



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

Estudio temporal de las alteraciones en la bioenergética mitocondrial renal en el modelo de obstrucción unilateral del uréter

### **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**Maestra en Ciencias Bioquímicas**

PRESENTA:

**Citlali Belen Bellido Vargas**

TUTOR:

**Dr. José Pedraza Chaverri**  
**Facultad de Química, UNAM.**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

**Dra. Leonila Irma Laura Escobar Pérez**  
**Facultad de Medicina, UNAM.**

**Dra. María Elena Ibarra Rubio**  
**Facultad de Química, UNAM.**

Ciudad Universitaria, Ciudad de México. Mayo, 2023.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

Este proyecto se llevó a cabo gracias al financiamiento que autorizaron el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**) con número de proyecto **A1-S-7495**, Programa de Apoyo a proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (**PAPIIT**) con número de proyecto **IN202219** e **IN200922** y por el Programa de Apoyo a la Investigación y Posgrado (**PAIP**) **5000-9105** de la Facultad de Química.



## Agradecimientos

Al Dr. José Pedraza Chaverri por brindarme la oportunidad de formar parte de su gran equipo de trabajo, conformado por personas de notable calidad humana y profesional. Gracias por el apoyo, la paciencia y confianza que me otorgó a lo largo de este proyecto.

Al Dr. Emiliano Aparicio Trejo supervisor técnico de la presente tesis, por la asesoría, el conocimiento, la buena disposición que siempre tuvo conmigo y con el proyecto, además de la infinita paciencia y dedicación.

A la Dra. Edilia Tapia Rodríguez por ser un excelente ejemplo en el ámbito personal y académico, muchas gracias por todas las enseñanzas, el apoyo experimental, la paciencia y cada uno de los consejos.

A la Dra. Leonila Irma Laura Escobar Pérez y a la Dra. María Elena Ibarra Rubio por desempeñar de manera excepcional su labor como miembros de mi comité tutor, gracias por sus valiosas lecciones y su genuina preocupación por impulsar mi crecimiento académico.

Al M. C. Omar Noel Medina Campos por la supervisión y los consejos que me posibilitaron llevar a cabo buenas prácticas dentro del laboratorio.

A los miembros del Jurado conformado por la Dra. Victoria Chagoya de Sánchez, el Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar, la Dra. Sobeida Sánchez Nieto, la Dra. Ana María Salazar Martínez y la Dra. Xochitl Pérez Martínez, por las observaciones correspondientes que permitieron enriquecer el presente escrito.

A todos y cada uno de los profesores que han posibilitado mi formación académica y personal, gracias por contribuir con su invaluable conocimiento y experiencia.

## Dedicatorias

A mamá y a papá por ser el mejor ejemplo de esfuerzo, disciplina, perseverancia, dedicación y educación. Nunca habrá suficientes palabras que me permitan expresar lo mucho que les agradezco el amor y apoyo que me han otorgado de forma incondicional durante toda una vida. Gracias por creer en mí, a ustedes les debo la totalidad de lo que soy.

A las personas excepcionales que conocí durante este proyecto por otorgarme en más de una ocasión momentos llenos de felicidad, diversión, conocimiento, complicidad y sabiduría: Alexis, Alfredo, Diane, Elena, Emiliano, Pedro y Tanina. Gracias por mostrarme el lado amable de la ciencia y de la vida.

A los grandes amigos que pese a la distancia se mantienen firmes dándome ánimos, momentos divertidos y consejos no tan sabios, no me queda más que agradecerles todas y cada una de las vivencias.

A los animales que se han sacrificado les rindo un pequeño homenaje: el conocimiento que se generó, así como la totalidad de preguntas y respuestas que se encontraron, fue posible gracias a ustedes.

[A living organism]... feeds upon negative entropy... Thus the device by which an organism maintains itself stationary at a fairly high level of orderliness (fairly low level of entropy) really consists in continually sucking orderliness from its environment.

Erwin Schrödinger

# ÍNDICE GENERAL

<b>Abreviaturas</b>	<b>3</b>
<b>Índice de figuras</b>	<b>5</b>
<b>Resumen</b>	<b>6</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>7</b>
1.1 Fisiología renal	7
1.2 La nefrona	9
1.3 Función renal: filtración, reabsorción y secreción	11
1.4 Filtración glomerular: el corpúsculo renal	11
1.5 Reabsorción tubular: el túbulo contorneado proximal, el asa de Henle y el túbulo contorneado distal	12
1.6 Secreción tubular: el conducto colector	13
1.7 Consumo energético y metabolismo renal	14
1.8 Mitocondria y fosforilación oxidante	17
1.9 Bioenergética mitocondrial	22
<b>2. Antecedentes</b>	<b>26</b>
<b>3. Justificación</b>	<b>28</b>
<b>4. Pregunta de investigación</b>	<b>28</b>
<b>5. Hipótesis</b>	<b>29</b>
<b>6. Objetivo general</b>	<b>29</b>
<b>7. Objetivos específicos</b>	<b>29</b>
<b>8. Materiales y métodos</b>	<b>29</b>
8.1 Modelo experimental	29
8.2 Aislamiento de mitocondrias por centrifugación diferencial	32
8.3 Cuantificación de proteína	32
8.4 Respiración mitocondrial	33
8.5 Potencial de membrana mitocondrial	34
8.6 Análisis estadístico	35
<b>9. Resultados</b>	<b>36</b>
9.1 Parámetros respiratorios vía CI	37
9.2 Potencial de membrana mitocondrial vía CI	38
9.3 Parámetros respiratorios vía CII	39



<b>9.4</b>	<b>Potencial de membrana mitocondrial vía CII</b>	<b>41</b>
<b>10.</b>	<b>Discusión</b>	<b>42</b>
<b>11.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>49</b>
<b>12.</b>	<b>Perspectivas</b>	<b>49</b>
<b>13.</b>	<b>Esquemas integrativos</b>	<b>50</b>
<b>14.</b>	<b>Referencias Bibliográficas</b>	<b>52</b>



## Abreviaturas

**$\Delta\Psi_m$**  Potencial de membrana mitocondrial  
**ADP** Adenosín difosfato  
**ANOVA** Análisis de varianza  
**ANT** Translocador de nucleótidos de adenina  
**AQP-1** Acuaporina 1  
**ATP** Adenosín trifosfato  
**BSA** Albúmina sérica bovina  
**CI** Complejo I, NADH deshidrogenasa  
**CII** Complejo II, succinato deshidrogenasa  
**CIII** Complejo III, UQ-citocromo c reductasa  
**CIV** Complejo IV, citocromo c oxidasa  
**CV** Complejo V, ATP sintasa  
**CKD** Insuficiencia renal crónica  
**CO<sub>2</sub>** Dióxido de carbono  
**CoA** Acetil-coenzima A  
**CTE** Cadena transportadora de electrones  
**EDTA** Ácido etilendiaminotetraacético  
**EROs** Especies reactivas de oxígeno  
**FAD** Dinucleótido de flavina adenina  
**FADH<sub>2</sub>** FAD reducido  
**GTP** Trifosfato de guanosina  
**HEPES** Ácido hidroxietil piperazina etanesulfónico  
**i.p.** Intraperitoneal  
**mDNA** Ácido desoxirribonucleico mitocondrial  
**MIM** Membrana mitocondrial interna  
**MOM** Membrana mitocondrial externa  
**mTAL** Rama ascendente gruesa del asa de Henle  
**NAD** Nicotinamida adenina dinucleótido  
**NADH** NAD reducido  
**NAD(P)H** Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato hidrógeno  
**NOX** NAD(P)H oxidasa  
**O<sub>2</sub>** Oxígeno  
**OCR** Tasa de consumo de oxígeno  
**OUU** Obstrucción unilateral de uréter  
**OXPHOS** Fosforilación oxidante  
**P** Respiración asociada a la fosforilación oxidante  
**PMF** Fuerza protón motriz  
**PMG** Piruvato, malato, glutamato  
**QO<sub>2</sub>/TNa** Eficiencia metabólica  
**RC** Índice de control respiratorio  
**RBF** Flujo sanguíneo renal  
**RNA** Ácido ribonucleico  
**ROX** Respiración residual  
**S2** Estado 2  
**S3** Estado 3  
**S4o** Estado 4 inducido con oligomicina



**S+R** Succinato más Rotenona  
**SEM** Error estándar de la media  
**STE** Transferencia de electrones mitocondrial  
**TCD** Túbulo contorneado distal  
**TCP** Túbulo contorneado proximal  
**TNa** Reabsorción del Na<sup>+</sup>  
**tRNA** RNA de transferencia  
**UCP's** Proteínas desacoplantes  
**UQ** Ubiquinona  
**VDAC** Canal aniónico dependiente de voltaje



## Índice de figuras

**Figura 1.** Estructura macroscópica del riñón.

**Figura 2.** Estructura básica de una nefrona.

**Figura 3.** Esquema comparativo de los diferentes segmentos de la nefrona.

**Figura 4.** Representación esquemática de una mitocondria.

**Figura 5.** Metabolismo y fosforilación oxidante.

**Figura 6.** Flujo de electrones a través los complejos que forman parte del sistema de transferencia de electrones mitocondrial.

