando se encuentra en condiciones de temperatura de 45°C y en medio 6cido puede reaccionar con el 1-metil-2-fenilindol para dar origen a un crom6foro que se absorbe a 586 nm. HCl: 6cido clorhfdrico.

### 7.6.7. Determinaci6n de la capacidad antioxidante: ORAC

Para la determinaci6n de la capacidad antioxidante contra los radicales de oxfgeno, en especial peroxilo se emple6 el principio de la t6cnica descrita por Ou et al. [120], el cual indica el uso de fluorescefna como sonda fluorescente basado en el m6todo de Cao et al. [121] que hace uso de AAPH como generador de radicales libres peroxilo y trolox que es un an6logo de la vitamina E como un estandar control. Se utiliz6 un homogenado 1:10 p/v diluido 1:250 y plasma diluido 1:400. La concentraci6n de los equivalentes de trolox se obtuvieron por medio de una curva estandar de trolox (Figura suplementaria 6E). Se adicionaron en una microplaca negra 25  $\mu$ L de muestra, 25  $\mu$ L de una soluci6n de AAPH (AAPH 153 mM en amortiguador de fosfatos 75 mM pH 7.4) y 150  $\mu$ L de fluorescefna 50 nM, se ley6 a

485/528 nm a 37°C cada minuto durante 1:30 h. Los resultados se expresaron como equivalentes  $\mu\text{M}$  de trolox/g proteína.

## **8. Análisis estadístico**

Los resultados se expresaron como media  $\pm$  error estándar de la media (EEM). Los datos de los cursos temporales de toxicidad se analizaron con el programa GraphPad Prism 8.0.2 mediante un análisis de varianza (ANOVA) de 2 vías seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Sidak. Los datos obtenidos en las diferentes determinaciones fueron analizados mediante el software R versión 4.2.2. Primero se aplicó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk y la prueba de homocedasticidad Bartlett. Para los datos paramétricos se realizó la prueba de t-student (para datos no pareados) mientras que para los no paramétricos se realizó la prueba de Wilcoxon. Para todas las determinaciones, se consideró un valor de  $p < 0.05$  como estadísticamente significativo. Para el caso del análisis densitométrico, se analizaron las imágenes obtenidas mediante el programa ImageJ. Todos los gráficos fueron creados en el programa GraphPad Prism 8.0.2.

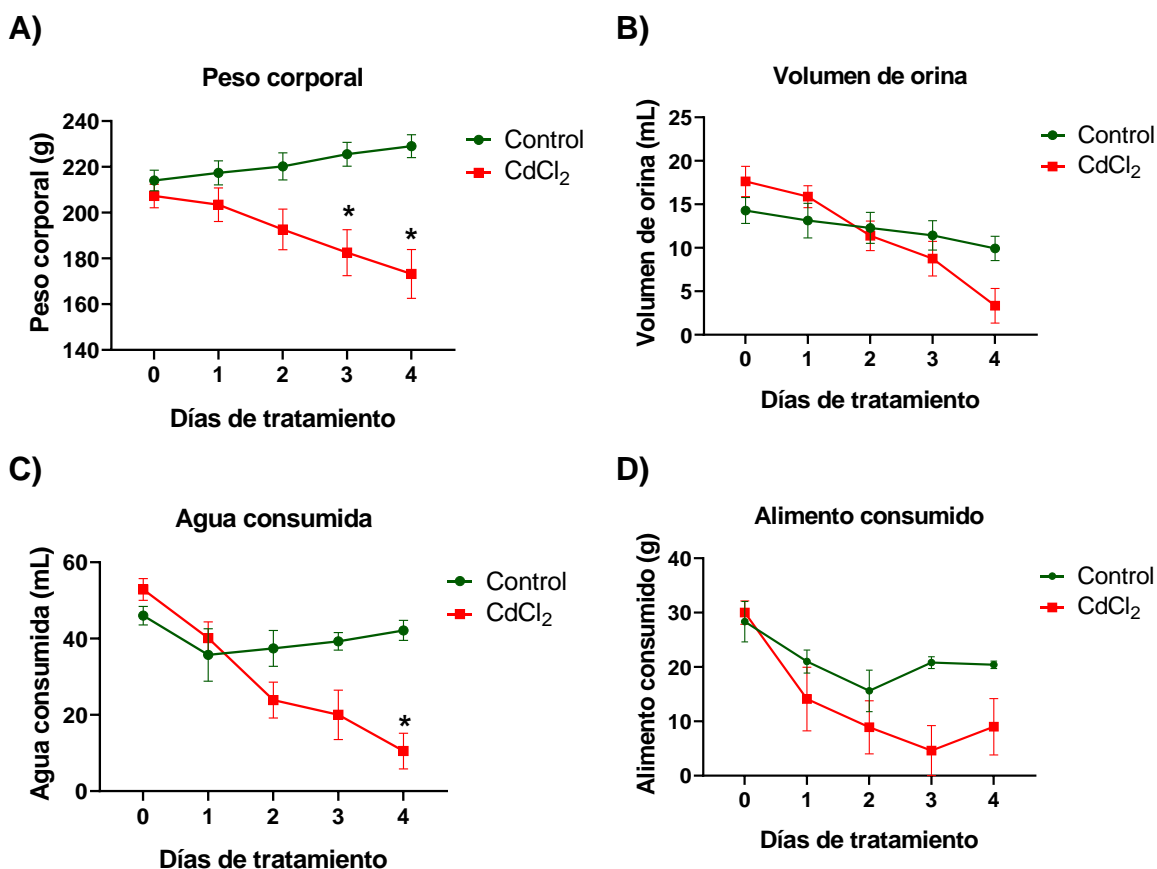
## **9. Resultados**

Se realizaron tres modelos de toxicidad aguda con  $\text{CdCl}_2$ , en los modelos 1 y 2 no se encontraron diferencias significativas en los marcadores de daño renal evaluados en plasma (Anexo 2). En el modelo experimental 3, primero se encontraron diferencias significativas de BUN, por lo tanto, este modelo fue al que se le determinaron las demás pruebas de daño renal, daño hepático y estrés oxidante, y son los resultados que a continuación se presentan.

### **9.1. Toxicidad aguda a la exposición de $\text{CdCl}_2$**

Durante el tratamiento se recabaron datos que indicaban signos de toxicidad como el peso del animal, la orina excretada, el agua y el alimento consumido, los cuales se representaron en cursos temporales (Figura 23), asimismo se consideraron características que presentó el grupo administrado con  $\text{CdCl}_2$  respecto al grupo control (Tabla 12). En este modelo, el Cd provocó al cuarto día de tratamiento en los animales tratados con  $\text{CdCl}_2$  respecto al grupo control, la pérdida del 24% de peso corporal (Figura 23A), la disminución del 66% del volumen de orina excretada (Figura 23B), una disminución del 75% del agua consumida (Figura 23C), una

disminución del 56% del alimento consumido (Figura 23D), diarrea, alteración en su comportamiento, disminución de la locomoción, que los animales presentaran el pelo erizado y al momento del sacrificio se encontró que, en su mayoría, los animales tratados con CdCl<sub>2</sub> tenían ascitis. Por lo tanto, el CdCl<sub>2</sub> es un xenobiótico tóxico.



**Figura 23. Cursos temporales de signos de toxicidad aguda a cloruro de cadmio (CdCl<sub>2</sub>).** A) peso corporal, B) volumen de orina, C) agua consumida y D) alimento consumido, los cuales fueron recabados para ambos grupos (control y CdCl<sub>2</sub>). Los datos fueron evaluados con un análisis de varianza (ANOVA) de 2 vías seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Sidak. n= 3-8 animales por grupo. Los datos están expresados como media ± error estándar de la media (EEM). \*p<0.05.

**Tabla 12. Manifestaciones clínicas de la toxicidad aguda por cloruro de cadmio (CdCl<sub>2</sub>).**

Grupo	Control							CdCl <sub>2</sub>							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Rata															
Parámetro	Día cero (sin tratamiento)														
Pelo erizado	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Diarrea	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Comportamiento	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Locomoción	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Día 1 (después de 24 h de la primera administración)																
Pelo erizado	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	✓	X	X	X	X	X
Diarrea	X	X	X	X	X	X	X	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓
Comportamiento	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Locomoción	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Día 2 (después de 24 h de la segunda administración)																
Pelo erizado	X	X	X	X	X	X	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Diarrea	X	X	X	X	X	X	X	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓
Comportamiento	N	N	N	N	N	N	N	I	I	I	A	I	I	I	I	A
Locomoción	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	X	X	✓	X	X	X	X	✓
Día 3 (después de 24 h de la tercera administración)																
Pelo erizado	X	X	X	X	X	X	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Diarrea	X	X	X	X	X	X	X	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓
Comportamiento	N	N	N	N	N	N	N	I	I	I	A	I	I	I	I	A
Locomoción	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	X	X	✓	X	X	X	X	✓
Día 4 (después de 24 h de la cuarta administración)																
Pelo erizado	X	X	X	X	X	X	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Diarrea	X	X	X	X	X	X	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Comportamiento	N	N	N	N	N	N	N	I	I	I	A	I	I	I	I	A
Locomoción	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	X	X	✓	X	X	X	X	✓
Sacrificio (24 h después de la última administración)																
Ascitis	X	X	X	X	X	X	X	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓

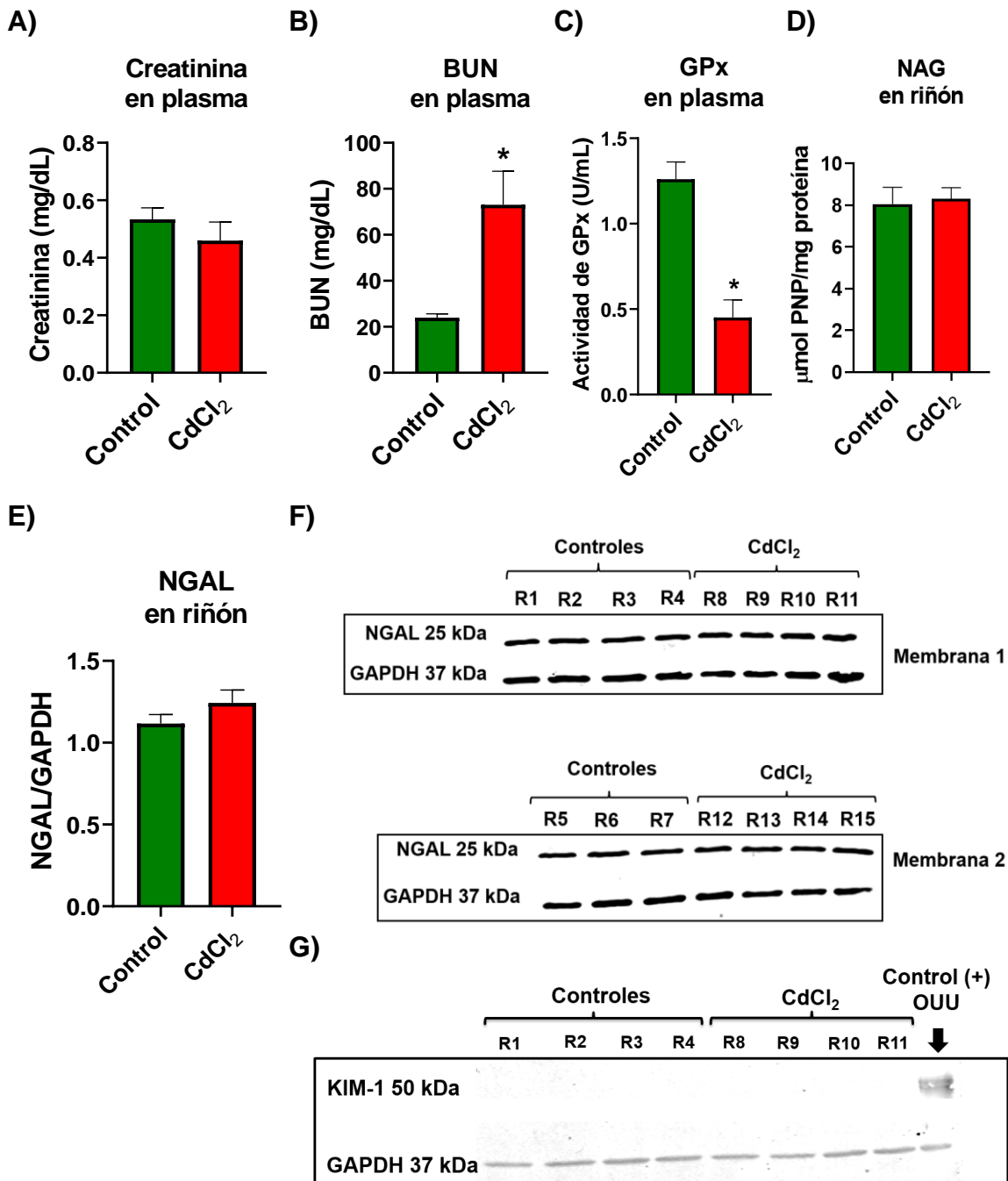
Abreviaturas: N: normal, A: agresivo, I: inerte, ✓: presenta la característica, X: no presenta la característica. n=7-8 animales por grupo.

## 9.2. Efecto de la exposición aguda a CdCl<sub>2</sub> en los marcadores de daño renal

La evaluación del daño renal se realizó mediante la determinación de diversos marcadores biológicos (Figura 24). Los animales administrados con el tratamiento de CdCl<sub>2</sub> presentaron un incremento del 205% del BUN plasmático respecto al control (Figura 24B) y una disminución del 64% en la actividad de la enzima GPx en plasma respecto al control (Figura 24C), sin embargo, no se observa un cambio estadísticamente significativo de los marcadores de creatinina sérica (Figura 24A), NAG en riñón (Figura 24D) y NGAL en riñón (Figura 24E y 24F). En el caso de KIM-1 no se presentó expresión de esta proteína, por ello se incluyó un control positivo, el cual fue una muestra de homogenado de riñón de una rata macho Wistar con daño renal debido a una obstrucción unilateral de uréter (OUU) para corroborar que la metodología se llevara a cabo correctamente (Figura 24G), mientras que para el



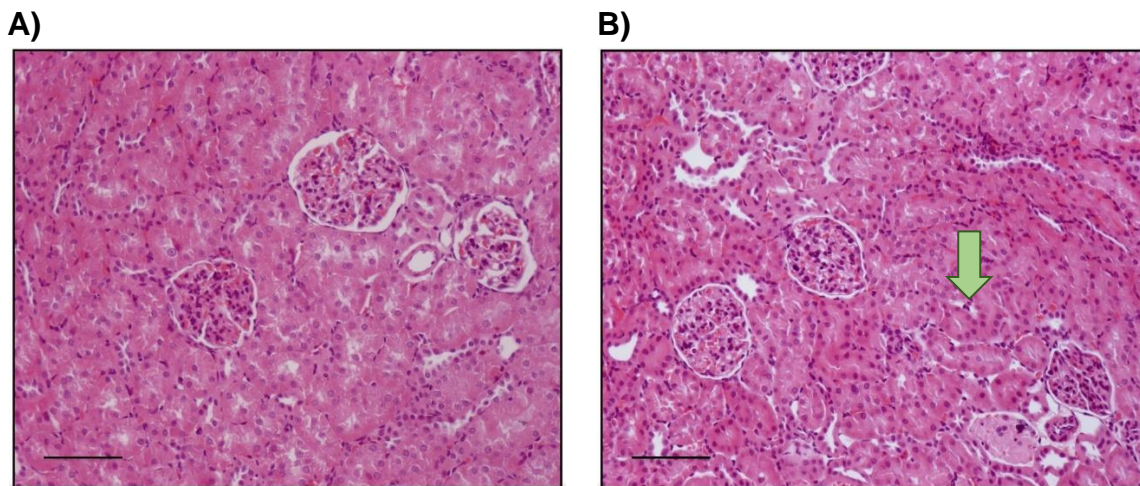
estuche con el que se evaluó la creatinina se elaboró una curva utilizando el patrón de creatinina del mismo para confirmar que el estuche funciona adecuadamente (Figura suplementaria 6A).