**Figura 7.** La fosforilación oxidante (OXPHOS) como elemento clave de la bioenergética.

**Figura 8.** Resumen de las alteraciones mitocondriales en el riñón obstruido.

**Figura 9.** Animal con cirugía de obstrucción unilateral de uréter (OUU).

**Figura 10.** Esquema representativo de una respirometría de alta resolución.

**Figura 11.** Esquema representativo del uso de safranina O.

**Figura 12.** Imagen representativa de los riñones de ratas con obstrucción unilateral de uréter a diferentes tiempos.

**Figura 13.** Peso de los riñones en relación con el peso del animal durante el curso temporal.

**Figura 14.** Parámetros mitocondriales asociados a la respiración vía CI en el modelo de OUU.

**Figura 15.** Potencial de membrana mitocondrial asociado a la respiración vía CI en el modelo de OUU.

**Figura 16.** Parámetros mitocondriales asociados a la respiración vía CII en el modelo de OUU.

**Figura 17.** Potencial de membrana mitocondrial asociado a la respiración vía CII en el modelo de OUU.

**Figura 18.** Bioenergética mitocondrial del riñón obstruido en el modelo de OUU.

**Figura 19.** Bioenergética mitocondrial del riñón sin obstrucción o contralateral en el modelo de OUU.



## Resumen

La obstrucción unilateral del uréter (OUU) es un modelo experimental de daño renal que se asemeja a la nefropatía obstructiva, un problema clínico de diagnóstico difícil y poco eficiente, cuya persistencia deriva en la pérdida progresiva de la función renal. Desde el punto de vista fisiopatológico, el efecto que tiene la obstrucción de uréter sobre la función renal, es consecuencia de una gran variedad de mecanismos que interaccionan de forma compleja y que convierten a la OUU en un modelo idóneo para estudiar los cambios que ocurren y los mecanismos que conducen al desarrollo de fibrosis.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar en el modelo de OUU, los cambios que ocurren en la bioenergética mitocondrial de los riñones obstruido y contralateral en un curso temporal. El protocolo experimental se realizó en ratas macho de la cepa Wistar distribuidas en los grupos control o sham y con cirugía de OUU; éste último se dividió en cinco subgrupos adicionales, los correspondientes a los días 4, 7, 14, 21 y 28 posteriores a la obstrucción. Una vez que concluyó el tiempo de evolución, se obtuvieron las mitocondrias de la corteza renal y mediante respirometría de alta resolución se evaluaron los parámetros respiratorios estado 3 (S3), estado 4 inducido con oligomicina (S4o), control respiratorio (RC) y la fosforilación oxidante (P), estimulando la respiración vía complejo I o vía complejo II. Asimismo, se evaluó el potencial de membrana mitocondrial durante el estado 3 ( $\Delta\Psi$  S3) y potencial de membrana mitocondrial durante el estado ( $\Delta\Psi$  S4o) para ambas vías.

Se encontró que lo largo del curso temporal, la OUU induce una respuesta diferencial entre ambos riñones. En el caso del riñón obstruido, ocasiona una disminución progresiva de la capacidad de fosforilación oxidante (OXPHOS), la cual no se encuentra asociada al desacoplamiento mitocondrial entre el transporte de electrones y la fosforilación oxidante. Por otro lado, aunque la obstrucción del riñón par, no genera alteraciones en la capacidad de OXPHOS del riñón contralateral, se observa que en el cuarto día ocasiona cambios que podrían ser una respuesta adaptativa, pero no sostenida, ante los cambios metabólicos que ocurren en el riñón obstruido. Se describe por primera vez un modelo de daño renal, en el que las alteraciones mitocondriales no se encuentran asociadas al desacoplamiento mitocondrial.



# 1. Introducción

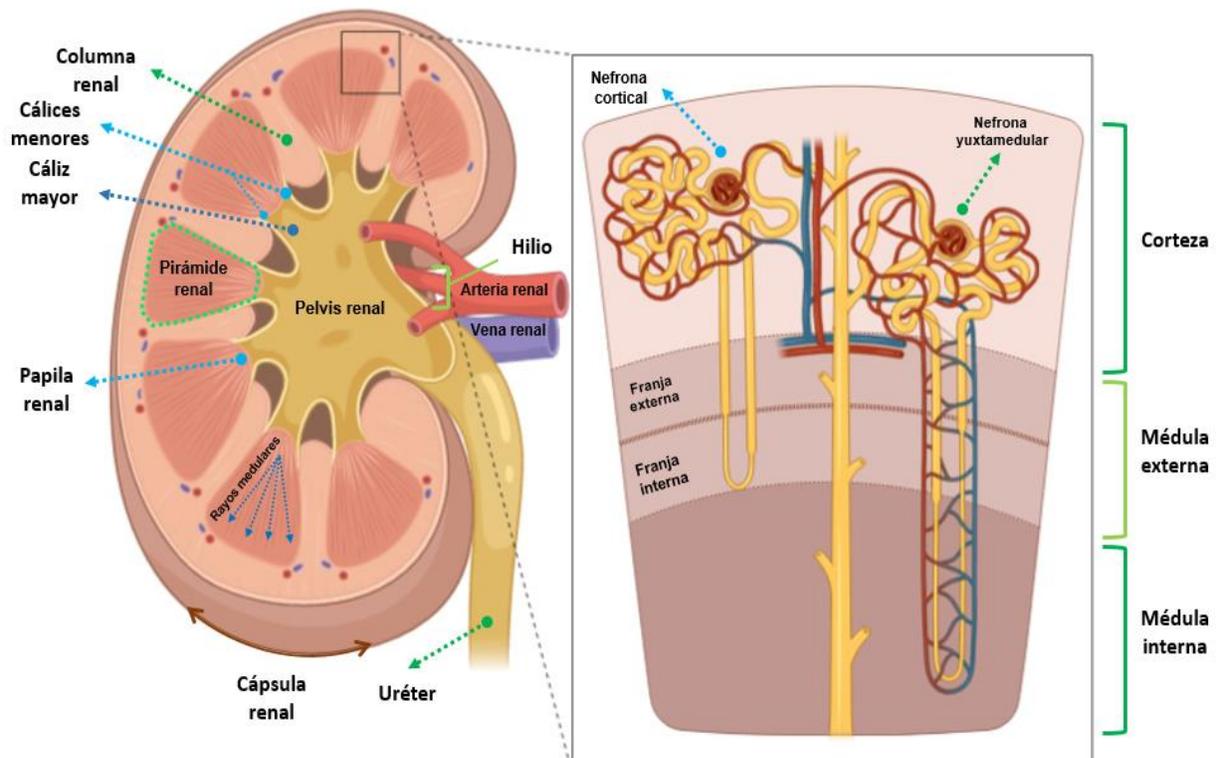
## 1.1 Fisiología renal

Aunque la principal función de los riñones es eliminar del cuerpo los productos de desecho que provienen de la actividad metabólica, éstos también participan en otros procesos que son especialmente críticos para el organismo. Los riñones se encargan de mantener en equilibrio la composición de electrolitos y el volumen de los líquidos corporales, regulando el ingreso (debido a la ingesta o producción metabólica) y la salida (debido a la excreción o consumo metabólico) de los mismos. Para comprender un poco mejor cómo se llevan a cabo estas funciones, es necesario revisar algunos puntos clave sobre la fisiología renal.

Los riñones son órganos pares de color rojizo con forma de habichuela que se encuentran situados en la cavidad retroperitoneal a ambos lados de la columna vertebral. La cara medial de cada riñón tiene una región cóncava y profunda llamada **hilio**, que permite la entrada y salida de las **arterias** y **venas** renales, además contiene la **pelvis renal** que es el segmento inicial del **uréter**.

La superficie de los riñones está cubierta por una cápsula de tejido conjuntivo que protege las delicadas estructuras internas y se denomina **cápsula renal**. En un corte sagital se puede apreciar a simple vista que los riñones tienen dos regiones bien definidas: 1) la **corteza**, que es la región externa de color pardo rojizo que se encuentra justo por debajo de la cápsula renal; y 2) la **médula**, que es la parte interna de color más pálido y que se divide en médula externa e interna (**Figura 1**). El color que se aprecia en la superficie del corte es un reflejo de la distribución de la sangre dentro del riñón pues, entre el 90 al 95% de la sangre se distribuye por la corteza y sólo del 5 al 10% pasa por la médula renal.





**Figura 1. Estructura macroscópica del riñón.** Se aprecian los principales componentes estructurales del riñón descritos en el texto, así como la distribución de los dos tipos básicos de nefronas.

Al examinar un corte perpendicular a la superficie del riñón, se observan una serie de estriaciones verticales que parecen irradiarse desde la médula hacia la corteza. Estas estriaciones son los **rayos medulares** (de Ferrein), llamados así por su aspecto. Son entre 400 a 500 los rayos medulares que se proyectan y que contienen en su interior a los **túbulos rectos** y a los **conductos colectores** de las nefronas. Las regiones situadas entre los rayos medulares son los laberintos corticales que albergan en su interior a los corpúsculos renales, los túbulos contorneados y los túbulos colectores.

Desde la corteza hacia la médula los túbulos van acompañados por una red de capilares dispuestos de forma paralela y que en conjunto se denominan vasos rectos. Estos vasos son importantes porque forman la parte vascular del sistema intercambiador de contracorriente que regula la concentración de orina.



La diferencia que existe entre la distribución y longitud de los túbulos permite que se formen varias estructuras cónicas llamadas **pirámides renales** o medulares (de Malpighi) (**Figura 1**). Por lo general en el riñón humano hay de 8 a 12 pirámides sin embargo, puede haber hasta 18 de ellas. Las bases de las pirámides están orientadas hacia la corteza mientras que sus vértices apuntan hacia el seno renal. En cada pirámide se observa una **médula interna** y una **médula externa** (la parte contigua a la corteza) que a su vez se divide en **franja interna** y **franja externa**. El tejido cortical que se sitúa dentro de la médula forma las **columnas renales** (de Bertin) que se consideran como parte de la médula, aunque su composición es igual a la del resto del tejido cortical.

El vértice de cada pirámide se denomina **papila** y se proyecta dentro de un **cáliz menor**, que es una extensión de la pelvis renal con forma de copa. La punta de la papila, también conocida como área cribosa o cribiforme, está perforada por los orificios de desembocadura de los conductos colectores. Los cálices menores son ramificaciones de los **cálices mayores** que a su vez son las divisiones principales de la pelvis renal.

## 1.2 La nefrona

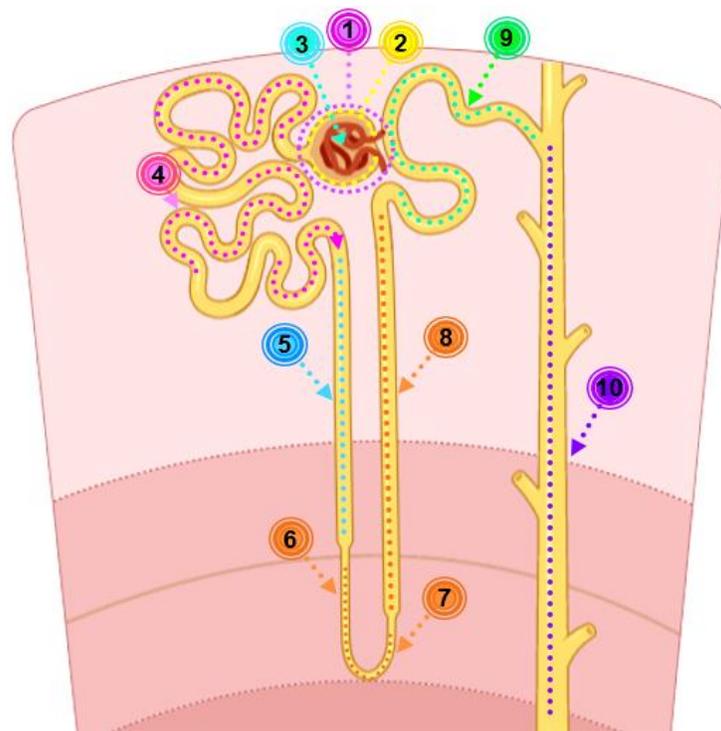
La **nefrona** es la unidad estructural y funcional del riñón. Se estima que un riñón humano contiene alrededor de 1 millón de nefronas, las cuales tienen dos componentes principales: 1) el **corpúsculo renal** que filtra el plasma sanguíneo, y 2) el **túbulo renal** que convierte el filtrado en orina.

El corpúsculo renal es el comienzo de la nefrona, consta de un glomérulo que es una bola de 10 a 20 capilares envueltos por una estructura epitelial bilaminar llamada cápsula glomerular o **cápsula de Bowman**. La cápsula de Bowman es la parte inicial de la nefrona en donde la sangre que fluye por los capilares glomerulares se filtra y se produce el ultrafiltrado glomerular. Los capilares glomerulares reciben la sangre desde la arteriola aferente y la envían hacia la arteriola eferente que luego se ramifica formando una nueva red capilar que irriga a los túbulos renales, el sitio donde entra la arteriola aferente y sale la arteriola eferente se denomina polo vascular. En el lado opuesto del corpúsculo renal se encuentra el polo urinario que es el sitio donde comienza el túbulo contorneado proximal.

El túbulo renal es un conducto que se aleja de la cápsula de Bowman y termina en la punta



de una pirámide medular. Mide aproximadamente 3 cm de largo y se divide en segmentos tubulares que tienen propiedades fisiológicas únicas y que, en conjunto participan en la producción de orina. El nombre de cada segmento se designa según el trayecto que adoptan, la ubicación y el grosor de su pared, estos segmentos son: el **túbulo contorneado proximal**, el **asa de Henle**, el **túbulo contorneado distal** y el **túbulo colector**. Los primeros tres segmentos forman parte de la nefrona, mientras que el túbulo colector es la estructura que se encarga de recibir el líquido proveniente de varias nefronas (**Figura 2**).



**Figura 2. Estructura básica de una nefrona.** En el esquema se pueden distinguir los diferentes segmentos de una nefrona que se encuentran señalados con diferentes colores y números. (1) Corpúsculo renal, (2) Cápsula de Bowman, (3) Glomérulo, (4) Túbulo contorneado proximal, (5) Túbulo recto proximal, (6) Asa de Henle descendente delgada, (7) Asa de Henle ascendente delgada, (8) Asa de Henle ascendente gruesa, (9) Túbulo contorneado distal y (10) Conducto colector.

Aunque todas las nefronas poseen los mismos componentes estructurales, no todas son iguales. El 80% son denominadas **nefronas corticales**, debido a que tienen sus corpúsculos renales en la parte externa de la corteza, además poseen asas de Henle bastante cortas que



se extienden en la zona externa de la médula. El 20% restante son **nefronas yuxtamedulares** cuyos corpúsculos renales se encuentran muy cerca de la base de la pirámide medular y cuyas asas de Henle, al ser bastante largas se extienden profundamente en la parte interna de la pirámide renal.

### **1.3 Función renal: filtración, reabsorción y secreción**

Los riñones convierten el plasma sanguíneo en orina mediante una serie de pasos que implican tres procesos fisiológicos: filtración glomerular, reabsorción tubular y secreción.

A medida que el líquido pasa por los diversos segmentos de la nefrona, cambia la composición y el nombre. Cuando se encuentra en el espacio capsular, se denomina filtrado glomerular y su composición es muy similar al plasma sanguíneo con la excepción de que casi no contiene proteínas plasmáticas. Más adelante el filtrado pasa al túbulo contorneado proximal y recibe el nombre de líquido tubular, cuya composición es variable y depende en gran medida del tipo de sustancias que agregan o eliminan las células tubulares. Por último, el ultrafiltrado llega a los túbulos colectores y se forma la orina, cuyo contenido de agua es variable.

A continuación, se hace una descripción más detallada de las etapas y las estructuras de la nefrona que participan durante la formación de la orina.

### **1.4 Filtración glomerular: el corpúsculo renal**

La filtración del plasma hacia el interior del túbulo renal es la primera etapa de la formación de orina y se lleva a cabo en el corpúsculo renal. Las sustancias que salen del plasma deben pasar por las tres barreras que conforman a la membrana de filtración, antes de entrar en la luz tubular.

La primera barrera es el endotelio de los capilares glomerulares. Esta barrera es bastante permeable y posee numerosas fenestraciones (poros) que miden entre 70 y 100 nm de diámetro. El tamaño de los poros permite que todos los solutos del plasma salgan de los capilares glomerulares e impide que se filtren las células sanguíneas y las plaquetas. Además, las proteínas con carga negativa que se encuentran sobre la superficie del poro ayudan a



repeler a las proteínas plasmáticas que también tienen carga negativa.

Entre los capilares del glomérulo y sus alrededores se encuentran las células mesangiales que regulan la filtración glomerular; esto es posible gracias a que tienen proyecciones citoplásmicas de filamentos similares a la actina que les permiten contraerse y modificar de esta manera el flujo sanguíneo. Asimismo, poseen una gran cantidad de canales acuosos de acuaporina 1 (AQP-1) que permiten un movimiento rápido del agua a través del epitelio.

Como segunda barrera tenemos a la lámina basal que se ubica entre el endotelio y los podocitos. Consta de una capa acelular de matriz extracelular que separa a el endotelio capilar del epitelio que recubre la cápsula de Bowman. Esta lámina está formada por una matriz de glucoproteínas con carga negativa y pequeñas fibras de colágeno que actúan como una especie de tamiz que separa a las proteínas plasmáticas más grandes del líquido que se filtra.

La tercera barrera de filtración es el epitelio de la cápsula de Bowman. La porción de epitelio capsular que rodea a cada capilar glomerular está formada por células especializadas llamadas podocitos que a su vez tienen extensiones citoplasmáticas denominadas pedicelios. Los espacios que quedan entre los pedicelios son las hendiduras de filtración que son rodeadas por una membrana delgada que permite el paso de moléculas con un diámetro menor a 7 nm, esto incluye agua, electrolitos, glucosa, ácidos grasos, aminoácidos, desechos nitrogenados y vitaminas.