**Figura 24. Evaluación de marcadores de daño renal.** A) creatinina en plasma, B) nitrógeno de urea en sangre (BUN) en plasma, C) actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPx) en plasma, D) concentración de la N-acetil-β-D-glucosaminidasa (NAG) en riñón, F) inmunotransferencia de la lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL) con su respectivo E) análisis densitométrico, G) inmunotransferencia representativa de la molécula 1 de lesión renal (KIM-1) con control positivo (+) de una rata Wistar macho con obstrucción unilateral de uréter

(OUU). Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) fue utilizado como control de carga. Los datos de creatinina y NGAL fueron analizados con una t-student no pareada de 1 cola derecha, los datos de GPx fueron analizados con una t-student no pareada de 1 cola izquierda, los datos de NAG fueron analizados con una t-student no pareada de 2 colas y BUN fue analizado con una prueba Wilcoxon de 1 cola derecha. n= 7-8 animales por grupo. Los datos están expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (EEM). \*p<0.05. Abreviaturas: CdCl<sub>2</sub>: cloruro de cadmio, R: rata.

Para identificar los daños estructurales y las alteraciones en la morfología de los riñones, además de relacionarlo con los resultados obtenidos en los marcadores biológicos se realizó un análisis histológico de tejido renal por medio de la tinción H&E (Figura 25), en la cual se observó un daño tubular local en el riñón de los animales sometidos al tratamiento con CdCl<sub>2</sub>.

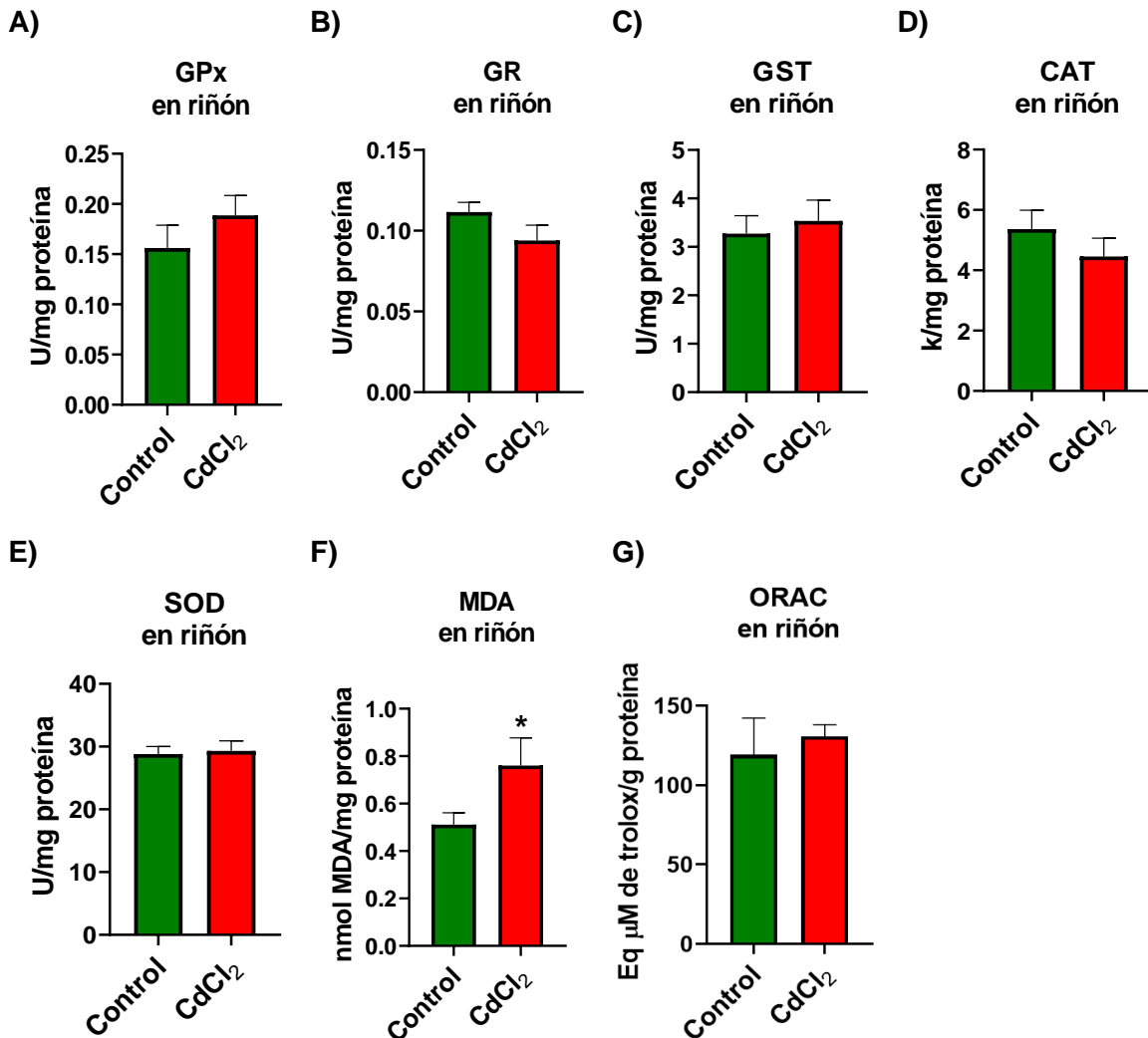


**Figura 25. Imágenes representativas de la tinción con hematoxilina y eosina (H&E) en tejido renal observadas a 10X.** Imágenes representativas de la tinción H&E en tejidos de riñón de animales control (A) en los que se presentan glomérulos y túbulos, y de animales administrados con el tratamiento de cloruro de cadmio (CdCl<sub>2</sub>) (B), donde se presentó daño tubular local no muy extenso pues en algunas zonas se observan núcleos de células fuera de los túbulos (flecha verde). Fotomicrografía observada a 10 X, barra de referencia de 100  $\mu$ m.

### **9.3. Efecto de la exposición aguda a CdCl<sub>2</sub> en los marcadores de estrés oxidante en el riñón**

Dado que se ha informado que el Cd genera estrés oxidante mediante la alteración de la actividad de las enzimas antioxidantes y por inducir a la peroxidación de lípidos se evaluaron biomarcadores de estrés oxidante en el riñón posterior a las pruebas de daño renal (Figura 26). Sólo se encontró un incremento del 49% de la concentración de MDA (Figura 26F) en los animales tratados con CdCl<sub>2</sub> respecto al

control, mientras que las actividades de GPx (Figura 26A), GR (Figura 26B), GST (Figura 26C), CAT (Figura 26D) y SOD (Figura 26E) no presentaron cambios significativos, al igual que ORAC en el tejido (Figura 26G).

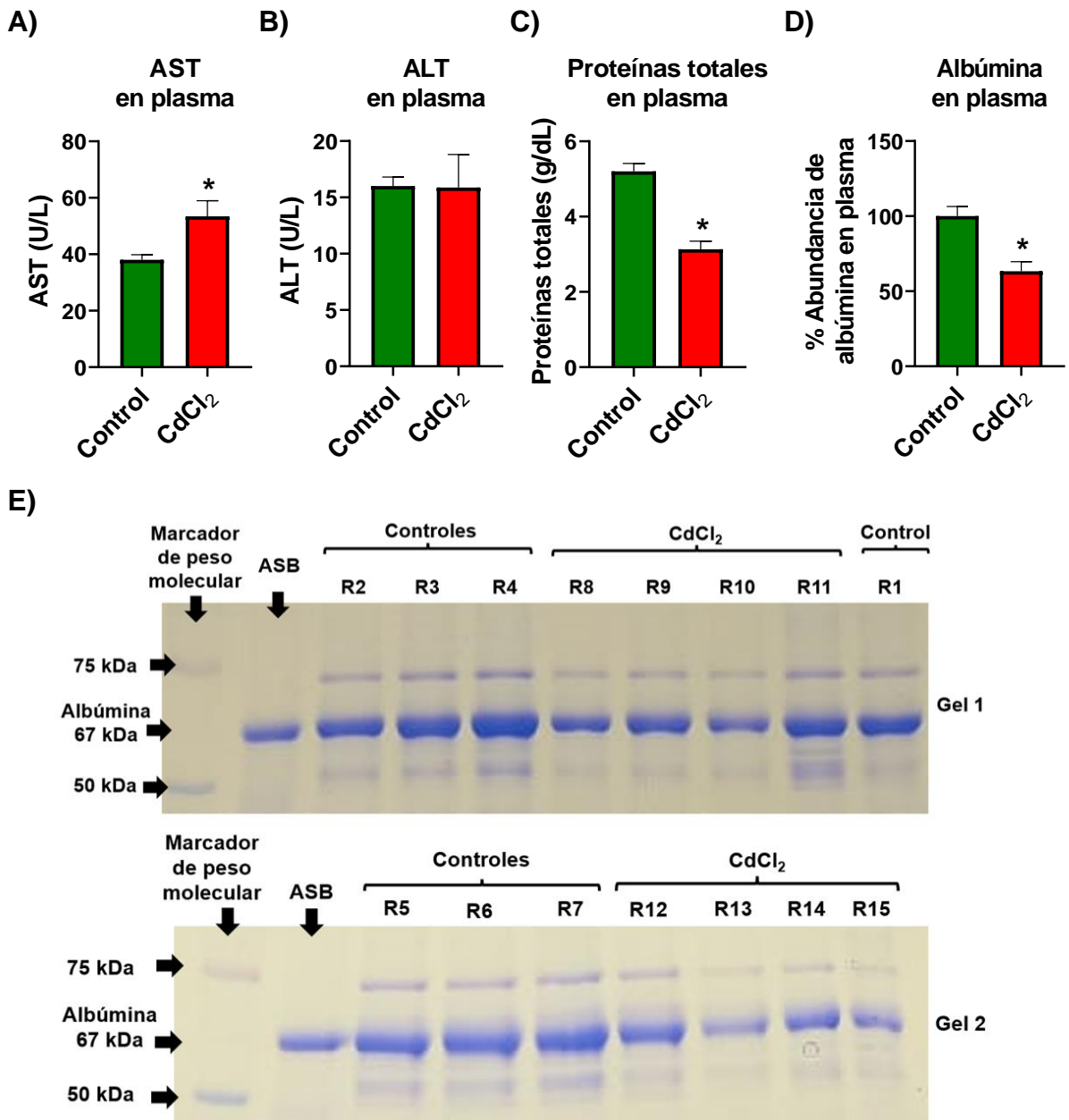


**Figura 26. Evaluación de marcadores de estrés oxidante en riñón.** A) glutatión peroxidasa (GPx), B) glutatión reductasa (GR), C) glutatión S-transferasa (GST), D) catalasa (CAT), E) superóxido dismutasa (SOD), F) malondialdehído (MDA), G) capacidad de absorción de radicales libres de oxígeno (ORAC). Los datos de GPx, GR, GST, CAT y SOD fueron analizados por medio de la prueba t-student no pareada de 2 colas, mientras que los datos de MDA y ORAC fueron analizados por medio de la prueba Wilcoxon de 1 cola derecha e izquierda respectivamente. n=7-8 animales por grupo. Los datos están expresados como media ± error estándar de la media (EEM). \*p<0.05. Abreviaturas: CdCl<sub>2</sub>: cloruro de cadmio, Eq: equivalentes.

#### 9.4. Efecto de la exposición aguda a CdCl<sub>2</sub> en los marcadores de daño hepático

Dado que los animales administrados con CdCl<sub>2</sub> presentaron ascitis y el Cd ha sido señalado como un metal hepatotóxico, se procedió a evaluar marcadores de daño

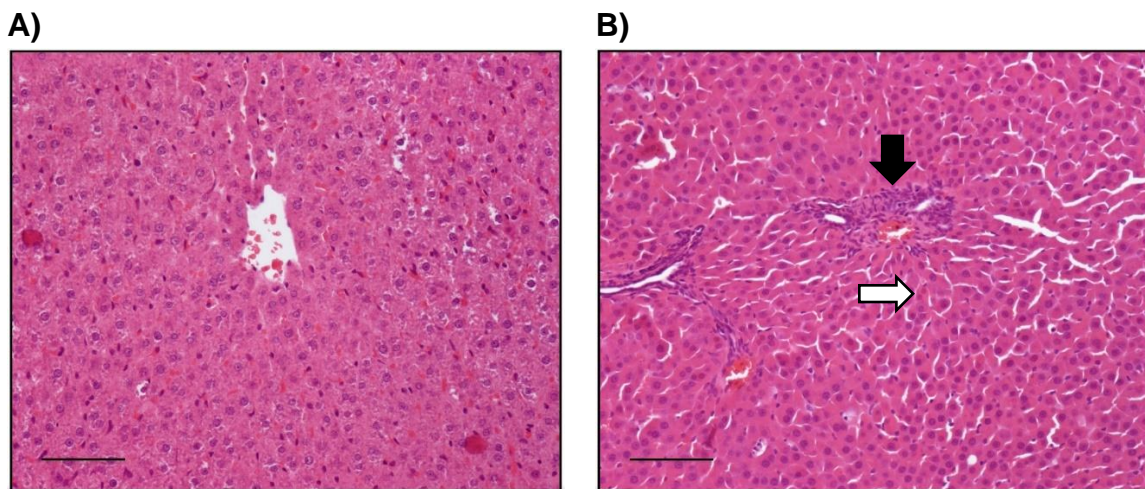
hepático (Figura 27). Se encontró un aumento del 40% de los niveles de AST plasmática (Figura 27A), una disminución del 40% en la concentración de proteínas totales (Figura 27C) y una disminución del 37% de la abundancia de albúmina plasmática (Figura 27D y 27E), mientras que la determinación de los niveles de ALT plasmática (Figura 27B) no presentó un cambio estadísticamente significativo. Lo anterior indica que el hígado de los animales administrados con CdCl<sub>2</sub> presenta daño y alteraciones funcionales.