### **1.5 Reabsorción tubular: el túbulo contorneado proximal, el asa de Henle y el túbulo contorneado distal**

Una vez que el filtrado glomerular pasa a la cápsula de Bowman, fluye a través de los diferentes segmentos tubulares. Durante el trayecto, algunas sustancias pasan a través de las células tubulares hacia el intersticio y de ahí a través de la membrana del capilar peritubular hasta que regresan al torrente sanguíneo. El regreso de estas sustancias es altamente selectivo y responde a las necesidades del organismo, a fin de preservar la homeostasis. Debido a que el filtrado que llega desde la cápsula de Bowman tiene la misma concentración de solutos que el líquido extracelular, se requiere del transporte activo para generar gradientes y reabsorber los solutos. La mayor parte de la reabsorción se lleva a cabo en el túbulo contorneado proximal (TCP) y sólo una pequeña parte tiene lugar en los segmentos más



distales. El TCP surge de la cápsula glomerular y se encuentra principalmente en la corteza renal. Es el segmento más largo y enroscado de todos, tiene un epitelio cilíndrico simple con microvellosidades prominentes (un borde en cepillo) lo que demuestra el gran volumen que se absorbe en este segmento. Las microvellosidades son lo que le da al epitelio su aspecto aserrado característico. Las células de este segmento contienen una gran densidad de mitocondrias que proporcionan el adenosín trifosfato (ATP) necesario para llevar a cabo el transporte activo de los solutos.

El asa de Henle es una porción larga que tiene forma de “U” y se encuentra principalmente en la médula. Empieza donde el TCP se endereza y se hunde en la médula, formando la parte descendente del asa. En su extremo profundo, el asa gira 180° y forma la extremidad ascendente que regresa a la corteza y viaja en paralelo, muy cerca de la extremidad descendente. Los segmentos gruesos tienen un epitelio cilíndrico simple. Forman la parte inicial de la extremidad descendente y gran parte o toda la extremidad ascendente. En este segmento, las células también participan en el transporte activo de sales, de modo que existe una actividad metabólica muy elevada y una gran cantidad de mitocondrias que contribuyen a darle grosor a la estructura. El segmento delgado tiene un epitelio simple y forma parte de la extremidad descendente más inferior, en esta región la actividad metabólica de las células es baja, sin embargo es una región bastante permeable al agua. De manera que, la función primaria del asa de Henle consiste en generar un gradiente osmótico que permita al túbulo colector concentrar la orina y concentrar agua. Además, el asa participa en la reabsorción de casi un 25% del  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$ .

El túbulo contorneado distal (TCD) comienza un poco después de que la parte ascendente del asa de Henle entra a la corteza. Este segmento es más corto y menos enroscado que el TCP. Tiene un epitelio cilíndrico con células de superficie lisa casi carentes de microvellosidades. El TCD participa durante la reabsorción de cloruro de sodio y agua.

## **1.6 Secreción tubular: El conducto colector**

El túbulo colector recibe el líquido proveniente de los TCD de múltiples nefronas. Varios de estos túbulos colectores convergen en dirección hacia la punta de la pirámide medular y, cerca de la papila se unifican para formar un túbulo papilar más largo. Cerca de 30 túbulos papilares desembocan en los poros que se encuentran en la punta cónica de cada papila. La orina



drena de los poros hacia el cáliz menor que cubre a la papila. Los túbulos colectores y papilares están cubiertos por un epitelio cilíndrico simple. La principal función del conducto colector es la de concentrar la orina y evitar la pérdida de grandes cantidades de agua.

## 1.7 Consumo energético y metabolismo renal

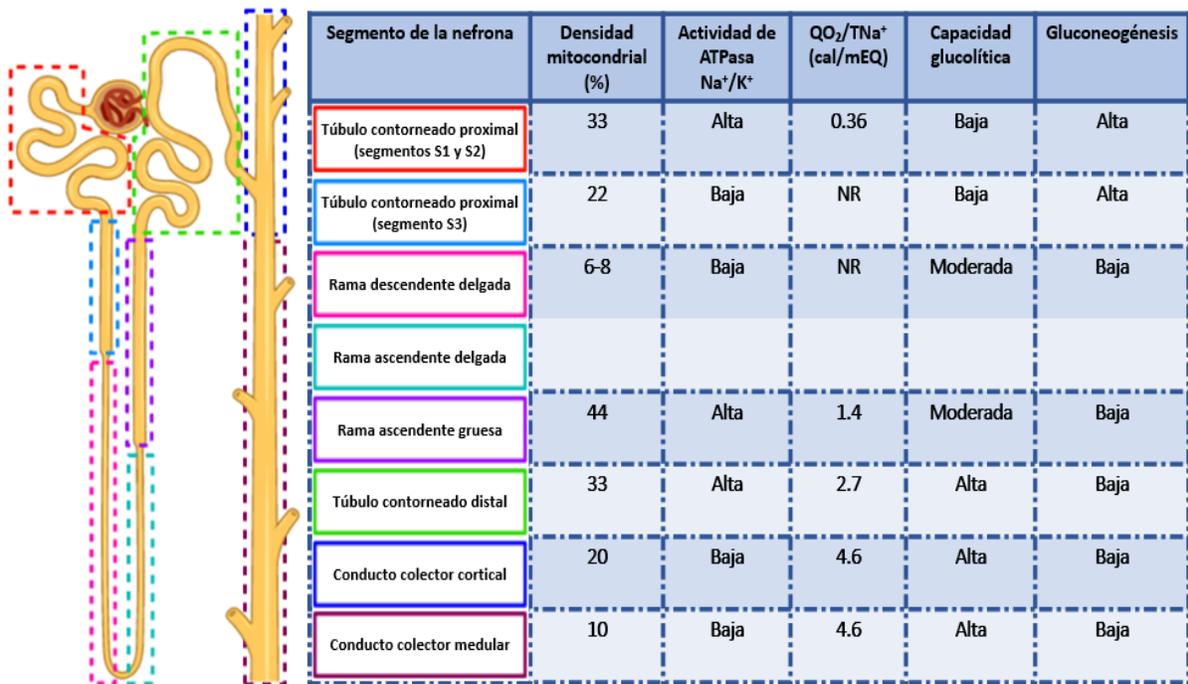
La bioenergética renal implica dos factores que se encuentran íntimamente asociados: 1) la oxigenación renal y 2) el consumo de energía. Referente a ello podemos decir que, aunque los riñones constituyen únicamente el 0.5% del peso corporal, consumen el 10% de oxígeno total y reciben entre el 20 y 25% del gasto cardiaco.

Los riñones destinan un porcentaje basal de energía para mantener los procesos vitales de las células y utilizan la mayor parte (cerca un 80%) durante la reabsorción activa de los solutos que se filtran en el lumen tubular y se envían de regreso al torrente sanguíneo.

En el tejido renal existen diversos tipos de transportadores sin embargo, el más abundante y activo es la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa o bomba de sodio (Mårtensson, 2019), cuya función es transportar tres moléculas de sodio fuera de la célula e introducir dos moléculas de potasio dentro de la célula, de esta manera se establece un gradiente de concentración a través de la membrana (Skorecki *et al*, 2011). Se estima que la concentración de los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en el medio extracelular es de ~140 mM y ~4 mM respectivamente, mientras que en el medio intracelular esta concentración es de ~15 mM para el  $\text{Na}^+$  y ~120 mM para el  $\text{K}^+$  (Clarke *et al.*, 2013). Por consiguiente, la mayor parte del oxígeno y de la energía que se obtiene en estos órganos, se destina al transporte activo del sodio (Mårtensson, 2019).

Los riñones, a diferencia de otros órganos, presentan una relación lineal entre el aporte (RBF) y la demanda de oxígeno (reabsorción de sodio). Concretamente, cuando aumenta el flujo sanguíneo renal (RBF) mejora la oxigenación renal e incrementa la tasa de filtración glomerular (GFR), que trae como consecuencia, el aumento de la reabsorción tubular y la demanda de oxígeno. Algunos factores como la perfusión, el gasto energético, la eficiencia metabólica e incluso la tolerancia a hipoxia, varían a lo largo de los diversos segmentos **(Figura 3)**.





**Figura 3. Esquema comparativo de los diferentes segmentos de la nefrona.** Se presenta el porcentaje de densidad mitocondrial, la actividad de la ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, la eficiencia metabólica (QO<sub>2</sub>/ Na<sup>+</sup>), y las principales vías metabólicas. NR= No reportado (Modificado de Mårtensson, 2019).

Generalmente del 85 al 90% de la perfusión renal circula por la corteza, la cual se encuentra comprendida en un 90% por los túbulos proximales (aproximadamente la mitad del total de la masa renal), cuyos segmentos S1 y S2 reabsorben glucosa, aminoácidos y agua, gracias al gradiente de sodio que genera la bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa. De hecho, este segmento es el que presenta la mayor eficiencia metabólica (QO<sub>2</sub>/TNa<sup>+</sup>) ya que el oxígeno (O<sub>2</sub>) y por tanto, la energía que se emplean para la reabsorción del Na<sup>+</sup> (TNa<sup>+</sup>) [o los μEq de Na<sup>+</sup> que se reabsorben por μmol de O<sub>2</sub> que se consume (QO<sub>2</sub>/TNa<sup>+</sup>)], es menor comparado con el resto de los segmentos. Cabe señalar que cerca del 90% de la corteza renal se encuentra comprendida por los túbulos proximales (aproximadamente la mitad del total de la masa renal), que utilizan la mayor parte del oxígeno que circula por la corteza. En contraste, la médula renal recibe únicamente del 10 al 15% del RBF; no obstante, la rama ascendente gruesa del asa de Henle presenta una alta densidad mitocondrial así como una elevada actividad de la bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa, por lo que requiere de una gran aporte de O<sub>2</sub> para



mantener el gradiente osmótico.