**Figura 27. Evaluación de marcadores de daño hepático.** A) aspartato aminotransferasa (AST), B) alanina aminotransferasa (ALT), C) concentración de proteínas totales en plasma, D) abundancia de albúmina en plasma y E) patrón electroforético de proteínas en plasma. Los datos de AST y ALT fueron analizados

por medio de la prueba Wilcoxon de 1 cola derecha, mientras que los datos de la concentración de proteínas totales y la abundancia de albúmina fueron analizados por medio de la prueba t-student no pareada de 1 cola izquierda. n=7-8 animales por grupo. Los datos están expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (EEM). \* $p < 0.05$ . Abreviaturas: ASB: albúmina sérica bovina, CdCl<sub>2</sub>: cloruro de cadmio, R: rata.

Al igual que en el riñón, se realizó una tinción H&E para el tejido hepático (Figura 28) con la finalidad de encontrar modificaciones estructurales y así confirmar el daño detectado en los marcadores biológicos. El hígado de los animales administrados con CdCl<sub>2</sub> presentaron alteraciones morfológicas de las células hepáticas y daño vacuolar en el citoplasma.

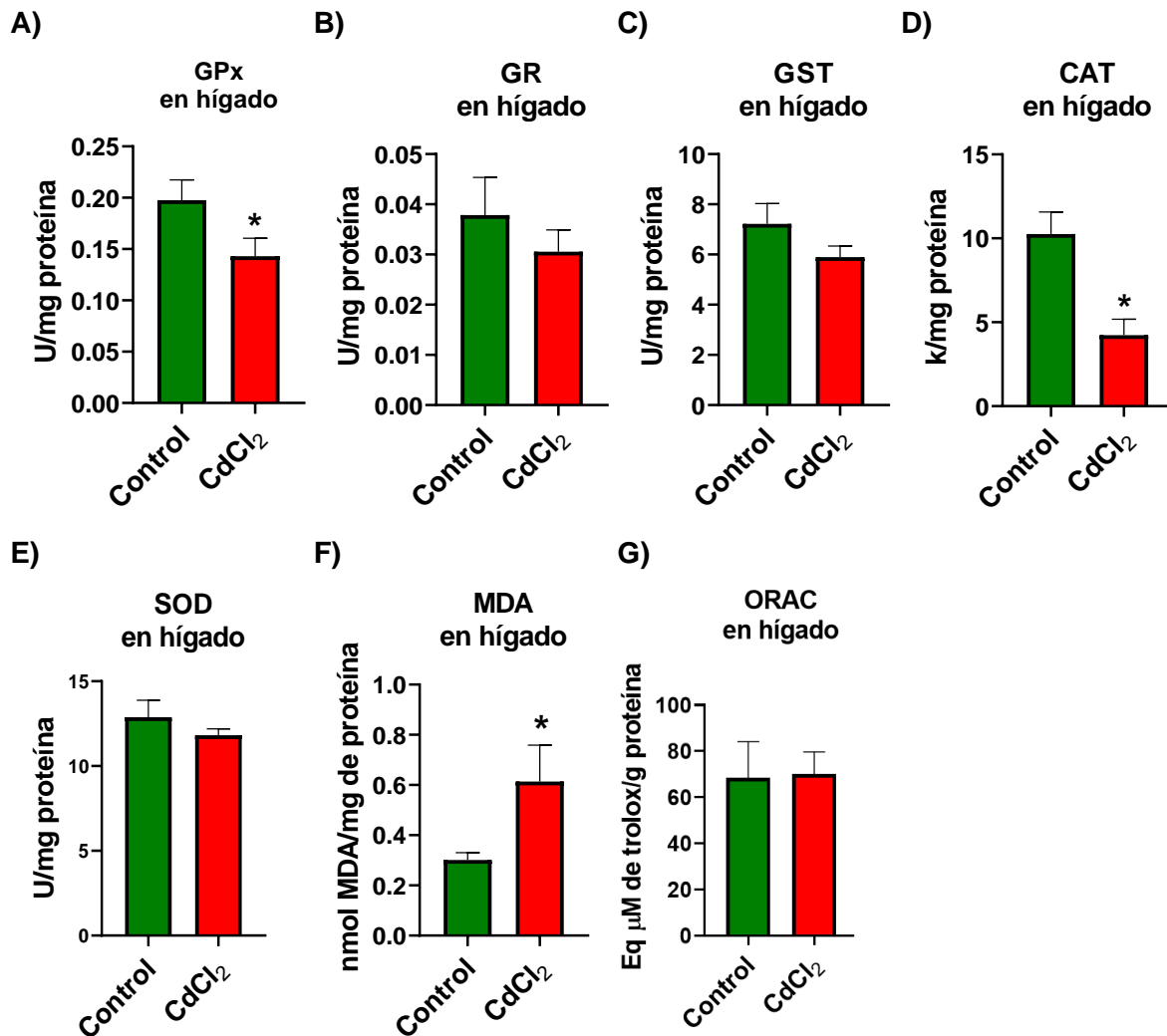


**Figura 28. Imágenes representativas de la tinción con hematoxilina y eosina (H&E) en tejido hepático observadas a 10X.** Se realizó la tinción a muestras de tejido de hígado de los animales control (A) las cuales presentan a los hepatocitos organizados en cadenas alrededor de la vena porta hepática, y de animales administrados con el tratamiento de cloruro de cadmio (CdCl<sub>2</sub>) (B) los cuales presentan daño hepático expresado con células hepáticas binucleadas (flecha blanca) y con núcleos picnóticos (flecha negra), asimismo se presenta inflamación en la zona periportal y un daño vacuolar en el citoplasma, en especial se puede observar estas manifestaciones en los hepatocitos que se encuentran cercanos a la vena porta. Fotomicrografía observada a 10 X, barra de referencia de 100  $\mu$ m.

### **9.5. Efecto de la exposición aguda a CdCl<sub>2</sub> en los marcadores de estrés oxidante en el hígado**

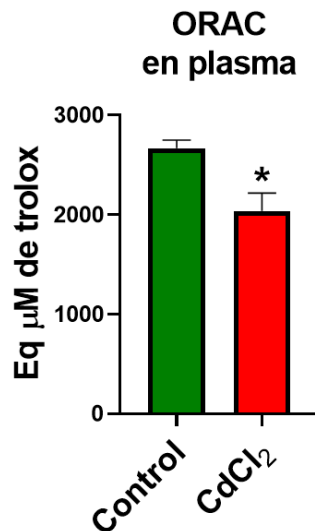
De igual forma que en el riñón, se evaluaron marcadores de estrés oxidante en el hígado (Figura 29). Se encontró en los animales tratados con CdCl<sub>2</sub> un incremento del 104% de la concentración de MDA (Figura 29F), una disminución del 28% de la actividad de GPx en el hígado (Figura 29A) y una disminución del 59% de la actividad de CAT en el hígado (Figura 29D) respecto al grupo control, por lo tanto,

existe la presencia de estrés oxidante en este órgano en mayor medida a comparación que el riñón. Sin embargo, no se encontró cambios estadísticamente significativos en las determinaciones de GR (Figura 29B), GST (Figura 29C) y SOD (Figura 29E) y ORAC (Figura 29G).



**Figura 29. Evaluación de marcadores de estrés oxidante en hígado.** A) glutatión peroxidasa (GPx), B) glutatión reductasa (GR), C) glutatión S-transferasa (GST), D) catalasa (CAT), E) superóxido dismutasa (SOD), F) malondialdehído (MDA) y G) capacidad de absorción de radicales libres de oxígeno (ORAC). Los datos de GPx y ORAC fueron analizados con una t-student no pareada de 1 cola izquierda, los datos de GR, GST y SOD fueron analizados con una prueba Wilcoxon de 2 colas, los datos de CAT fueron analizados con una prueba t-student no pareada de 2 colas y MDA fue analizado con Wilcoxon de 1 cola derecha. n=7-8 animales por grupo. Los datos están expresados como media ± error estándar de la media (EEM). \*p<0.05. Abreviaturas: Eq: equivalentes, CdCl<sub>2</sub>: cloruro de cadmio.

Finalmente se evaluó también ORAC en plasma la cual indica que el sistema antioxidante del grupo administrado con CdCl<sub>2</sub> se encuentra alterado, disminuyendo un 24% su capacidad antioxidante respecto al grupo control (Figura 30).



**Figura 30. Evaluación de la capacidad de absorción de radicales libres de oxígeno (ORAC) en plasma.** Los datos obtenidos fueron analizados por medio de la prueba de Wilcoxon de 1 cola izquierda. n=6-7 animales por grupo. Los datos están expresados como media ± error estándar de la media (EEM). \*p<0.05. Abreviaturas: Eq: equivalentes, CdCl<sub>2</sub>: cloruro de cadmio.

## 10. Discusión

El Cd es un metal que últimamente se ha estudiado por su efecto nefrotóxico y hepatotóxico. Ambos fenómenos se han explicado por la generación del estrés oxidante por parte de este metal, el cual tiene diversos mecanismos, dentro de los que destaca la alteración en la actividad de las enzimas antioxidantes, la activación de las NOXs, la generación indirecta de las ERO y la competencia con metales indispensables, entre otros más. Este metal ha cobrado importancia dado sus efectos tóxicos y la constante exposición a la que está sometido el ser humano. Por ello se han llevado a cabo distintos estudios *in vitro* e *in vivo* sobre este metal, de los que destacan los últimos pues este tipo de estudios son considerados como aquellos que representan de mejor manera los efectos que podría tener un humano. No obstante, en el caso del Cd existen una diversidad de estudios *in vivo*, los cuales difieren de la dosis administrada y el tipo de estudio según el tiempo que comprende (agudo, subagudo, crónico y subcrónico), de forma que surge la necesidad de

estandarizar un modelo que represente los efectos nefrotóxicos y hepatotóxicos del Cd.

Para establecer el modelo de daño agudo se optó por usar la vía i.p. ya que es una vía de administración rápida, fácil de emplear y con menor probabilidad de inducir estrés a los animales, además de que a comparación de la vía oral evita el tracto gastrointestinal, lo que permite tener un efecto del xenobiótico en un menor tiempo. Cabe mencionar que según una comparación de perfiles farmacocinéticos de distintas vías de administración respecto a la vía i.p. concluyeron Al Shoyaib et al. [122] que esta vía garantiza la biodisponibilidad de moléculas de pequeñas o de gran tamaño, es robusta, su grado de absorción es más rápida que otras vías de administración convencionales y puede ser usada hasta en estudios crónicos por su facilidad para realizar administraciones repetidas y consecutivas.

Se han descrito modelos agudos con vía de administración i.p. en la literatura que demuestran el efecto nefrotóxico y hepatotóxico del Cd además de relacionarlos con el estrés oxidante. Ejemplo de ellos son el modelo de Salama SA et al. [92] que emplearon una dosis de 25 mg/kg p.c./día CdCl<sub>2</sub> i.p. durante 7 días. Los autores encontraron un incremento en los niveles de BUN, creatinina sérica, MDA y un aumento en la expresión proteica de KIM-1, además de una disminución de GSH y en la actividad de enzimas antioxidantes como GPx y CAT en el riñón. Otro modelo agudo en donde se demuestra el efecto del Cd con la misma vía de administración es el de Dkhil et al. [97], los cuales utilizaron una dosis de 6.5 mg/kg p.c./día CdCl<sub>2</sub> durante 5 días y encontraron un incremento en los niveles de AST, ALT, ALP, MDA, creatinina y urea, además de una disminución en la actividad de enzimas antioxidantes SOD, GPx y GR en hígado y en el riñón. Dado lo anterior se esperaba tener resultados similares con el modelo propuesto.

En el modelo propuesto en este trabajo de 4 mg/kg p.c./día CdCl<sub>2</sub> i.p. durante 4 días se evaluaron indicadores de toxicidad y distintos marcadores para identificar daño renal, daño hepático y estrés oxidante en el riñón e hígado.

Respecto a la toxicidad generada por el Cd, se observó una disminución del peso corporal, de orina excretada, de agua y comida consumidas, además de



manifestaciones clínicas como el pelo erizado, diarrea, comportamiento y locomoción afectados.

Se ha descrito que la pérdida de peso corporal es uno de los signos de toxicidad del Cd [95], [123], el cual se ha asociado a la unión con MT, generando la acumulación del Cd y consecuentemente provoca el agotamiento muscular [124]. Se ha descrito a la anuria en otros estudios, por ejemplo, Ansari et al. [4] encontraron este mismo fenómeno, además dentro de los síntomas que presenta la IRA se encuentra el cambio en el volumen urinario, falta de apetito y debilidad [125], [126].

El daño en la locomoción de los animales se puede relacionar con el efecto del Cd asociado a trastornos óseos, confirmándolo Ochocka et al. [127] que encontraron una relación dosis-respuesta respecto a concentraciones de Cd y la disminución de la densidad ósea [127], además existen otros estudios donde describen el mecanismo del daño óseo inducido por Cd. Por ejemplo, Berglund et al. [128] mencionan que el Cd tiene múltiples mecanismos de daño óseo resaltando la relación que tiene con el daño tubular renal, alteraciones en el metabolismo del  $Ca^{2+}$ , también se han informado daños óseos sin presencia clara de daño renal afectando directamente a la mineralización ósea [128]. Respecto al comportamiento de los animales, se puede vincular al efecto neurotóxico del Cd [129] en el sistema nervioso central, de modo que este metal no solo afecta al riñón y al hígado sino también a otros órganos.

Es importante mencionar que un marcador ideal de daño renal para la determinación de la TFG debería encontrarse en el plasma a una velocidad constante, se filtraría libremente en el glomérulo, no debería ser reabsorbido ni secretado por el túbulo renal y no se sometería a eliminación extrarrenal, no obstante, aún no se tiene un marcador ideal para la determinación de daño renal por ello se hace uso de varios marcadores que indican alguna alteración en el sistema renal [130].

En este modelo se evaluó el daño renal mediante la determinación de marcadores de filtración glomerular como son creatinina y BUN, de los cuales solo el BUN aumentó de manera significativa, no obstante, este marcador no es totalmente confiable pues se ha descrito en la literatura que es afectado por diversos factores, por ejemplo, una dieta alta en proteínas [31], además una desventaja que tiene es

que se reabsorbe a nivel tubular [130], por lo que no necesariamente BUN cambia sus valores debido a una lesión renal, razón por la cual es indispensable realizar otras pruebas para detectar daño renal como creatinina, la cual en este caso no cambió sus valores, sin embargo también hay que considerar que este marcador puede ser afectado por diversos factores como la masa muscular ya que la mayor parte de la creatinina se produce en el músculo y en este caso los animales disminuyeron su peso corporal lo cual pudo afectar en el valor de creatinina [131], además una desventaja que tiene este marcador es que para obtener un cambio en los valores de creatinina se requiere de, al menos, el 50% de reducción en la TFG de forma que en caso de existir un daño renal temprano no hay cambios de este marcador. A pesar de ello se considera mejor marcador que BUN ya que es libremente filtrada en el glomérulo y no es absorbida ni metabolizada por el riñón [132].

Dado que BUN y creatinina no son considerados como marcadores que detecten daño renal temprano [38] se realizaron otras pruebas para daño renal que detectan especialmente daño tubular, incluidos GPx en plasma, NAG, KIM-1 y NGAL. Además de realizar un análisis histológico con la tinción H&E.

La actividad de GPx en plasma disminuyó lo cual indica un daño renal ya que la isoforma que se encuentra en plasma es sintetizada en las células tubulares proximales del riñón, por lo tanto, depende en gran medida de la función renal [33]. Sin embargo, otros marcadores que detectan daño tubular como NAG, KIM-1 y NGAL no tuvieron cambios significativos, los cuales son catalogados como biomarcadores de detección temprana de daño renal [133].

Para poder corroborar y contrastar los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas se realizó un análisis histológico del tejido renal, en el cual se encontró un mínimo daño tubular local evidenciado por núcleos que se encuentran fuera de los túbulos, dicho daño seguramente no es el suficiente para ser detectado por algunas pruebas como creatinina, KIM-1, NAG y NGAL, y solo fue detectado por BUN y GPx plasmática considerando que estos dos marcadores pueden estar influenciados por otros factores por lo que para confirmar un daño renal evidente tendrían que presentar alteraciones la mayoría de biomarcadores. Tanto las

pruebas bioquímicas como el análisis histológico concuerdan en que el daño renal generado por el Cd prácticamente es nulo.

Para el estrés oxidante en riñón se evaluó la actividad de las enzimas antioxidantes, la concentración de MDA y la capacidad antioxidante en el tejido. Las enzimas antioxidantes evaluadas fueron GPx, GR, GST, CAT y SOD, las cuales no presentaron alteraciones en sus valores, indicando que el Cd no modifica la actividad de estas enzimas en este órgano. Sucedió lo mismo con la capacidad antioxidante, no obstante presentó un incremento de MDA que indica que el Cd está induciendo la peroxidación de lípidos, lo cual se ha descrito en la literatura que menciona que uno de sus mecanismos de generación de estrés oxidante es por medio de la peroxidación de lípidos y se ha demostrado por diversos estudios que el Cd genera un incremento de MDA [77], de tal forma que a esta dosis en el riñón solamente se está llevando a cabo dicho proceso y en consecuencia comienza a generar un daño a nivel tubular local tal como se observó en la histología.

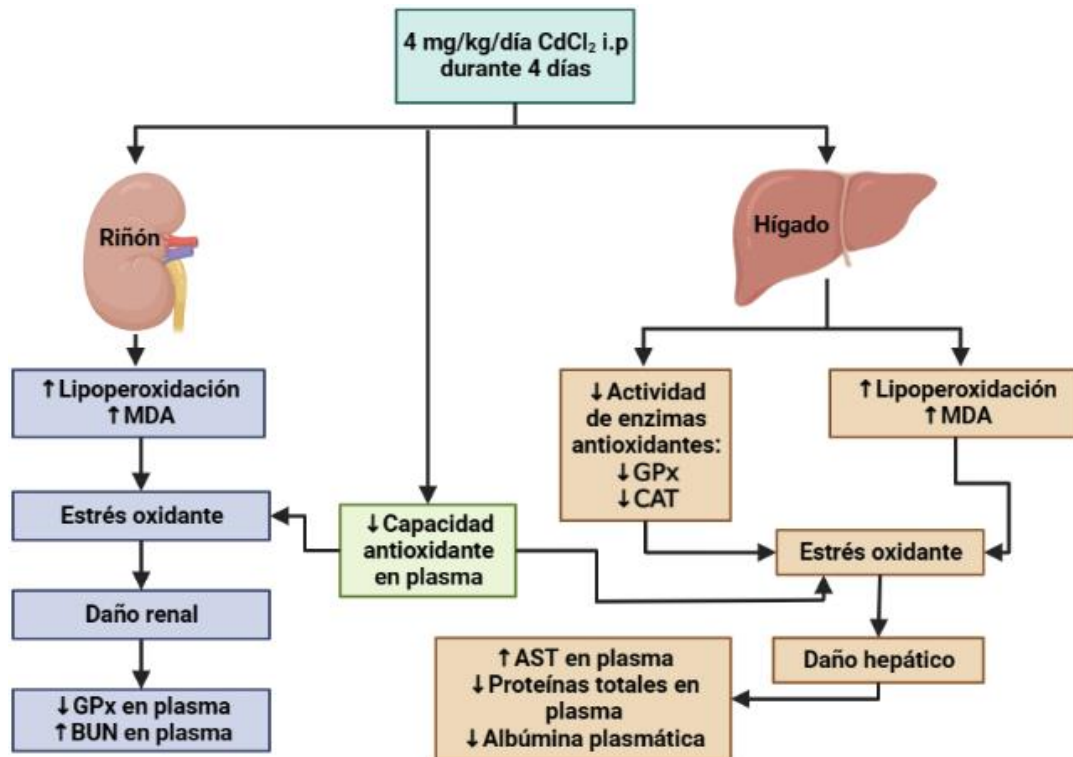
La ascitis presentada en los animales se encuentra ampliamente asociada al daño hepático, esta acumulación de líquido en la zona peritoneal depende principalmente del balance de la presión hidrostática y coloidosmótica (también conocida como oncótica), dado que en los sinusoides hepáticos se regula la presión hidrostática que a su vez modula la entrada y salida de líquidos, cuando existe una lesión hepática se comprimen las venas incrementando la presión hidrostática propiciando la salida de líquidos hacia la cavidad peritoneal [134], [135]. Dado lo anterior se evaluó el daño hepático mediante la determinación de diversos biomarcadores como AST, ALT, la concentración de proteínas totales y la abundancia de albúmina plasmática.

Los niveles de ALT no presentaron cambios significativos a diferencia de AST que presentó un incremento en sus niveles, de modo que, aunque ALT no presentó cambios significativos, AST indica un daño hepático debido a que una lesión en los hepatocitos genera la fuga de AST en el compartimiento extracelular incrementando sus niveles séricos [136]. Además, la concentración de proteínas totales y la abundancia de albúmina plasmática disminuyeron significativamente, lo que

significa que la síntesis de proteínas se está afectando y consecuentemente la función hepática.

Así como con el riñón, en el hígado se realizó una tinción H&E para contrastar los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas, dando como resultado un daño más evidente que el obtenido en el riñón, dicho daño se encuentra evidenciado por la inflamación en la zona periportal, núcleos picnóticos que es una alteración nuclear común de las células en proceso de muerte [61], además de un daño vacuolar que indica la entrada de líquido al citoplasma expandiendo los compartimientos celulares, ambas alteraciones coincide con lo descrito con Mostafa et al. [101].

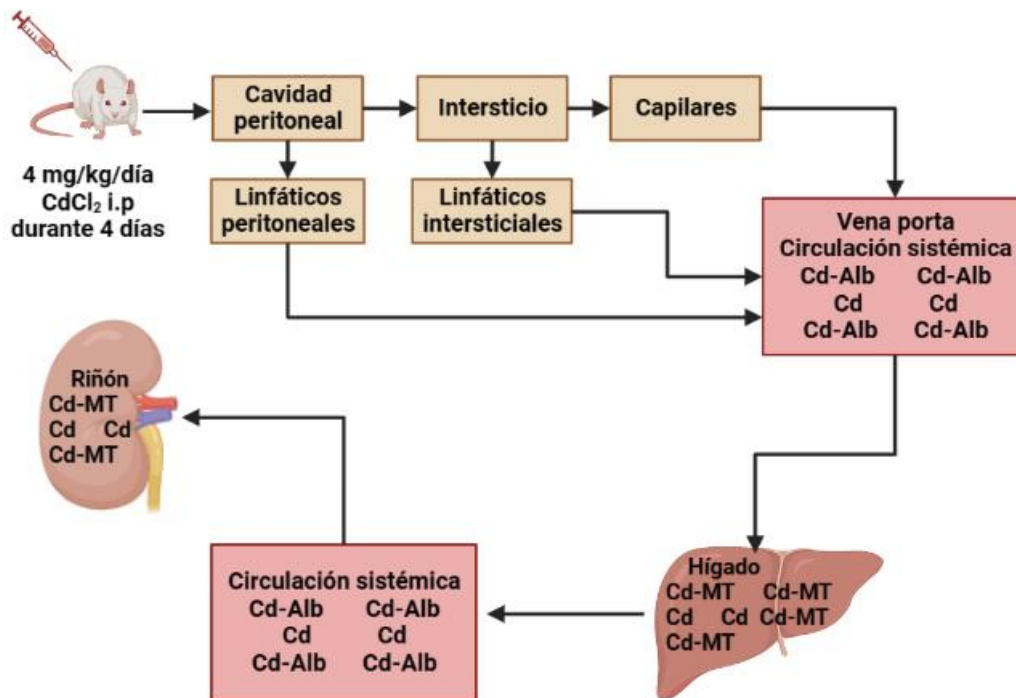
El daño hepático encontrado se relacionó con el estrés oxidante mediante la evaluación de la concentración de MDA en donde se encontró elevado su valor indicando el proceso de peroxidación lipídica, además de la actividad de diversas enzimas antioxidantes: GPx, GR, GST, CAT y SOD, de las cuales se observó una disminución significativa de GPx y CAT las cuales son enzimas que se encargan de la degradación de  $H_2O_2$ , por lo que se estará acumulando esta ERO alterando el equilibrio entre las especies antioxidantes y las ERO. Estas ERO pueden extraer un hidrógeno a un ácido graso para formar un radical lipídico que se puede convertir en hidroperóxidos y finalmente MDA. La evaluación de la capacidad antioxidante resultó sin cambios significativos en el hígado, caso contrario al plasma en donde si se encontró una disminución significativa, de manera que se puede observar la alteración de la capacidad antioxidante a nivel circulatorio, pero no en los órganos específicamente. Dado lo anterior se percibe una relación entre el estrés oxidante y el daño hepático, más evidente que en el riñón. Todo lo anterior se encuentra representado en la Figura 31 mediante un esquema integrativo.



**Figura 31. Diagrama integrativo del modelo *in vivo* realizado.** Se administró 4mg/kg/día de cloruro de cadmio ( $\text{CdCl}_2$ ) por vía intraperitoneal (i.p.), el cual se distribuyó a riñón e hígado generando una serie de alteraciones en los marcadores de estrés oxidante como malondialdehído (MDA), actividad de algunas enzimas antioxidantes resultando en alteraciones en los marcadores de daño renal como la enzima glutatión peroxidasa (GPx) en plasma y el nitrógeno de urea en sangre (BUN), y de daño hepático como la aspartato aminotransferasa (AST) plasmática, proteínas totales en plasma y la abundancia de albúmina plasmática. La figura fue creada con BioRender.com.

La posible razón de encontrar daño hepático sin encontrar daño renal prominente es dada la toxicocinética del Cd. Partiendo de que la vía de administración fue i.p., se sabe que a través de esta se puede ingresar un xenobiótico por medio de la cavidad peritoneal a circulación sistémica (Figura 32). Primero llega a la vena porta para conducirse al hígado donde es metabolizado [137], de manera que este órgano tiene contacto con el metal antes que el riñón, comienza a tener interacción con las MT y a almacenarse para posteriormente dirigirse al riñón, sumando a ello la dosis empleada pues el modelo propuesto implicaba una dosis aguda, la cual a comparación de un modelo subcrónico tiene alteraciones menores, por ejemplo, Albasher et al. [98] describieron que emplearon una dosis de 3.5 mg/kg/p.c./día  $\text{CdCl}_2$  i.p. durante 30 días sucesivos obteniendo cambios significativos en creatinina, KIM-1, urea en sangre, actividad SOD, CAT, GPx, GR, GSH, entre otros

más, siendo resultados de hasta el doble en cuanto a valores de marcadores de daño renal [10]. Por lo tanto, la toxicidad del Cd está influenciada por la vía de administración, la dosis y el tiempo de exposición, obteniendo un daño hepático a partir de una exposición aguda y con una intoxicación crónica seguramente se encontraría un evidente daño renal [58].



**Figura 32. Distribución del cloruro de cadmio (CdCl<sub>2</sub>) después de su administración por vía intraperitoneal (i.p.).** El CdCl<sub>2</sub> se administró i.p., de forma que entra a la cavidad peritoneal, pasa a través de diferentes estructuras de la cavidad peritoneal para llegar a la vena porta, de manera que se dirige primero al hígado y posteriormente por medio de la circulación sistémica al riñón. La figura fue creada con BioRender.com.

## 11. Conclusión

Con base en los objetivos general y particulares, los cuales eran diseñar un modelo experimental *in vivo* de daño renal y hepático inducidos por CdCl<sub>2</sub> y relacionarlo con el estrés oxidante evaluando distintos marcadores se logró estandarizar un modelo que reproduce los efectos tempranos de la toxicidad inducida por este metal el cual implica la presencia de manifestaciones clínicas, daño hepático evidente acompañado de estrés oxidante y sin daño renal característico. Por lo que dicho modelo podría ser empleado para estudiar la exposición aguda de este metal, sin embargo, para poder estudiar específicamente el daño renal inducido por este metal

se tendría que utilizar un modelo distinto que implique un mayor tiempo de exposición.

Dado que se encontró la alteración en los valores de marcadores que se emplean para detectar daño hepático, los cuales fueron los niveles de AST, de proteínas plasmáticas y de albúmina plasmática, además de una alteración en los niveles de las enzimas GPx y CAT, así como los valores de MDA en el hígado de los animales tratados con CdCl<sub>2</sub> se puede relacionar el daño hepático con el estrés oxidante, mientras que en el caso del riñón en donde a pesar de no encontrar un daño renal característico, se encontró un mínimo daño tubular local evidenciado por la alteración de la actividad de la enzima GPx plasmática, de BUN y los cambios morfológicos en la histología el cual es proporcional al indicio de estrés oxidante encontrado, debido a que solamente se alteraron los niveles de MDA. Finalmente, a partir de los resultados obtenidos se puede concluir que la hipótesis planteada en un inicio se cumplió para el daño hepático.

## **12. Perspectiva**

Debido a que la exposición del ser humano a Cd es comúnmente crónica y de forma inhalatoria y oral [5], y la vía de administración oral posee algunas ventajas como evitar dolor en la administración, facilidad de administración y mantener la seguridad del paciente [138], además de que se han informado estudios que emplean modelos *in vivo* con dosis subcrónicas de CdCl<sub>2</sub> administradas por vía oral, por ejemplo, el de Alshammari et al. [139] que utilizaron una dosis de CdCl<sub>2</sub> 50 mg/L administrada mediante el agua potable que consumían los animales durante 8 semanas y obtuvieron un aumento significativo de la urea sérica, de creatinina sérica y de la actividad de NAG, Ahmed [140] empleó en su estudio una dosis de CdCl<sub>2</sub> 5 mg/kg/día por vía oral durante 9 semanas y obtuvo un incremento significativo de BUN, creatinina sérica y en la actividad de NAG, y Arab et al. [141] usaron una dosis de CdCl<sub>2</sub> 5 mg/kg/día mediante vía oral durante 4 semanas y observaron cambios morfológicos en el tejido renal, un incremento significativo de BUN, de creatinina sérica y de la expresión de KIM-1, por mencionar algunos ejemplos, se sugiere que para reproducir el daño renal por CdCl<sub>2</sub> se empleen modelos de exposición crónica o subcrónica a dosis agudas y preferentemente de manera oral.