En los riñones aproximadamente el 95% de la energía se obtiene en forma de ATP, no obstante, la síntesis de ésta molécula requiere el uso de sustratos específicos cuya preferencia varía a lo largo de los múltiples segmentos de la nefrona. Por ejemplo, en el túbulo proximal la producción de energía se lleva a cabo principalmente a través de sustratos como ácidos grasos, cuerpos cetónicos y aminoácidos, mientras que en los segmentos más distales el metabolismo es primordialmente glucolítico. Cabe señalar que los túbulos proximales son el único segmento de la nefrona en donde ocurre la gluconeogénesis (principalmente a partir de lactato) lo cual, no sólo aporta sustratos energéticos a los segmentos más distales, sino que además contribuye a la gluconeogénesis total del organismo. Asimismo, este segmento es bastante vulnerable a cambios en el suministro de sustratos metabólicos y oxígeno, debido a que no genera energía a través de la glucólisis, y por tanto depende en su totalidad de la fosforilación oxidante para llevar a cabo la síntesis de ATP.

Los metabolitos que llegan al riñón dependen del flujo sanguíneo renal y la tasa de filtración glomerular, posteriormente entran en las células epiteliales renales mediante transportadores específicos, cuya actividad se encuentra facilitada a menudo, por el gradiente de  $\text{Na}^+$  generado por la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa. Una vez en la célula, los sustratos tienen tres posibles destinos: (1) transporte a través del epitelio de regreso al torrente sanguíneo (reabsorción), (2) conversión en otro sustrato (p. ej., de lactato a piruvato), o (3) la oxidación para producir ATP.

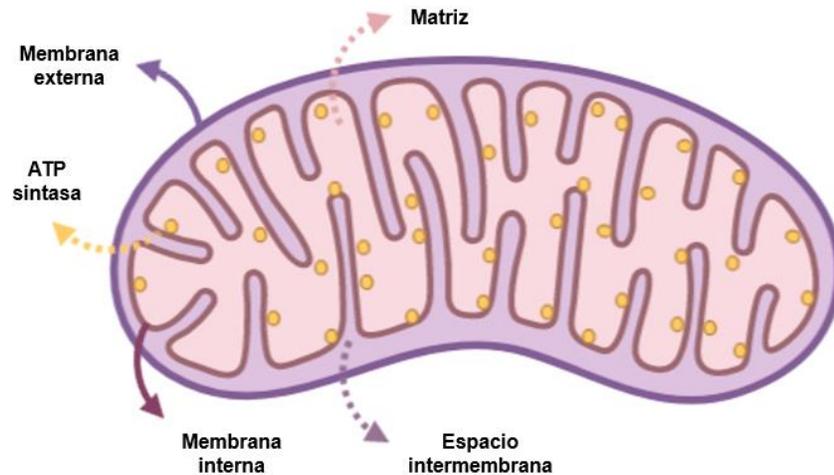
La ruta que conecta a los metabolitos con la producción del ATP que utiliza la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , es bastante compleja e implica una estrecha conexión entre la energía que se produce y la que se utiliza, por consiguiente, la densidad de mitocondrias es fundamental y depende de las características de cada segmento. Por ejemplo, en los segmentos S1 y S2 del túbulo proximal, en la rama ascendente gruesa del asa de Henle (mTAL) y en el túbulo contorneado distal, el contenido de mitocondrias es elevado a fin de satisfacer la gran cantidad de energía que requiere el transporte activo del sodio. Por consiguiente, en estos segmentos el suministro de oxígeno debe ser constante ya que la producción de ATP depende en gran medida de ello.



## 1.8 Mitocondria y fosforilación oxidante

Las mitocondrias son una red de organelos plásticos cuyo tamaño, forma y número depende en gran medida de las características propias de cada célula, así como del estado fisiológico del organismo del que provienen (Zhang & Ávalos, 2017). Estos organelos participan en una gran variedad de procesos celulares, sin embargo su principal función es producir el ATP que la célula requiere como fuente de energía (Bhargava & Schnellmann, 2017; Baker *et al*, 2019).

Estructuralmente, las mitocondrias se dividen en cuatro compartimentos: (1) la membrana mitocondrial externa (MOM), (2) el espacio intermembrana (3) la membrana mitocondrial interna (MIM) y (4) la matriz mitocondrial.



**Figura 4. Representación esquemática de una mitocondria.** Se muestra la estructura básica de una mitocondria y sus principales componentes (adaptado de Nicholls & Ferguson, 2013).

La MOM contiene un tipo de proteínas transportadoras de membrana llamadas porinas, que son canales que permiten el paso de iones y moléculas menores a 5000 daltons (<5000 Da). Aunque las moléculas y los iones pueden penetrar el espacio intermembranoso, la gran mayoría no puede atravesar la MIM debido a su bicapa lipídica y al tipo de transportadores que posee. Cabe señalar que la bicapa de la MIM contiene una elevada proporción de cardiolipina, fosfolípido que contribuye a dar estructura y permeabilidad selectiva a esta membrana. Estructuralmente, la MIM se encuentra replegada en numerosas crestas que



incrementan considerablemente la superficie total y que contienen diversas proteínas con tres principales tipos de función: (1) aquellas que llevan a cabo las reacciones de oxidación del sistema transportador de electrones; (2) las que se encargan de la producción del ATP dentro de la matriz (ATP sintasa), y (3) las que permean de forma selectiva metabolitos hacia la matriz y hacia el exterior. Finalmente, la matriz mitocondrial contiene una gran cantidad de enzimas, dentro de las que se incluyen aquellas que son necesarias para que se oxiden el piruvato y los ácidos grasos, la síntesis de aminoácidos, además de aquellas que participan en el ciclo del ácido cítrico y el ciclo de la urea, entre otras. Asimismo, la matriz contiene el genoma y los ribosomas mitocondriales, RNA de transferencia (tRNA) y algunas de las enzimas necesarias para la expresión de genes mitocondriales (Alberts *et al*, 2017).

En las mitocondrias ocurre la fosforilación oxidante (OXPHOS), proceso que se considera como el punto culminante del metabolismo productor de energía en los organismos aeróbicos. Todos los pasos que conllevan a la degradación de carbohidratos, lípidos y proteínas, convergen en esta etapa final de la respiración celular en la que la energía proveniente de la oxidación de sustratos y el flujo de electrones que genera el sistema de transferencia de electrones mitocondrial, impulsan la producción de ATP, agua y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (Bhargava & Schnellmann, 2017; Nelson *et al*, 2017).

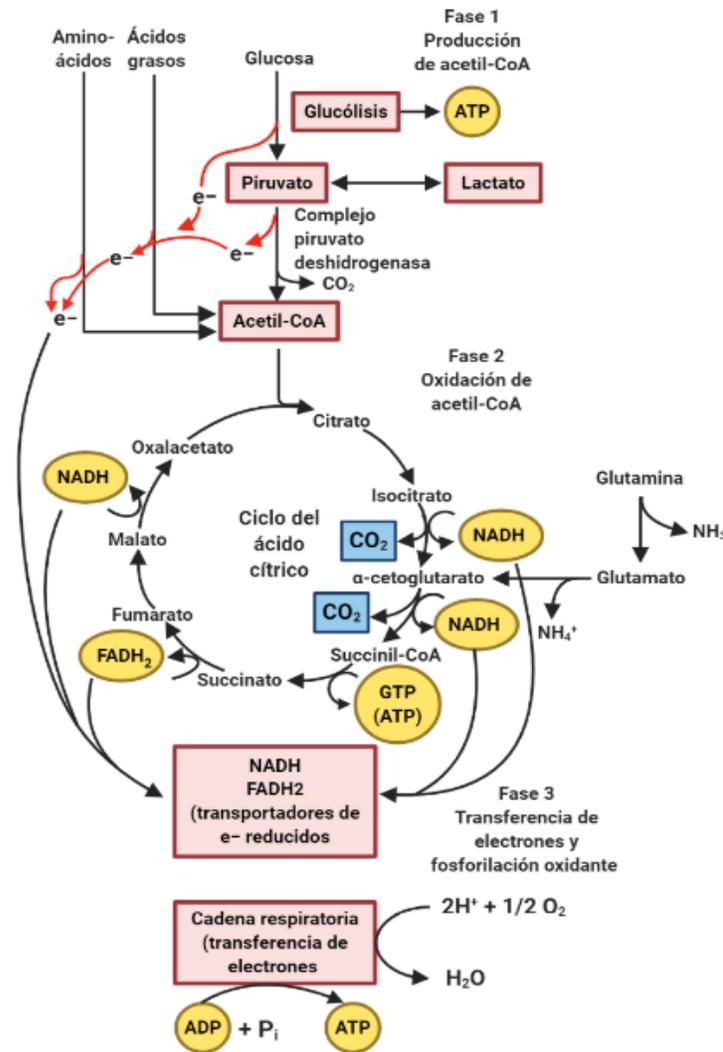
De acuerdo con la teoría quimiosmótica que postuló Peter Mitchell en 1961, la diferencia en la concentración de protones y de carga eléctrica entre las membranas, es el reservorio de energía para la obtención de ATP y NADH, moléculas funcionan como moneda. Tomando en cuenta lo anterior, la OXPHOS implica tres puntos clave: (1) durante el proceso intervienen electrones que fluyen a través del sistema transportador de electrones; (2) la energía que libera el flujo de electrones (proceso exergónico) está acoplada al bombeo de protones (proceso endergónico), desde la matriz hacia el espacio intermembrana que es impermeable a los protones, lo que permite que la energía se conserve en forma de potencial electroquímico o potencial transmembrana, y (3) el flujo de protones en favor de su gradiente de concentración proporciona la energía libre necesaria para que la ATP sintasa catalice la síntesis de ATP. Por consiguiente, existe acoplamiento entre el flujo de protones y la producción de ATP (Nelson *et al*, 2017).