### 13. Referencias

- [1] M. Zou, S. Zhou, Y. Zhou, Z. Jia, T. Guo, y J. Wang, “Cadmium pollution of soil-rice ecosystems in rice cultivation dominated regions in China: A review”, *Environmental Pollution*, vol. 280, p. 116965, jul. 2021, doi: 10.1016/j.envpol.2021.116965.
- [2] M. de L. Carrillo-Ponce, V. A. Martínez-Ordaz, V. M. Velasco-Rodríguez, A. Hernández-García, M. C. Hernández-Serrano, y F. Sanmiguel, “Serum lead, cadmium, and zinc levels in newborns with neural tube defects from a polluted zone in Mexico”, *Reproductive Toxicology*, vol. 19, núm. 2, pp. 149–154, dic. 2004, doi: 10.1016/j.reprotox.2004.07.003.
- [3] J. A. Segovia-Zavala, F. Delgadillo-Hinojosa, A. Muñoz-Barbosa, E. A. Gutiérrez-Galindo, y R. Vidal-Talamantes, “Cadmium and silver in *Mytilus californianus* transplanted to an anthropogenic influenced and coastal upwelling areas in the Mexican Northeastern Pacific”, *Mar Pollut Bull*, vol. 48, núm. 5–6, pp. 458–464, mar. 2004, doi: 10.1016/j.marpolbul.2003.08.022.
- [4] M. Ansari *et al.*, “Roflumilast, a phosphodiesterase 4 inhibitor, attenuates cadmium-induced renal toxicity via modulation of NF- $\kappa$ B activation and induction of NQO1 in rats”, *Hum Exp Toxicol*, vol. 38, núm. 5, pp. 588–597, may 2019, doi: 10.1177/0960327119829521.
- [5] A. Ramírez, “Toxicología del cadmio. Conceptos actuales para evaluar exposición ambiental u ocupacional con indicadores biológicos”, *Anales de la Facultad de Medicina*, vol. 63, núm. 1, pp. 51–64, 2002.
- [6] L.-J. Yan y D. C. Allen, “Cadmium-Induced Kidney Injury: Oxidative Damage as a Unifying Mechanism”, *Biomolecules*, vol. 11, núm. 11, p. 1575, oct. 2021, doi: 10.3390/biom11111575.
- [7] G. Genchi, M. S. Sinicropi, G. Lauria, A. Carocci, y A. Catalano, “The Effects of Cadmium Toxicity”, *Int J Environ Res Public Health*, vol. 17, núm. 11, p. 3782, may 2020, doi: 10.3390/ijerph17113782.



- [8] M. N. Ansari, N. U. Rehman, A. Karim, F. Imam, y A. M. Hamad, "Protective Effect of *Thymus serrulatus* Essential Oil on Cadmium-Induced Nephrotoxicity in Rats, through Suppression of Oxidative Stress and Downregulation of NF- $\kappa$ B, iNOS, and Smad2 mRNA Expression", *Molecules*, vol. 26, núm. 5, p. 1252, feb. 2021, doi: 10.3390/molecules26051252.
- [9] W. Poontawee, S. Natakankitkul, y O. Wongmekiat, "Protective Effect of *Cleistocalyx nervosum* var. *paniala* Fruit Extract against Oxidative Renal Damage Caused by Cadmium", *Molecules*, vol. 21, núm. 2, p. 133, ene. 2016, doi: 10.3390/molecules21020133.
- [10] G. ALBASHER *et al.*, "Involvement of redox status and the nuclear-related factor 2 in protecting against cadmium-induced renal injury with Sana Makki (*Cassia senna* L.) pre-treatment in male rats", *An Acad Bras Cienc*, vol. 92, núm. 2, 2020, doi: 10.1590/0001-3765202020191237.
- [11] H. Sharma, N. Rawal, y B. Mathew, "The Characteristics, Toxicity and Effects of Cadmium", *International Journal of Nanotechnology and Nanoscience*, vol. 3, pp. 1–9, 2015.
- [12] "Cadmio", *Biblioteca Nacional de Medicina, PubChem*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/23973> (consultado el 3 de agosto de 2022).
- [13] "Cadmio", *SIAFA S.R.L.* <http://www.siafa.com.ar/notisiafa/fichas/cadmio.pdf> (consultado el 3 de agosto de 2022).
- [14] E. Y. Hernández-Cruz, I. Amador-Martínez, A. K. Aranda-Rivera, A. Cruz-Gregorio, y J. Pedraza Chaverri, "Renal damage induced by cadmium and its possible therapy by mitochondrial transplantation", *Chem Biol Interact*, vol. 361, p. 109961, jul. 2022, doi: 10.1016/j.cbi.2022.109961.
- [15] "Cloruro de cadmio", *Biblioteca Nacional de Medicina, PubChem*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/24947> (consultado el 3 de agosto de 2022).

- [16] NJHealth, “Hoja informativa de sustancias peligrosas. Cloruro de cadmio”. <https://nj.gov/health/eoh/rtkweb/documents/fs/0308sp.pdf> (consultado el 20 de agosto de 2022).
- [17] P. Pérez y M. Azcona, “Los efectos del cadmio en la salud”, *Rev Esp Méd Quir*, vol. 17, núm. 3, pp. 199–205, 2012.
- [18] H. Sharma, N. Rawal, y B. Mathew, “The Characteristics, Toxicity and Effects of Cadmium”, *International Journal of Nanotechnology and Nanoscience*, vol. 3, pp. 1–9, 2015.
- [19] C. A. Poland *et al.*, “Bioaccessibility as a determining factor in the bioavailability and toxicokinetics of cadmium compounds”, *Toxicology*, vol. 463, p. 152969, nov. 2021, doi: 10.1016/j.tox.2021.152969.
- [20] B. Debasis y M. Bagchi, *Metal Toxicology Handbook*. USA: Prensa CRC, 2021.
- [21] S. Fox, *Fisiología humana*. México: Mc Graw Hill, 2011. pp. 574-580.
- [22] A. Guyton y J. Hall, *Tratado de fisiología médica*. Elsevier, 2016. pp. 303-308.
- [23] “Nefrotoxicidad”, *Clínica Universidad de Navarra*. <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/nefrotoxicidad> (consultado el 15 de octubre de 2022).
- [24] V. García-Montemayor, M. V. P. R. de Mier, C. M. Peregrín, y R. O. L. y A. Martín-Malo, “Enfermedades renales. Concepto, clasificación, etiopatogenia, síndromes renales y estrategia diagnóstica”, *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, vol. 12, núm. 79, pp. 4651–4661, may 2019, doi: 10.1016/j.med.2019.05.019.
- [25] “Enfermedad crónica del riñón”, *Organización Panamericana de la Salud*. <https://www.paho.org/es/temas/enfermedad-cronica-rinon> (consultado el 30 de octubre de 2022).

- [26] C. P. Kovesdy, "Epidemiology of chronic kidney disease: an update 2022", *Kidney Int Suppl (2011)*, vol. 12, núm. 1, pp. 7–11, abr. 2022, doi: 10.1016/j.kisu.2021.11.003.
- [27] E. Sabath y L. Robles, "Medio ambiente y riñón: nefrotoxicidad por metales pesados", *Nefrología*, vol. 32, núm. 3, pp. 279–286, 2012.
- [28] M. Seijas, C. Baccino, N. Nin, y J. A. Lorente, "Definición y biomarcadores de daño renal agudo: nuevas perspectivas", *Med Intensiva*, vol. 38, núm. 6, pp. 376–385, ago. 2014, doi: 10.1016/j.medin.2013.09.001.
- [29] J. D. Díaz García y E. Arceo, "Daño renal asociado a metales pesados: trabajo de revisión", *Revista Colombiana de Nefrología*, vol. 5, núm. 1, p. 43, nov. 2017, doi: 10.22265/acnef.5.2.254.
- [30] Hernández F *et al.*, "Capítulo 2: Etapa de exposición", en *Toxicología para Químicos Farmacéuticos Biólogos*, México: UNAM, 2017, pp. 14–15.
- [31] Y. Xue, L. B. Daniels, A. S. Maisel, y N. Iqbal, "Cardiac Biomarkers", en *Reference Module in Biomedical Sciences*, Elsevier, 2014. doi: 10.1016/B978-0-12-801238-3.00022-2.
- [32] J. C. Whitin *et al.*, "Plasma Glutathione Peroxidase and Its Relationship to Renal Proximal Tubule Function", *Mol Genet Metab*, vol. 65, núm. 3, pp. 238–245, nov. 1998, doi: 10.1006/mgme.1998.2760.
- [33] M. A. El-far, M. A. Bakr, S. E. Farahat, y E. A. A. El-Fattah, "Glutathione peroxidase activity in patients with renal disorders", *Clin Exp Nephrol*, vol. 9, núm. 2, pp. 127–131, jun. 2005, doi: 10.1007/s10157-005-0343-1.
- [34] Cisneros E, Pupo J, y Céspedes E, "Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: III. Glutatión peroxidasa", *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, vol. 16, núm. 1, pp. 10–15, 1997.

- [35] F. Lombi, A. Muryan, R. Canzonieri, y H. Trimarchi, “Biomarcadores en la lesión renal aguda: ¿paradigma o evidencia?”, *Nefrología*, vol. 36, núm. 4, pp. 339–346, jul. 2016, doi: 10.1016/j.nefro.2016.01.012.
- [36] W. Huo, K. Zhang, Z. Nie, Q. Li, y F. Jin, “Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a novel kidney-specific injury molecule playing potential double-edged functions in kidney injury”, *Transplant Rev*, vol. 24, núm. 3, pp. 143–146, jul. 2010, doi: 10.1016/j.trre.2010.02.002.
- [37] M. Seijas, C. Baccino, N. Nin, y J. A. Lorente, “Definición y biomarcadores de daño renal agudo: nuevas perspectivas”, *Med Intensiva*, vol. 38, núm. 6, pp. 376–385, ago. 2014, doi: 10.1016/j.medin.2013.09.001.
- [38] A. Noto, F. Cibecchini, V. Fanos, y M. Mussap, “NGAL and Metabolomics: The Single Biomarker to Reveal the Metabolome Alterations in Kidney Injury”, *Biomed Res Int*, vol. 2013, pp. 1–6, 2013, doi: 10.1155/2013/612032.
- [39] S. S. Soni *et al.*, “NGAL: a biomarker of acute kidney injury and other systemic conditions”, *Int Urol Nephrol*, vol. 42, núm. 1, pp. 141–150, mar. 2010, doi: 10.1007/s11255-009-9608-z.
- [40] M. Ross y W. Pawlina, “Capítulo 1. Técnicas”, en *Histología texto y atlas. Correlación con biología celular y molecular*, Wolters Kluwer, 2015, pp. 2–6.
- [41] J. P. Huidobro E., R. Tagle, y A. M. Guzmán, “Creatinina y su uso para la estimación de la velocidad de filtración glomerular”, *Rev Med Chil*, vol. 146, núm. 3, pp. 344–350, mar. 2018, doi: 10.4067/s0034-98872018000300344.
- [42] K. Kashani, M. H. Rosner, y M. Ostermann, “Creatinine: From physiology to clinical application”, *Eur J Intern Med*, vol. 72, pp. 9–14, feb. 2020, doi: 10.1016/j.ejim.2019.10.025.
- [43] N. Baum, C. C. Dichoso, y C. E. Carlton, “Blood urea nitrogen and serum creatinine”, *Urology*, vol. 5, núm. 5, pp. 583–588, may 1975, doi: 10.1016/0090-4295(75)90105-3.

- [44] H. Wang, J. Ran, y T. Jiang, "Urea", 2014, pp. 7–29. doi: 10.1007/978-94-017-9343-8\_2.
- [45] J. A. Barsanti, "Urinary Disorders", en *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*, Elsevier, 2012, pp. 126–155. doi: 10.1016/B978-1-4377-0657-4.00007-7.
- [46] N. Avissar *et al.*, "Human kidney proximal tubules are the main source of plasma glutathione peroxidase", *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, vol. 266, núm. 2, pp. C367–C375, feb. 1994, doi: 10.1152/ajpcell.1994.266.2.C367.
- [47] Bierl C, Voetsch B, Jin RC, Handy DE, y Loscalzo J, "Determinants of Human Plasma Glutathione Peroxidase (GPx-3) Expression", *J Biol Chem*, vol. 279, núm. 26, pp. 26839–26845, 2004.
- [48] R. Barreto y M. Guevara, "Biomarcadores de insuficiencia renal: un «trending topic» en cirrosis", *Gastroenterol Hepatol*, vol. 36, núm. 6, pp. 407–421, jun. 2013, doi: 10.1016/j.gastrohep.2013.03.001.
- [49] D. Robic, M. Bens, F. Loko, A. Vandewalle, y R. Bourbouze, "N-Acetyl- $\beta$ -d-glucosaminidase (NAG) isoenzymes in primary cultures of rabbit kidney proximal tubule cells: a cellular model for studies on nephrotoxicity?", *Toxicology*, vol. 103, núm. 1, pp. 37–44, nov. 1995, doi: 10.1016/0300-483X(95)03100-T.
- [50] M. G. Costigan, R. Rustom, J. M. Bone, y A. Shenkin, "Origin and significance of urinary N-acetyl- $\beta$ ,D-glucosaminidase (NAG) in renal patients with proteinuria", *Clinica Chimica Acta*, vol. 255, núm. 2, pp. 133–144, nov. 1996, doi: 10.1016/0009-8981(96)06400-5.
- [51] D. M. Tanase *et al.*, "The Predictive Role of the Biomarker Kidney Molecule-1 (KIM-1) in Acute Kidney Injury (AKI) Cisplatin-Induced Nephrotoxicity", *Int J Mol Sci*, vol. 20, núm. 20, p. 5238, oct. 2019, doi: 10.3390/ijms20205238.
- [52] T. A. Karmakova, N. S. Sergeeva, K. Yu. Kanukoev, B. Ya. Alekseev, y A. D. Kaprin, "Kidney Injury Molecule 1 (KIM-1): a Multifunctional Glycoprotein and

Biological Marker (Review)", *Sovremennyye tehnologii v medicine*, vol. 13, núm. 3, p. 64, jun. 2021, doi: 10.17691/stm2021.13.3.08.

- [53] A. Gagneux-Brunon, P. Delanaye, D. Legrand, E. Cavalier, y C. Mariat, "NGAL, biomarqueur de lésion rénale : point d'étape en 2012", *Nephrol Ther*, vol. 8, núm. 7, pp. 508–515, dic. 2012, doi: 10.1016/j.nephro.2012.03.006.
- [54] M. E. Wasung, L. S. Chawla, y M. Madero, "Biomarkers of renal function, which and when?", *Clinica Chimica Acta*, vol. 438, pp. 350–357, ene. 2015, doi: 10.1016/j.cca.2014.08.039.
- [55] Chávez N, Méndez N, y Uribe M, "Capítulo 40: Fisiología hepática", en *Gastroenterología*, Méndez N y Uribe M, Eds. México: McGraw-Hill, 2010.
- [56] H. Ellis, "Anatomy of the liver", *Surgery (Oxford)*, vol. 29, núm. 12, pp. 589–592, dic. 2011, doi: 10.1016/j.mpsur.2011.09.012.
- [57] Tsagué F, Akono E, y Kuete V, "Capítulo 11 Hepatotoxicity and Hepatoprotective Effects of African Medicinal Plants", en *Toxicological Survey of African Medicinal Plants*, Kuete V, Ed. Elsevier, 2014, pp. 323–355.
- [58] K. N. Tzirogiannis *et al.*, "Time-course of cadmium-induced acute hepatotoxicity in the rat liver: the role of apoptosis", *Arch Toxicol*, vol. 77, núm. 12, pp. 694–701, dic. 2003, doi: 10.1007/s00204-003-0499-y.
- [59] K. Renu *et al.*, "Molecular mechanism of heavy metals (Lead, Chromium, Arsenic, Mercury, Nickel and Cadmium) - induced hepatotoxicity – A review", *Chemosphere*, vol. 271, p. 129735, may 2021, doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.129735.
- [60] V. Souza-Arroyo, J. J. Fabián, L. Bucio-Ortiz, R. U. Miranda-Labra, L. E. Gomez-Quiroz, y M. C. Gutiérrez-Ruiz, "The mechanism of the cadmium-induced toxicity and cellular response in the liver", *Toxicology*, vol. 480, p. 153339, oct. 2022, doi: 10.1016/j.tox.2022.153339.
- [61] M. F. Elkhadragy y A. E. Abdel Moneim, "Protective effect of *Fragaria ananassa* methanolic extract on cadmium chloride (CdCl<sub>2</sub>)-induced

hepatotoxicity in rats”, *Toxicol Mech Methods*, vol. 27, núm. 5, pp. 335–345, jun. 2017, doi: 10.1080/15376516.2017.1285973.

- [62] Rikans L y Yamano T, “Mechanisms of Cadmium-Mediated Acute Hepatotoxicity”, *J BIOCHEM MOLECULAR TOXICOLOGY*, vol. 14, núm. 2, pp. 110–117, 1999.
- [63] K. S. Nallagangula, K. Shashidhar, V. Lakshmaiah, y Muninarayana, “Evolution of proteomic biomarker for chronic liver disease”, *J Circ Biomark*, vol. 7, p. 184945441877718, ene. 2018, doi: 10.1177/1849454418777186.
- [64] X. Yang, L. K. Schnackenberg, Q. Shi, y W. F. Salminen, “Hepatic toxicity biomarkers”, en *Biomarkers in Toxicology*, Elsevier, 2014, pp. 241–259. doi: 10.1016/B978-0-12-404630-6.00013-0.
- [65] J. Sepulveda, “Challenges in Routine Clinical Chemistry Analysis”, en *Accurate Results in the Clinical Laboratory*, Elsevier, 2013, pp. 131–148. doi: 10.1016/B978-0-12-415783-5.00009-8.
- [66] J. Hankins, “Función de la albúmina en el equilibrio hídrico”, *Nursing (Ed. española)*, vol. 26, núm. 10, pp. 42–43, dic. 2008, doi: 10.1016/S0212-5382(08)70820-3.
- [67] E. Trefts, M. Gannon, y D. H. Wasserman, “The liver”, *Current Biology*, vol. 27, núm. 21, pp. R1147–R1151, nov. 2017, doi: 10.1016/j.cub.2017.09.019.
- [68] I. M. Washington y G. van Hoosier, “Clinical Biochemistry and Hematology”, en *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*, Elsevier, 2012, pp. 57–116. doi: 10.1016/B978-0-12-380920-9.00003-1.
- [69] S. M. Gwaltney-Brant, “Nutraceuticals in Hepatic Diseases”, en *Nutraceuticals*, Elsevier, 2016, pp. 87–99. doi: 10.1016/B978-0-12-802147-7.00007-3.
- [70] P. Aguirre Puig, M. A. Orallo Morán, D. Pereira Matalobos, y P. Prieto Requeijo, “Papel actual de la albúmina en cuidados críticos”, *Rev Esp*

*Anesthesiol Reanim*, vol. 61, núm. 9, pp. 497–504, nov. 2014, doi: 10.1016/j.redar.2014.04.016.

- [71] Halliwell B y Gutteridge JMC, “Capítulo 3. Antioxidant defences synthesized *in vivo*”, en *Free Radicals in Biology and Medicine*, Reino Unido: Oxford University press, 2015, pp. 77-119.
- [72] Keshari AK, Verma AK, Kumar T, y Srivastava R, “Oxidative Stress: A Review”, *The International Journal Of Science & Technoledge*, vol. 3, núm. 7, pp. 155–162, 2015.
- [73] Hernández F *et al.*, “Capítulo 5: Estrés oxidante”, en *Fundamentos de Toxicología para Químicos Farmacéuticos Biólogos*, México: UNAM, 2017, pp. 82–102.
- [74] Carvajal C, “REACTIVE OXYGEN SPECIES: TRAINING, FUNCTION AND OXIDATIVE STRESS”, *Revista Medicina Legal de Costa Rica*, vol. 36, núm. 1, 2019.
- [75] J. Rodríguez, J. Menéndez, y Y. Truhillo, “Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo”, *Revista Cubana de Medicina Militar*, vol. 30, núm. 1, pp. 15–20, 2001.
- [76] K. Rana, Y. Verma, y S. V. S. Rana, “Possible Mechanisms of Liver Injury Induced by Cadmium Sulfide Nanoparticles in Rat”, *Biol Trace Elem Res*, vol. 199, núm. 1, pp. 216–226, ene. 2021, doi: 10.1007/s12011-020-02128-5.
- [77] K. Martínez, V. Souza, L. Bucio, y L. Gómez, “Cadmio: efectos sobre la salud. Respuesta celular y molecular”, *Acta Toxicol. Argent*, vol. 21, núm. 1, pp. 33–49, 2013.
- [78] E. Casalino, G. Calzaretti, C. Sblano, y C. Landriscina, “Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium”, *Toxicology*, vol. 179, núm. 1–2, pp. 37–50, sep. 2002, doi: 10.1016/S0300-483X(02)00245-7.



- [79] G. T. Sáez y N. Están-Capell, “Antioxidant Enzymes”, en *Encyclopedia of Cancer*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014, pp. 288–294. doi: 10.1007/978-3-662-46875-3\_7210.
- [80] E. Cisneros, “La glutation reductasa y su importancia biomédica”, *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, vol. 14, núm. 1, 1995.
- [81] A. Lohning, A. Salinas, y M. Wong, “Glutathione S-transferases-a review”, *Current Medicinal Chemistry*, vol. 6, núm. 4, pp. 279–309, 1999.
- [82] Z. Yin, “Glutathione S-Transferase”, en *Encyclopedia of Cancer*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2016, pp. 1926–1928. doi: 10.1007/978-3-662-46875-3\_2441.
- [83] D. del Rio, A. J. Stewart, y N. Pellegrini, “A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress”, *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, vol. 15, núm. 4, pp. 316–328, ago. 2005, doi: 10.1016/j.numecd.2005.05.003.
- [84] D. Tsikas, “Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges”, *Anal Biochem*, vol. 524, pp. 13–30, may 2017, doi: 10.1016/j.ab.2016.10.021.
- [85] H. Esterbauer, R. J. Schaur, y H. Zollner, “Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes”, *Free Radic Biol Med*, vol. 11, núm. 1, pp. 81–128, ene. 1991, doi: 10.1016/0891-5849(91)90192-6.
- [86] J. R. Roede y K. S. Fritz, “Hepatotoxicity of Reactive Aldehydes”, en *Reference Module in Biomedical Sciences*, Elsevier, 2015. doi: 10.1016/B978-0-12-801238-3.02113-9.
- [87] E. Nkhili y P. Brat, “Reexamination of the ORAC assay: effect of metal ions”, *Anal Bioanal Chem*, vol. 400, núm. 5, pp. 1451–1458, may 2011, doi: 10.1007/s00216-011-4884-8.

- [88] B. Fina, M. Lombarte, y A. Rigalli, "INVESTIGACIÓN DE UN FENÓMENO NATURAL: ¿ESTUDIOS IN VIVO, IN VITRO O IN SILICO?", *Actualizaciones en Osteología*, vol. 9, núm. 3, pp. 239–240, 2013.
- [89] F. Lu, "Capítulo 7 Evaluación toxicológica", en *Toxicología Básica*, México: Harla, 1992, pp. 68–69.
- [90] K. H. Denny y C. W. Stewart, "Acute, Subacute, Subchronic, and Chronic General Toxicity Testing for Preclinical Drug Development", en *A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development*, Elsevier, 2017, pp. 109–127. doi: 10.1016/B978-0-12-803620-4.00005-0.
- [91] Hernández F *et al.*, "Capítulo 2: Etapas de exposición", en *Fundamentos de Toxicología para Químicos Farmacéuticos Biólogos*, México: UNAM, 2017, pp. 9–11.
- [92] S. A. Salama, A. M. Mohamadin, y M. S. Abdel-Bakky, "Arctigenin alleviates cadmium-induced nephrotoxicity: Targeting endoplasmic reticulum stress, Nrf2 signaling, and the associated inflammatory response", *Life Sci*, vol. 287, p. 120121, dic. 2021, doi: 10.1016/j.lfs.2021.120121.
- [93] D. Navaneethan y M. Rasool, "*p*-Coumaric acid, a common dietary polyphenol, protects cadmium chloride-induced nephrotoxicity in rats", *Ren Fail*, vol. 36, núm. 2, pp. 244–251, mar. 2014, doi: 10.3109/0886022X.2013.835268.
- [94] O. A. Ojo, B. O. Ajiboye, B. E. Oyinloye, A. B. Ojo, y O. I. Olarewaju, "Protective effect of Irvingia gabonensis stem bark extract on cadmium-induced nephrotoxicity in rats", *Interdiscip Toxicol*, vol. 7, núm. 4, pp. 208–214, dic. 2014, doi: 10.2478/intox-2014-0030.
- [95] G. M. Alshammari *et al.*, "Quercetin alleviates cadmium chloride-induced renal damage in rats by suppressing endoplasmic reticulum stress through SIRT1-dependent deacetylation of Xbp-1s and eIF2 $\alpha$ ", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 141, p. 111862, sep. 2021, doi: 10.1016/j.biopha.2021.111862.

- [96] T. Aqeel, S. C. Gurumallu, A. Bhaskar, S. M. hashimi, y R. Javaraiah, "Secoisolariciresinol diglucoside protects against cadmium-induced oxidative stress-mediated renal toxicity in rats", *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, vol. 61, p. 126552, sep. 2020, doi: 10.1016/j.jtemb.2020.126552.
- [97] M. A. Dkhil, S. Al-Quraishy, M. M. S. Diab, M. S. Othman, A. M. Aref, y A. E. Abdel Moneim, "The potential protective role of *Physalis peruviana* L. fruit in cadmium-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity", *Food and Chemical Toxicology*, vol. 74, pp. 98–106, dic. 2014, doi: 10.1016/j.fct.2014.09.013.
- [98] G. ALBASHER *et al.*, "Involvement of redox status and the nuclear-related factor 2 in protecting against cadmium-induced renal injury with Sana Makki (*Cassia senna* L.) pre-treatment in male rats", *An Acad Bras Cienc*, vol. 92, núm. 2, 2020, doi: 10.1590/0001-3765202020191237.
- [99] M. Aslam *et al.*, "Nephroprotective action of *Peucedanum grande* against cadmium chloride induced renal toxicity in Wistar rats.", *EXCLI J*, vol. 11, pp. 444–52, 2012.
- [100] M. A. Ahmed, "Effect of angiotensin II type 1 receptor blocker on renal function, arterial blood pressure and parathyroid hormone related protein over expression in cadmium induced nephrotoxicity in adult male rats.", *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*, vol. 5, núm. 2, pp. 109–19, 2013.
- [101] D. G. Mostafa, S. F. Ahmed, y O. A. Hussein, "Protective effect of tetrahydrobiopterin on hepatic and renal damage after acute cadmium exposure in male rats", *Ultrastruct Pathol*, vol. 42, núm. 6, pp. 516–531, nov. 2018, doi: 10.1080/01913123.2018.1559566.
- [102] B. A. Handan, C. F. G. de Moura, C. M. Cardoso, A. B. Santamarina, L. P. Pisani, y D. A. Ribeiro, "Protective Effect of Grape and Apple Juices against Cadmium Intoxication in the Kidney of Rats", *Drug Res*, vol. 70, núm. 11, pp. 503–511, nov. 2020, doi: 10.1055/a-1221-4733.
- [103] O. S. Atagana y S. O. Asagba, "Protective effects of honey against cadmium-induced alteration of some biochemical parameters in rats", *Toxicol Environ*

*Chem*, vol. 96, núm. 10, pp. 1557–1563, nov. 2014, doi: 10.1080/02772248.2015.1027205.

- [104] A. S. Alshehri, A. F. El-kott, M. S. A. El-Gerbed, A. E. El-Kenawy, G. M. Albadrani, y H. S. Khalifa, “Kaempferol prevents cadmium chloride-induced liver damage by upregulating Nrf2 and suppressing NF- $\kappa$ B and keap1”, *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 29, núm. 10, pp. 13917–13929, feb. 2022, doi: 10.1007/s11356-021-16711-3.
- [105] Z. Goodarzi, E. Karami, S. Yousefi, A. Dehdashti, A. R. Bandegi, y A. Ghanbari, “Hepatoprotective effect of atorvastatin on Cadmium chloride induced hepatotoxicity in rats”, *Life Sci*, vol. 254, p. 117770, ago. 2020, doi: 10.1016/j.lfs.2020.117770.
- [106] L. G. Kyriakou, K. N. Tzirogiannis, M. D. Demonakou, K. T. Kourentzi, M. G. Mykoniatis, y G. I. Panoutsopoulos, “Gadolinium chloride pretreatment ameliorates acute cadmium-induced hepatotoxicity”, *Toxicol Ind Health*, vol. 29, núm. 7, pp. 624–632, ago. 2013, doi: 10.1177/0748233711430971.
- [107] K. N. Tzirogiannis *et al.*, “Time-course of cadmium-induced acute hepatotoxicity in the rat liver: the role of apoptosis”, *Arch Toxicol*, vol. 77, núm. 12, pp. 694–701, dic. 2003, doi: 10.1007/s00204-003-0499-y.
- [108] N. U. Rehman *et al.*, “Cadmium-induced Hepatotoxicity and Oxidative Stress in Rats: Protection by Roflumilast via NF- $\kappa$  B and HO-1 Pathway”, *International Journal of Pharmacology*, vol. 16, núm. 2, pp. 154–163, feb. 2020, doi: 10.3923/ijp.2020.154.163.
- [109] Oliver H. Lowry, Nira J. Rosebrough, A. L. Farr, y Rose J. Randall, “PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT”, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 193, núm. 1, pp. 265–275, nov. 1951, doi: 10.1016/S0021-9258(19)52451-6.
- [110] R. A. Lawrence y R. F. Burk, “Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver”, *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 71, núm. 4, pp. 952–958, ago. 1976, doi: 10.1016/0006-291X(76)90747-6.