Los sustratos que se requieren para el proceso de OXPHOS llegan al citosol y atraviesan la membrana mitocondrial externa a través de proteínas integrales de membrana (porinas).



Posteriormente estos sustratos, en conjunto con adenosín difosfato (ADP) y fosfato (sustratos básicos para formar ATP), cruzan la membrana mitocondrial interna hacia el interior de la matriz con ayuda de transportadores específicos que son impulsados por sus respectivos gradientes de concentración como por ejemplo, el translocador de nucleótidos de adenina (ANT) que participa intercambiando ADP por ATP; o mediante el gradiente de  $H^+$  que genera el sistema de transferencia de electrones mitocondrial (Skorecki *et al*, 2011). El resultado del catabolismo de aminoácidos, ácidos grasos y piruvato es la producción acetil-coenzima A (Acetil-CoA), molécula que entra al ciclo del ácido cítrico o ciclo de Krebs. Esto ocurre en el interior de la matriz mitocondrial y, en teoría, con cada vuelta del ciclo se producen tres moléculas de nicotinamida adenina dinucleótido ( $NAD^+$ ) y  $NAD^+$  reducido ( $NADH$ ), una molécula de dinucleótido de flavina adenina (FAD) y FAD reducido ( $FADH_2$ ), una molécula de trifosfato de guanosina (GTP) o de ATP y dos moléculas de  $CO_2$ . El  $NADH$  y el  $FADH_2$  son moléculas reducidas, por lo que son capaces de donar sus electrones a los complejos mitocondriales, que forman parte del sistema de transferencia de electrones, que se encuentra ubicado en la membrana interna mitocondrial. El flujo de electrones a través de los distintos complejos mitocondriales es secuencial y culmina con la reducción tetravalente del oxígeno en agua. Concretamente, el  $NADH$  dona electrones al complejo I (CI,  $NADH$  deshidrogenasa), mientras que el  $FADH_2$  dona electrones al complejo II (CII, succinato deshidrogenasa), posteriormente los electrones fluyen hacia la ubiquinona o coenzima  $Q_{10}$  que acepta los electrones provenientes de estos dos complejos y los transfiere al complejo III (CIII o UQ-citocromo c reductasa). El CIII entonces transfiere los electrones al citocromo c (que es un elemento móvil, al igual que la coenzima  $Q_{10}$ ) y finalmente, al complejo IV (CIV o citocromo C oxidasa) el cual los transfiere al oxígeno, que es el aceptor final de los electrones. En este proceso se produce agua, la forma completamente reducida del oxígeno (**Figura 5**) (Skorecki *et al*, 2011).

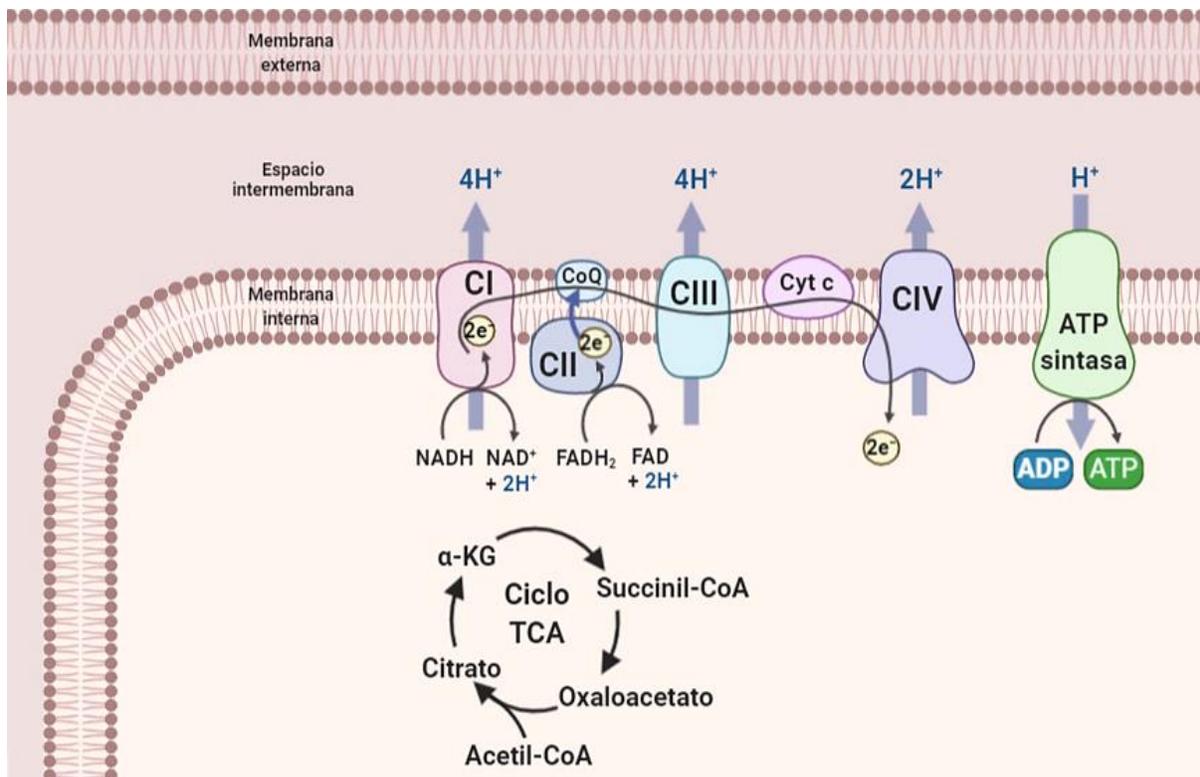




**Figura 5. Metabolismo y fosforilación oxidante.** Se muestra el catabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, en tres fases de la respiración celular. **Fase 1**, la oxidación de ácidos grasos, glucosa y algunos aminoácidos produce acetil-coenzima A (Acetil-CoA). **Fase 2**, la oxidación de grupos acetilo en el ciclo del ácido cítrico incluye cuatro pasos en los que se obtienen electrones. **Fase 3**, el NADH y el FADH<sub>2</sub> donan electrones a los componentes del sistema transportador de electrones mitocondrial y los electrones fluyen hasta que ocurre la reducción tetravalente del oxígeno en agua. El flujo de electrones conduce a la producción de ATP. Así mismo, se observan dos vías en el túbulo proximal: (1) oxidación del lactato mediante piruvato y acetil-CoA, y (2) conversión de glutamina a  $\alpha$ -cetoglutarato en las mitocondrias con la producción de NH<sub>3</sub> (Modificado de Skorecki *et al*, 2011).



La energía potencial que se libera y que se encuentra almacenada en el gradiente de  $H^+$ , aporta la fuerza impulsora que requiere la ATP sintasa (CV, complejo V) para la síntesis de ATP, a partir de ADP y fosfato. Por consiguiente, el gradiente de  $H^+$  se encuentra estrechamente acoplado a la síntesis de ATP. El proceso descrito, es la clave del mecanismo quimiosmótico de fosforilación oxidante propuesto por Mitchell en 1961. El ATP que se sintetiza, pasa de la matriz al interior del espacio intermembrana con ayuda de un cotransportador ADP-ATP, conocido como traslocasa de nucleótidos de adenina, posteriormente el ATP atraviesa la membrana externa a través de porinas o canales aniónicos dependientes de voltaje (VDAC) y llega al citosol donde queda disponible para unirse a varios tipos de ATPasas (como  $Na^+/K^+$  ATPasa) que se encuentran en la membrana plasmática. En resumen, el flujo de electrones a través del sistema de transporte de electrones, genera un gradiente de protones que es la fuerza impulsora para la síntesis de ATP (Skorecki *et al.*, 2011).