- [111] M. Negrette-Guzmán *et al.*, “Sulforaphane Attenuates Gentamicin-Induced Nephrotoxicity: Role of Mitochondrial Protection”, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2013, pp. 1–17, 2013, doi: 10.1155/2013/135314.
- [112] S. C. Taylor y A. Posch, “The Design of a Quantitative Western Blot Experiment”, *Biomed Res Int*, vol. 2014, pp. 1–8, 2014, doi: 10.1155/2014/361590.
- [113] L. Pillai-Kastoori, A. R. Schutz-Geschwender, y J. A. Harford, “A systematic approach to quantitative Western blot analysis”, *Anal Biochem*, vol. 593, p. 113608, mar. 2020, doi: 10.1016/j.ab.2020.113608.
- [114] B. T. Kurien y R. H. Scofield, “Western Blotting: An Introduction”, 2015, pp. 17–30. doi: 10.1007/978-1-4939-2694-7\_5.
- [115] T. S. Hnasko y R. M. Hnasko, “The Western Blot”, 2015, pp. 87–96. doi: 10.1007/978-1-4939-2742-5\_9.
- [116] H. Aebi, “[13] Catalase in vitro”, 1984, pp. 121–126. doi: 10.1016/S0076-6879(84)05016-3.
- [117] I. Carlberg y B. Mannervik, “Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver.”, *J Biol Chem*, vol. 250, núm. 14, pp. 5475–80, jul. 1975.
- [118] W. H. Habig, M. J. Pabst, y W. B. Jakoby, “Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation.”, *J Biol Chem*, vol. 249, núm. 22, pp. 7130–9, nov. 1974.
- [119] I. Erdelmeier, D. Gérard-Monnier, J.-C. Yadan, y J. Chaudière, “Reactions of *N*-Methyl-2-phenylindole with Malondialdehyde and 4-Hydroxyalkenals. Mechanistic Aspects of the Colorimetric Assay of Lipid Peroxidation”, *Chem Res Toxicol*, vol. 11, núm. 10, pp. 1184–1194, oct. 1998, doi: 10.1021/tx970180z.

- [120] B. Ou, M. Hampsch-Woodill, y R. L. Prior, "Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe", *J Agric Food Chem*, vol. 49, núm. 10, pp. 4619–4626, oct. 2001, doi: 10.1021/jf010586o.
- [121] G. Cao, H. M. Alessio, y R. G. Cutler, "Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants", *Free Radic Biol Med*, vol. 14, núm. 3, pp. 303–311, mar. 1993, doi: 10.1016/0891-5849(93)90027-R.
- [122] A. al Shoyaib, S. R. Archie, y V. T. Karamyan, "Intraperitoneal Route of Drug Administration: Should it Be Used in Experimental Animal Studies?", *Pharm Res*, vol. 37, núm. 1, p. 12, ene. 2020, doi: 10.1007/s11095-019-2745-x.
- [123] N. Rencuzogullari y S. Erdogan, "Oral Administration of Lycopene Reverses Cadmium-suppressed Body Weight Loss and Lipid Peroxidation in Rats", *Biol Trace Elem Res*, vol. 118, núm. 2, pp. 175–183, ago. 2007, doi: 10.1007/s12011-007-0027-7.
- [124] M.G. Sant'Ana, R. Moraes, y M.M. Bernardi, "Toxicity of cadmium in Japanese quail: Evaluation of body weight, hepatic and renal function, and cellular immune response", *Environ Res*, vol. 99, núm. 2, pp. 273–277.
- [125] F. Gaínza de los Ríos, "Insuficiencia Renal Aguda", *Nefrología al día*, 2020.
- [126] J. Miyahira, "Insuficiencia renal aguda", *Rev Med Hered*, vol. 14, núm. 1, 2003.
- [127] M. Trzcinka-Ochocka, M. Jakubowski, W. Szymczak, B. Janasik, y R. Brodzka, "The effects of low environmental cadmium exposure on bone density", *Environ Res*, vol. 110, núm. 3, pp. 286–293, abr. 2010, doi: 10.1016/j.envres.2009.12.003.
- [128] M. Berglund, A. Åkesson, P. Bjellerup, y M. Vahter, "Metal–bone interactions", *Toxicol Lett*, vol. 112–113, pp. 219–225, mar. 2000, doi: 10.1016/S0378-4274(99)00272-6.

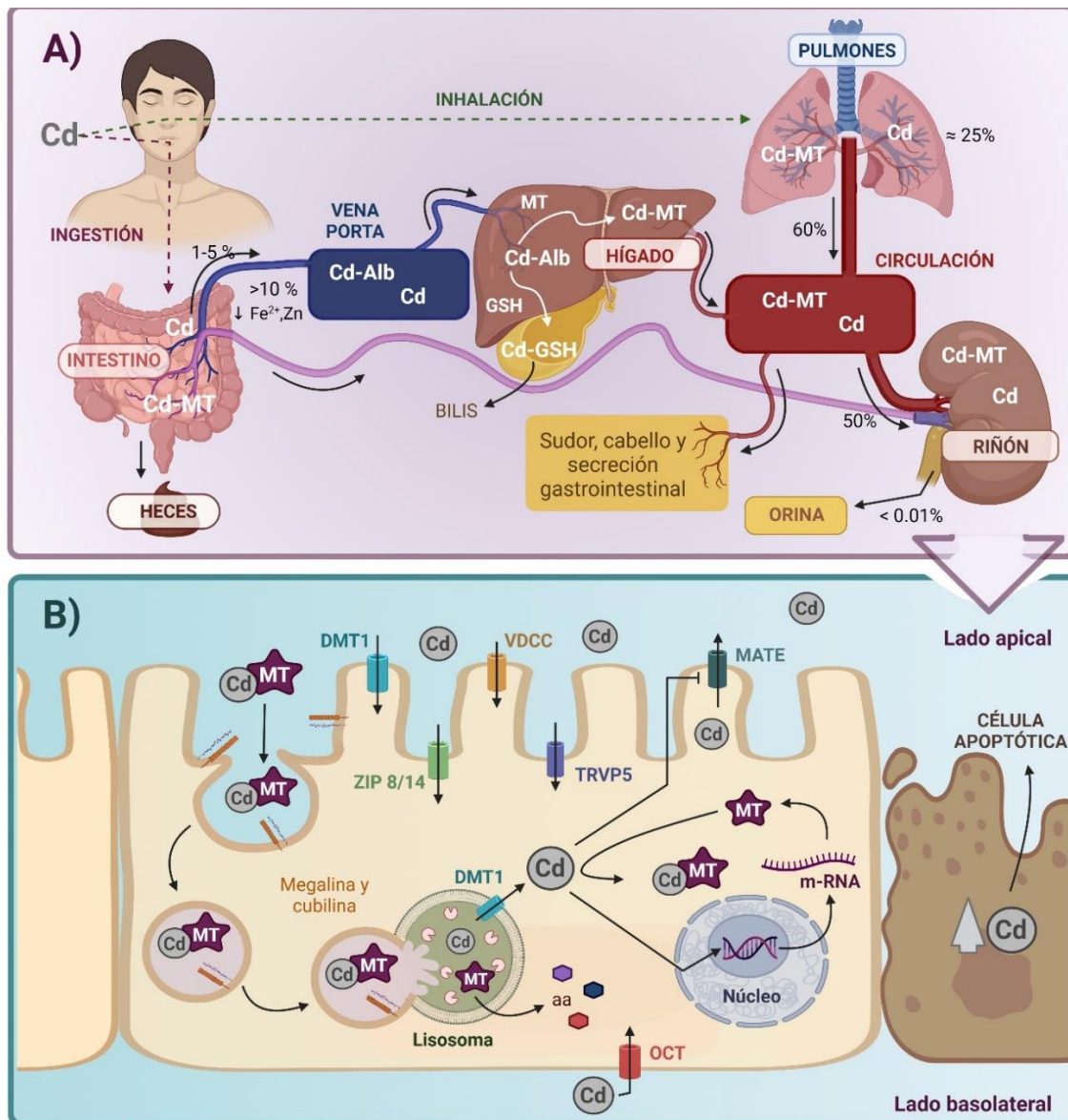
- [129] M. Méndez-Armenta y C. Ríos, “Cadmium neurotoxicity”, *Environ Toxicol Pharmacol*, vol. 23, núm. 3, pp. 350–358, may 2007, doi: 10.1016/j.etap.2006.11.009.
- [130] S. K. Swan, “The Search Continues—An Ideal Marker of GFR”, *Clin Chem*, vol. 43, núm. 6, pp. 913–914, jun. 1997, doi: 10.1093/clinchem/43.6.913.
- [131] J. H. Salazar, “Overview of Urea and Creatinine”, *Lab Med*, vol. 45, núm. 1, pp. e19–e20, feb. 2014, doi: 10.1309/LM920SBNZPJRGUT.
- [132] H. Leguizamón, “Creatinina sérica como marcador de la función renal. Conceptos básicos. Tasa de filtración glomerular”, *Urología Colombiana*, vol. 23, núm. 1, pp. 78–79, abr. 2014, doi: 10.1016/S0120-789X(14)50015-9.
- [133] D. Krstic *et al.*, “Biochemical Markers of Renal Function”, *Curr Med Chem*, vol. 23, núm. 19, pp. 2018–2040, jul. 2016, doi: 10.2174/0929867323666160115130241.
- [134] G. García, “Ascitis. Fisiopatología y tratamiento”, *Acta Medica Colombiana*, vol. 17, núm. 3, 1992.
- [135] J. H. Henriksen, “Cirrhosis: Ascites and hepatorenal syndrome. Recent advances in pathogenesis”, *J Hepatol*, vol. 23, pp. 25–30, 1995, doi: 10.1016/S0168-8278(21)80003-3.
- [136] A. D. Aulbach y C. J. Amuzie, “Biomarkers in Nonclinical Drug Development”, en *A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development*, Elsevier, 2017, pp. 447–471. doi: 10.1016/B978-0-12-803620-4.00017-7.
- [137] A. al Shoyaib, S. R. Archie, y V. T. Karamyan, “Intraperitoneal Route of Drug Administration: Should it Be Used in Experimental Animal Studies?”, *Pharm Res*, vol. 37, núm. 1, p. 12, ene. 2020, doi: 10.1007/s11095-019-2745-x.
- [138] J. Zhang, Z. Xie, N. Zhang, y J. Zhong, “Nanosuspension drug delivery system: preparation, characterization, postproduction processing, dosage form, and application”, en *Nanostructures for Drug Delivery*, Elsevier, 2017, pp. 413–443. doi: 10.1016/B978-0-323-46143-6.00013-0.

- [139] G. M. Alshammari *et al.*, “Quercetin alleviates cadmium chloride-induced renal damage in rats by suppressing endoplasmic reticulum stress through SIRT1-dependent deacetylation of Xbp-1s and eIF2 $\alpha$ ”, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 141, p. 111862, sep. 2021, doi: 10.1016/j.biopha.2021.111862.
- [140] M. A. Ahmed, “Effect of angiotensin II type 1 receptor blocker on renal function, arterial blood pressure and parathyroid hormone related protein over expression in cadmium induced nephrotoxicity in adult male rats.”, *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*, vol. 5, núm. 2, pp. 109–19, 2013.
- [141] H. H. Arab, A. M. Ashour, A. H. Eid, E.-S. A. Arafa, H. J. al Khabbaz, y S. A. Abd El-Aal, “Targeting oxidative stress, apoptosis, and autophagy by galangin mitigates cadmium-induced renal damage: Role of SIRT1/Nrf2 and AMPK/mTOR pathways”, *Life Sci*, vol. 291, p. 120300, feb. 2022, doi: 10.1016/j.lfs.2021.120300.

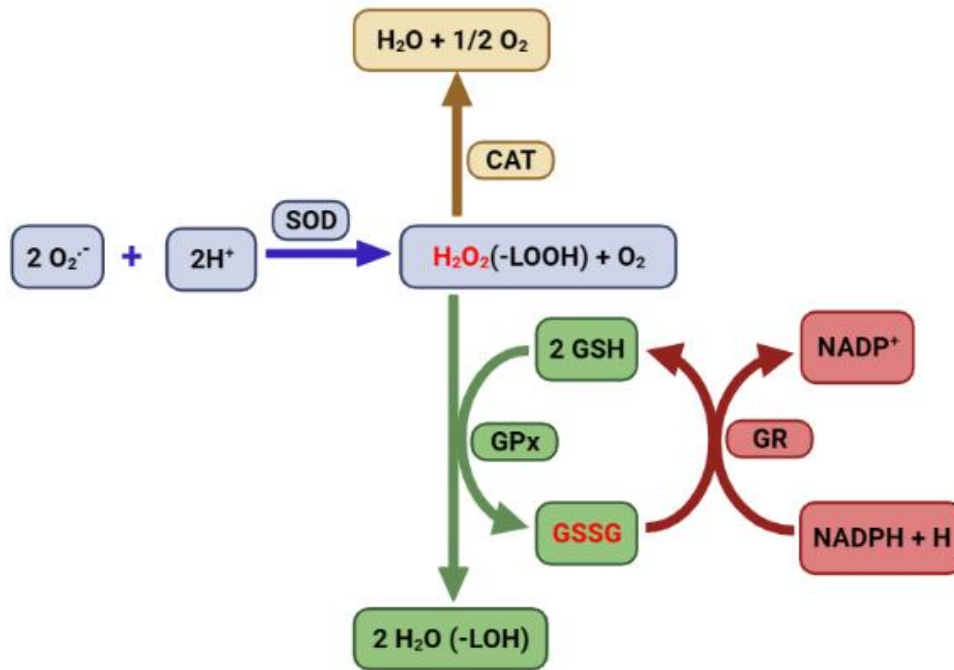


## 14. Anexos

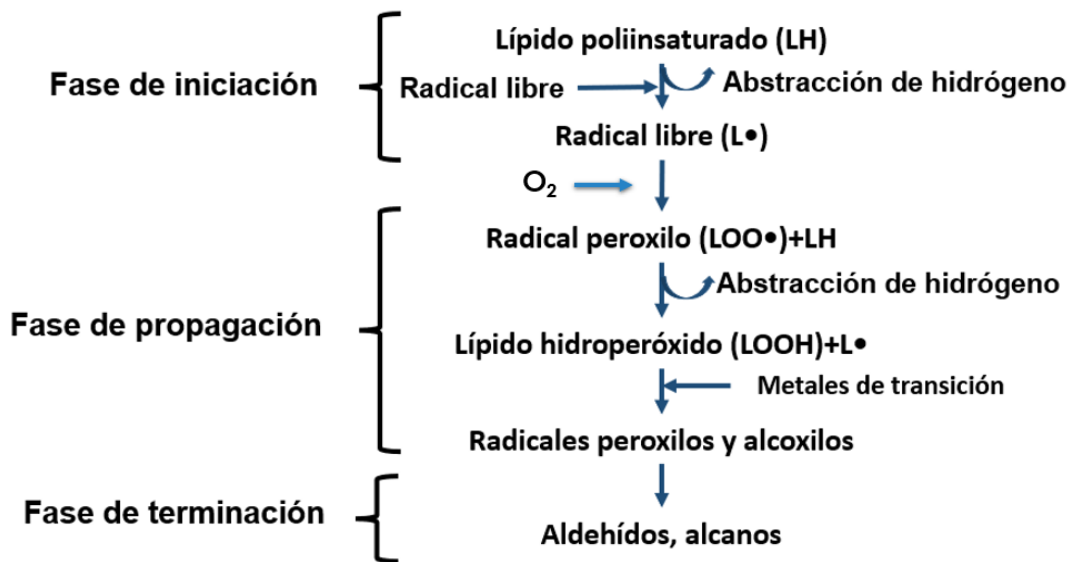
### 14.1. Anexo 1: ilustraciones complementarias



**Figura suplementaria 1. Toxicocinética del cadmio (Cd).** A) Ingreso, absorción y distribución del Cd, además de la formación del complejo Cd-metalotioneína (MT). B) Degradación y formación del complejo Cd-MT en las células del túbulo proximal, el transporte de Cd y la degradación de MT en aminoácidos (aa). Abreviaturas: Cd-Alb: complejo cadmio-albúmina, GSH: glutatión, m-RNA: ácido ribonucleico mensajero, MATE: proteínas de extrusión de múltiples fármacos y toxinas, OCT: transportador de cationes orgánicos, TRVP5: canal selectivo de Ca<sup>2+</sup> de la familia de canales potenciales del receptor transitorio, miembro de subfamilia vanilloide 5, VDCC: canales de calcio dependientes de voltaje, DMT1: transportador de metal divalente 1, ZIP: proteína relacionada a Zrt e Irt. Imagen modificada del artículo de E. Y. Hernández-Cruz, I. Amador-Martínez, A. K. Aranda-Rivera, A. Cruz-Gregorio, y J. Pedraza Chaverri, publicado en 2022 [14].



**Figura suplementaria 2. Relación entre las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR) en su actividad catalítica.** El peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) que genera la enzima SOD es utilizado por las enzimas CAT y GPx, a su vez el glutatión disulfuro (GSSG) producido por GPx es empleado por la enzima GR para reducirlo y obtener glutatión (GSH). Abreviaturas:  $O_2^{\cdot -}$ : superóxido dismutasa,  $H^+$ : protón ácido,  $H_2O$ : agua,  $O_2$ : oxígeno, LOOH: lipoperóxido, NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, H: hidrógeno. Imagen modificada del libro Encyclopedia of Cancer de Sáenz, GT; Capell, NE. (2014) [79]. La figura fue creada con BioRender.com.

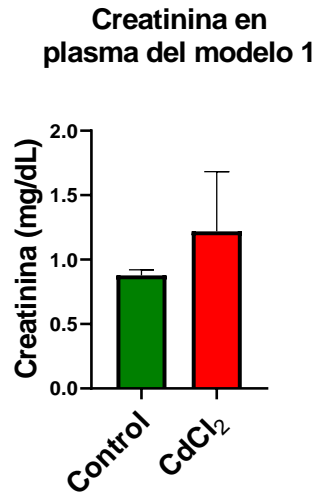


**Figura suplementaria 3. Peroxidación de lípidos.** Los radicales libres atacan a los lípidos poliinsaturados (LH). Cuando los radicales hidroxilo se forman cerca de

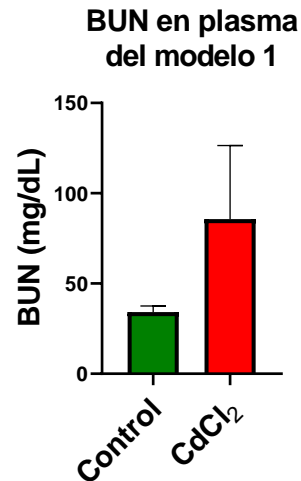
la membrana pueden extraer átomos de hidrógeno de los fosfolípidos formando un radical lipídico (L·) que al reaccionar con el oxígeno (O<sub>2</sub>) puede formar un radical peroxilo (LOO·), que puede reaccionar con los lípidos para generar más radicales lipídicos y a su vez el radical peroxilo se transforma en hidroperóxido (LOOH), el cual se descompone en más radicales si es que hay metales de transición presentes para generar productos como aldehídos. Imagen modificada del Capítulo 5: Estrés oxidante en: Fundamentos de Toxicología para Químicos Farmacéuticos Biólogos de Hernández et al. (2017) [73].

#### 14.2. Anexo 2: resultados de los modelos 1 y 2 *in vivo*

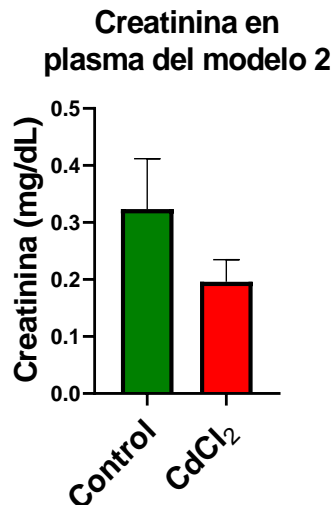
A)



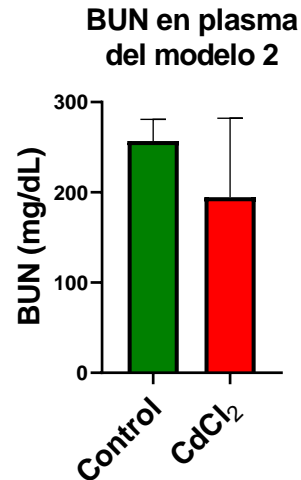
B)



C)

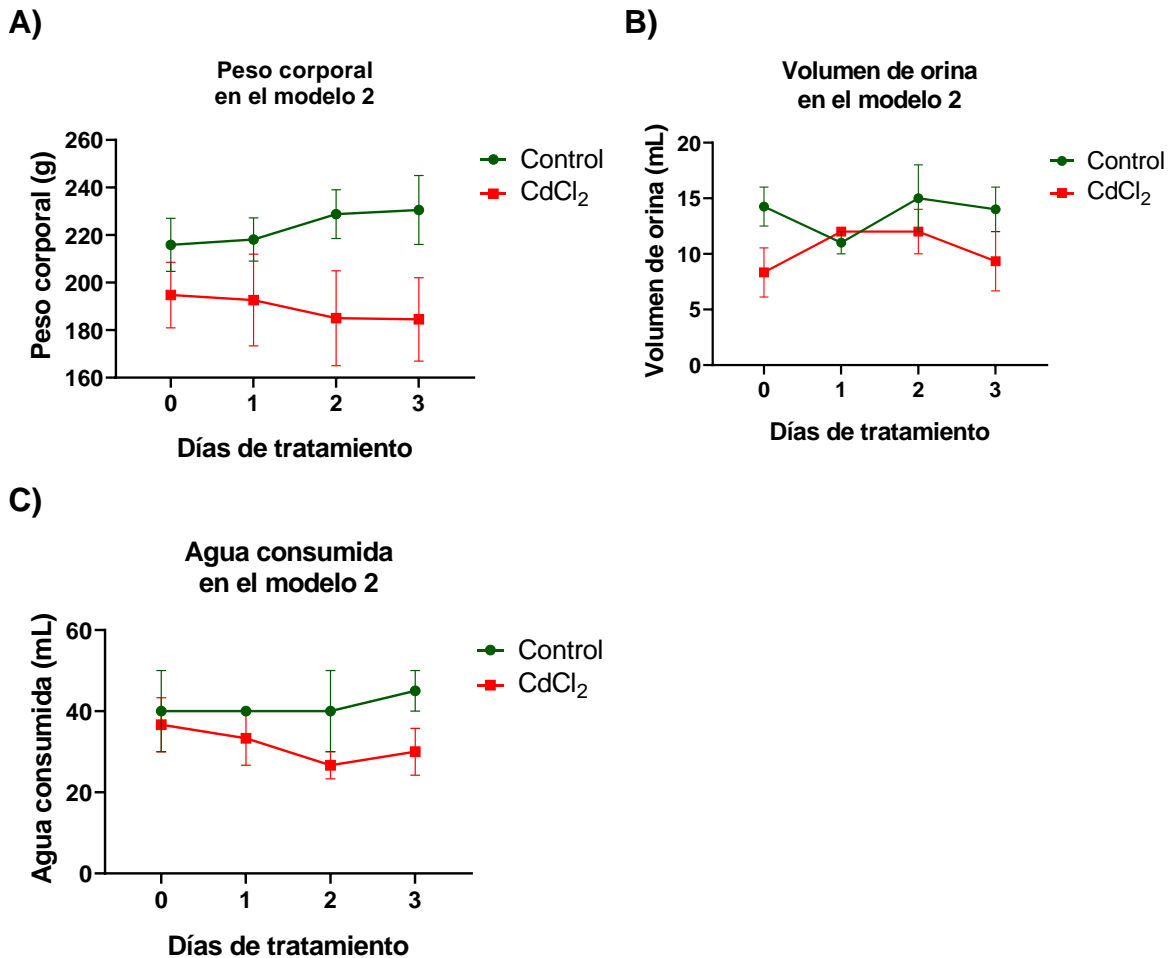


D)



**Figura suplementaria 4. Resultados de creatinina y nitrógeno de urea en sangre (BUN) de los modelos 1 y 2.** A) Creatinina en plasma del modelo 1, B) BUN en plasma del modelo 1, C) creatinina en plasma del modelo 2 (muestra hemolizada), D) BUN en plasma de modelo 2 (muestra hemolizada). Los datos de creatinina y BUN del modelo 1 fueron analizados con una prueba Wilcoxon de 1

cola derecha, mientras que los datos de los mismos marcadores del modelo 2 fueron analizados con una prueba t-student no pareada de 1 cola derecha. n=2-3 animales por grupo. Los datos están expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (EEM). \*p<0.05.

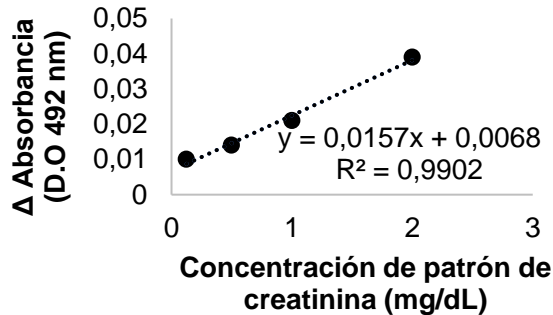


**Figura suplementaria 5. Resultados de toxicidad del modelo 2.** A) Peso corporal, B) volumen de orina, C) agua consumida. n= 2-3 animales por grupo. Los datos fueron evaluados con un análisis de varianza (ANOVA) de 2 vías seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Sidak. Los datos están expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (EEM). \*p<0.05.

### 14.3. Anexo 3: curvas de calibración

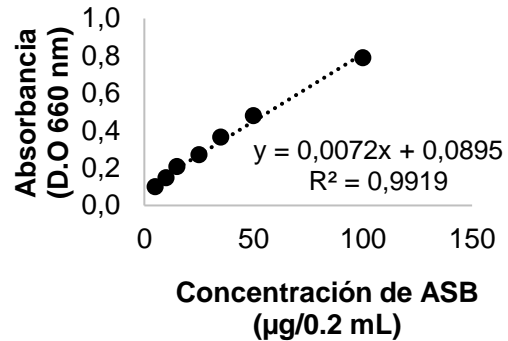
A)

Curva de calibración del estuche comercial D514 Spinreact para determinación de creatinina



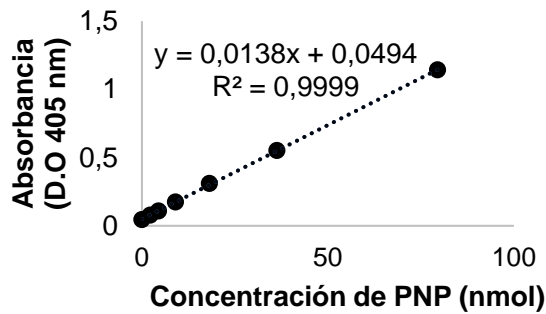
B)

Curva patrón de albúmina sérica bovina (ASB) al 0.05% (m/v)



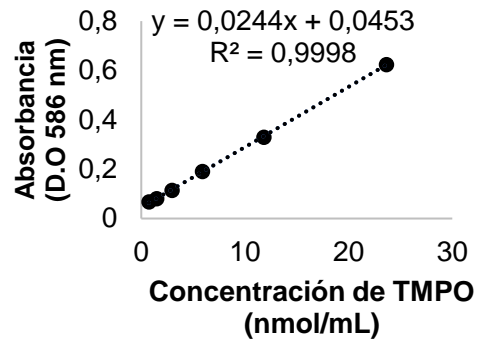
C)

Curva patrón de p-nitrofenol (PNP)



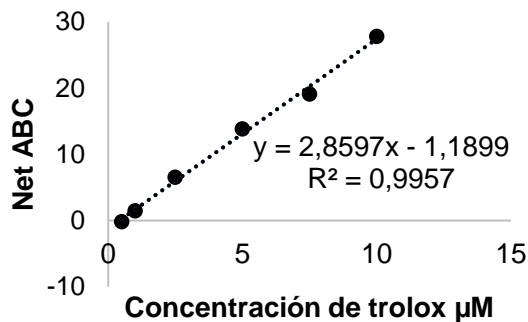
D)

Curva patrón de tetrametoxipropano (TMPO)



E)

Curva patrón de trolox



**Figura suplementaria 6. Curvas patrón representativas utilizadas.** A) Curva de calibración del estuche comercial D514 Spinreact para determinación de creatinina, B) curva patrón representativa de albúmina sérica bovina (ASB), C) curva patrón representativa de p-nitrofenol (PNP), D) curva patrón representativa de tetrametoxipropano (TMPO), E) curva patrón representativa de trolox. ABC= área bajo la curva.