**Figura 6. Flujo de electrones a través los complejos que forman parte del sistema de transferencia de electrones mitocondrial.** En la matriz mitocondrial, el piruvato se convierte en Acetil-CoA, que se condensa en oxaloacetato para producir citrato que a su



vez, sigue una serie de reacciones donde se eliminan 2 carbonos en forma de  $\text{CO}_2$ , hasta que se regenera oxalacetato que reinicia el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) o ciclo de Krebs. Al final se generan 3 moléculas de NADH y una de  $\text{FADH}_2$ , las cuales donan sus electrones a los intermediarios de la cadena transportadora de electrones que se encuentran en la membrana interna de la mitocondria. Los transportadores de electrones mitocondriales, siguen un gradiente de energía, de tal forma que los electrones pasan de un intermediario con más energía a uno con menos energía. El flujo de electrones, permite que se bombeen protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana, generando una diferencia de potencial electroquímico el cual se utiliza como fuerza motriz para la síntesis de ATP a partir de ADP.

### 1.9 Bioenergética mitocondrial

La OXPHOS es un elemento de la bioenergética mitocondrial que combina el transporte de electrones a través del sistema transportador de electrones con el consumo de oxígeno y la síntesis de ATP (Djafarzadeh & Jakob, 2017) por tanto, su estudio permite comprender cómo se transduce la energía a través de los distintos componentes del sistema de transferencia de electrones mitocondrial (Gnaiger, 2007). La OXPHOS se puede evaluar en mitocondrias aisladas *in vitro* por oximetría, método con el que se determina la tasa de consumo de oxígeno (OCR, Oxygen consumption rate) asociada a distintos estados respiratorios que se inducen y que son una medida directa de la respiración mitocondrial (Gnaiger, 2007). Lo anterior tiene como fundamento el hecho de que, durante la fosforilación oxidante las mitocondrias utilizan oxígeno como aceptor final de electrones; por consiguiente, el consumo de oxígeno está directamente acoplado al proceso de la OXPHOS. Algunos de los estados respiratorios que se evalúan por oximetría son: (1) Estado 1 (S1) o respiración mitocondrial basal, (2) estado 2 (S2) o el consumo de oxígeno después de que se adicionan sustratos específicos de los complejos mitocondriales, (3) estado 3 (S3) o el máximo consumo de oxígeno que se obtiene después de adicionar ADP y Pi (fosfato) en concentraciones saturantes, y (4) estado 4 (S4) o la respiración en reposo después de que se consume el ADP (se transforma en ATP), mismo que se puede inducir con oligomicina (S4o) un inhibidor específico de la ATP sintasa (Djafarzadeh & Jakob, 2017).

Durante una respirometría, se alimenta la cadena respiratoria de dos formas: vía CI o vía CII.



Lo anterior hace referencia a todo el proceso que se desencadena dentro del sistema de transferencia de electrones con la adición secuencial de sustratos específicos, ADP e inhibidores. Algunos de los sustratos que se utilizan para favorecer la producción de moléculas altamente reducidas dentro de la matriz mitocondrial son: la combinación de piruvato, malato y glutamato para la producción del NADH y el succinato para la producción de FADH<sub>2</sub>. La importancia de que se generen moléculas reducidas dentro del sistema, recae en que éstas donan electrones a los diferentes componentes del sistema de transferencia de electrones mitocondrial, el NADH al CI y el FADH<sub>2</sub> al CII. En este punto de la respirometría (para cualquiera de las vías) la OCR mitocondrial (S2 o estado 2 de la respiración) es lenta, debido a que en presencia de los sustratos y ausencia de ADP, no hay síntesis de ATP, por consiguiente no hay re-entrada de protones a través de la ATP sintasa. De hecho, durante S2 la respiración se regula automáticamente de manera que, los protones que bombea el sistema transportador de electrones se equilibran con los protones que regresan al interior de la membrana (Nicholls & Ferguson, 2013).

Después de los sustratos, se agrega ADP y Pi en concentraciones saturantes (para asegurar que el sistema alcance la máxima capacidad de fosforilación), con lo cual se estimula el transporte de electrones para la síntesis de ATP. En general, durante este punto la OCR es rápida (S3 de la respiración) y alcanza un punto máximo (Gnaiger, 2007). La razón fisiológica de lo anterior es que la ATP sintasa utiliza la fuerza protón motriz (PMF) para la síntesis de ATP a partir de ADP y la acopla a la re-entrada de protones, lo que acelera el transporte de electrones y por consiguiente, aumenta el consumo de oxígeno (Brand & Nicholls, 2011). Durante el S3, la respiración también se autoregula, de modo que cuando la relación ATP/ADP se acerca al equilibrio, la PMF aumenta y la re-entrada de protones a través de la ATP sintasa se detiene, lo que reduce la velocidad del transporte de electrones y por tanto disminuye el consumo de oxígeno (Nicholls & Ferguson, 2013). El S3 y por tanto la fosforilación oxidante, terminan cuando suficiente ADP se fosforila a ATP y se alcanza el equilibrio termodinámico entre el sistema transportador de electrones y la fuerza protón motriz (S4 de la respiración) o cuando se inhibe a la ATP sintasa con oligomicina (S4o) (Brand & Nicholls, 2011; Nicholls & Ferguson, 2013).

Cuando se inhibe a la ATP sintasa y se induce el S4 (S4o), el consumo de oxígeno se vuelve lento debido a que la re-entrada de protones se detiene e incrementa la PMF. Durante este estado, existe un "leak" o fuga de protones inherente que permite que se mantenga la



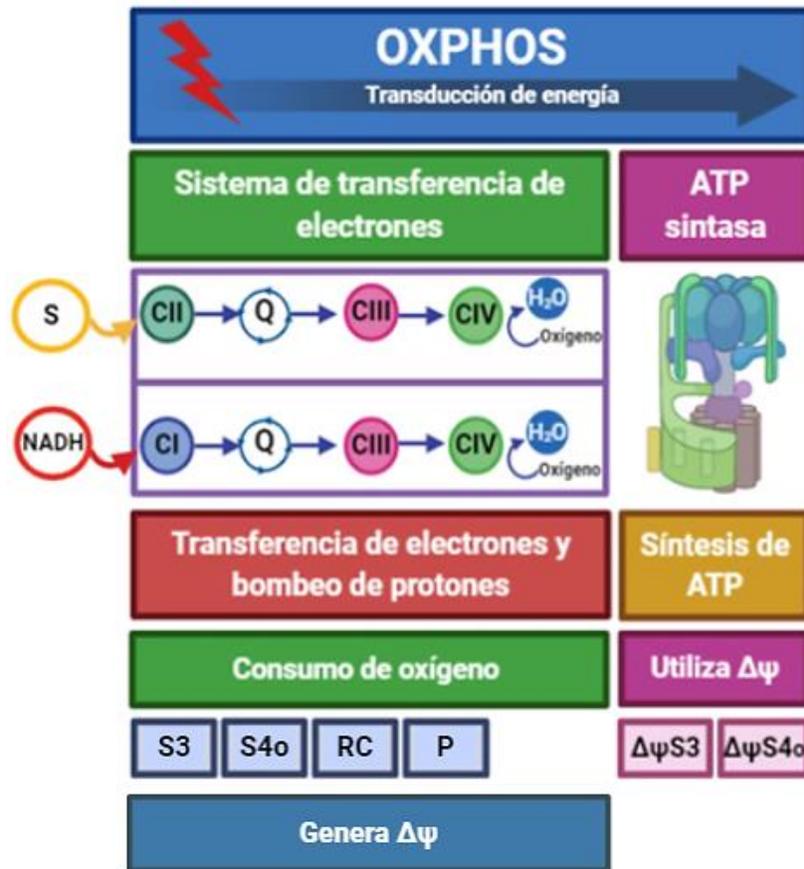
respiración aun cuando no hay síntesis de ATP (similar al caso del S<sub>2</sub>) (Divakaruni & Brand, 2011) por consiguiente, el consumo de oxígeno durante el S<sub>4o</sub> está controlado principalmente por la fuga o “leak” de protones a través de la membrana interna mitocondrial (Nicholls & Ferguson, 2013). Por lo tanto, para determinar el consumo real de oxígeno durante el S<sub>4o</sub>, es necesario inhibir por completo el bombeo de protones y la respiración mitocondrial, agregando rotenona y antimicina como inhibidores de los CI y CIII, respectivamente. De esta forma, se obtiene el consumo de oxígeno independiente de la respiración mitocondrial (respiración residual, ROX) el cual se debe restar a los valores del S<sub>4o</sub> (S<sub>4o</sub>-ROX). La fuga total de protones en una mitocondria se atribuye principalmente a dos procesos: el leak pasivo o basal y el leak activo o inducible (Divakaruni & Brand, 2011). Aunque los mecanismos moleculares que generan el leak basal no se conocen con exactitud, se sabe de varios factores que lo modifican, por ejemplo: la superficie de la membrana interna mitocondrial y su composición (Jastroch *et al.*, 2010). En cuanto al leak inducible, se ha descrito que las proteínas desacoplantes (UCP’s), proteínas específicas de la membrana interna mitocondrial, contribuyen de manera importante al mismo, permitiendo el incremento en la permeabilidad de los protones y propiciando de esta manera al aumento de la velocidad de respiración (Zhao *et al.*, 2019).

En las mitocondrias, el grado de acoplamiento (funcionalidad) e integridad se determina mediante el control respiratorio (RC), que se define como el cociente S<sub>3</sub>/S<sub>4o</sub>, esto es, la relación entre la respiración mitocondrial que respalda la síntesis de ATP (OXPHOS) y la que se requiere para compensar la fuga de protones (Leak) (Brand & Nicholls, 2011; Nicholls & Ferguson, 2013). Este parámetro se utiliza con bastante frecuencia para determinar qué tan funcionales son las mitocondrias ya que engloba tres procesos metabólicos clave: la oxidación del sustrato, la producción de ATP y la fuga de protones, por consiguiente cualquier cambio en la OXPHOS se reflejará en los valores del RC. Si los valores del RC no cambian, se puede afirmar que en general, no existe disfunción en la bioenergética de las mitocondrias aisladas (Brand & Nicholls, 2011). Aunque diversos factores como en tipo de sustrato, la cantidad y calidad de las mitocondrias, así como el ATP influyen sobre el RC, se estima que los valores del RC para mitocondrias aisladas de la corteza renal de rata oscilan entre ~4 y 9 (Edwards *et al.*, 2020).

El potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) es otro elemento clave de la bioenergética que se considera como indicador de integridad mitocondrial (Divakaruni & Brand, 2011; Figueira



*et al*, 2012). Este elemento es el principal componente de la fuerza protón motriz y es crucial para mantener la función de la cadena respiratoria e impulsar la síntesis de ATP, por lo que la pérdida significativa del mismo se traduce en desabasto energético (Joshi & Bakowska, 2011). Los valores típicos del  $\Delta\Psi_m$  son negativos y oscilan entre 150-180 mV (Perry *et al.*, 2011; Zorova *et al.*, 2018) y se considera que la despolarización por debajo de estos valores, es indicativo de que la función mitocondrial se encuentra deteriorada (Divakaruni & Brand, 2011).



**Figura 7. La fosforilación oxidante (OXPHOS) como elemento clave de la bioenergética.** El estudio de la OXPHOS y de sus elementos nos permite comprender cómo se transduce la energía a través de los componentes del sistema de transferencia de electrones (STE) y cómo esto se relaciona directamente con la síntesis de ATP. Los complejos respiratorios I (CI) y II (CII) oxidan sustratos provenientes del ciclo de Krebs como son NADH y succinato (S) respectivamente, para generar una corriente de electrones que se transfieren a través de los distintos componentes del STE hasta llegar al oxígeno ( $O_2$ ). Acoplado a la transferencia de electrones se encuentra el bombeo de



protones por parte de los complejos I, III y IV. Esto genera la diferencia de cargas (gradiente eléctrico) y de protones (gradiente químico) que en conjunto origina la fuerza protón motriz (FPM). La ATP sintasa utiliza la PMF para la síntesis de ATP y la acopla la re-entrada de protones, lo que acelera el transporte de electrones y aumenta el consumo de oxígeno. La respirometría de alta resolución permite evaluar el consumo de oxígeno durante la OXPHOS (P) a partir de distintos parámetros respiratorios: estado 3 (S3), estado 4 inducido con oligomicina (S4o), control respiratorio (RC), además del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ) asociado a la FPM ( $\Delta\Psi$  S3 y  $\Delta\Psi$ S4o).

## 2. Antecedentes

Debido al papel fundamental que tienen las mitocondrias en la producción de ATP mediante el proceso de fosforilación oxidante, no es sorprendente que cualquier alteración que afecte directamente su función o la de cualquiera de sus componentes estructurales, tenga graves repercusiones sobre la función renal, y viceversa (Eirin *et al.*, 2017; Shamakhi, 2019).

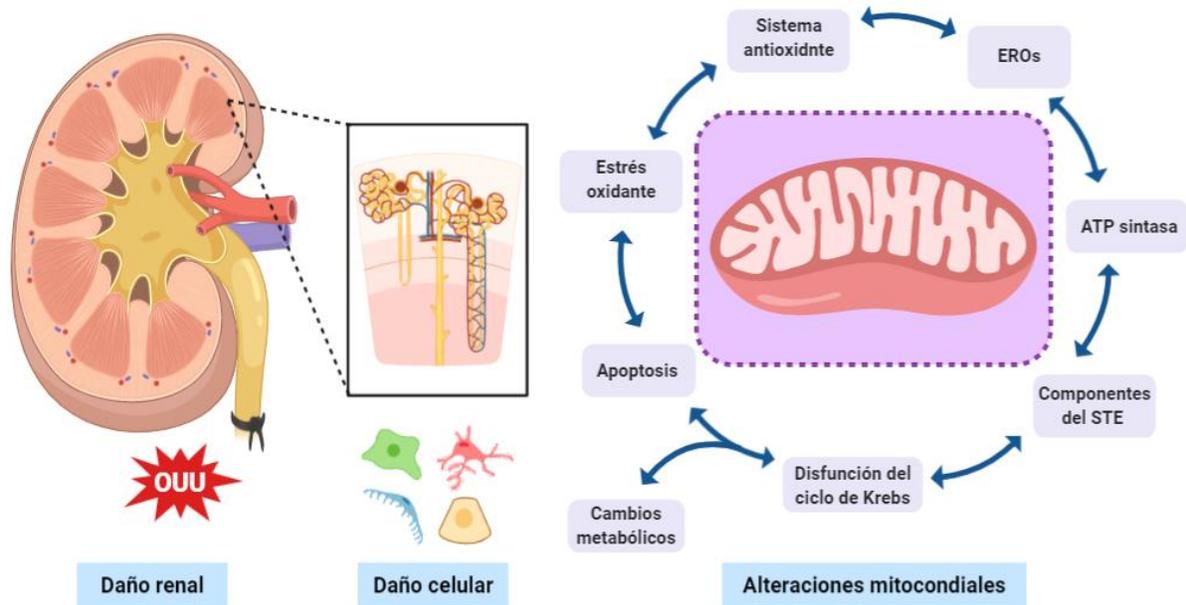
La obstrucción del tracto urinario o nefropatía obstructiva, es un problema clínico común que frecuentemente ocasiona daño renal. Las causas de la obstrucción son variables y dependen de la edad del paciente, en niños son primordialmente congénitas y en adultos son adquiridas (Zecher *et al.*, 2009; Uceró *et al.*, 2010). Debido a su naturaleza silente y de difícil diagnóstico, es frecuente que la obstrucción persista, ocasionando pérdida severa de la función renal y propiciando el desarrollo de enfermedad renal terminal en los niños pequeños e insuficiencia renal en los adultos, patologías que actualmente representan un grave y creciente problema de salud mundial.

Dentro de los diversos modelos experimentales de daño renal que se utilizan, se encuentra la obstrucción unilateral de uréter (OUU), modelo experimental que permite el estudio de las alteraciones que ocurren en diferentes etapas de la nefropatía obstructiva y que conducen a daño renal (Uceró *et al.*, 2010; Uceró *et al.*, 2014; Martínez-Klimova *et al.*, 2019). Asimismo, es uno de los modelos que más se utilizan para estudiar los cambios fisiopatológicos que ocurren durante la insuficiencia renal, así como los mecanismos que conducen al desarrollo de fibrosis.



En el modelo de OUU se ha observado que durante los días 1, 2, 3, 7, 10 y 14 posteriores a la obstrucción disminuyen progresivamente la cantidad de ácido desoxirribonucleico mitocondrial (mDNA), la expresión proteica de los complejos mitocondriales I, II, III y IV así como la ATP sintasa, además de pérdida en la definición de las crestas mitocondriales. Estos cambios se relacionan con la presencia de estrés oxidante, inflamación, apoptosis y fibrosis, procesos que en conjunto, se relacionan con la progresión hacia la insuficiencia renal crónica.

De igual manera, se ha observado que durante la OUU existe la acumulación de metabolitos asociados a diversas rutas metabólicas, lo que sugiere que vías como la glucólisis, el ciclo del ácido cítrico, la fosforilación oxidante y la  $\beta$ -oxidación, se encuentran alteradas (Liu *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2018).



**Figura 8. Resumen de las alteraciones mitocondriales en el riñón obstruido.** El daño renal por obstrucción ocasiona daño celular y modifica las condiciones metabólicas debido a la acumulación de productos de deshecho. Las mitocondrias responden a los cambios metabólicos para mantener la homeostasis dentro del sistema, hasta que el daño excede. Algunas de las alteraciones mitocondriales que se han reportado en el riñón obstruido, incluyen: acumulación y liberación de metabolitos del ciclo de Krebs; cambios en la expresión y actividad de los principales componentes del sistema de transferencia de



electrones mitocondrial (STE); cambios en la síntesis de ATP; estrés oxidante debido a la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y disminución de la capacidad del sistema antioxidante; apoptosis (Zecher *et al.*, 2009; Uceró *et al.*, 2010; Uceró *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016; Eirin *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018; Martínez-Klimova *et al.*, 2019; Shamakhi, 2019).

### 3. Justificación

La OUU es un modelo experimental que permite el estudio de los procesos fisiopatológicos que ocurren durante la nefropatía obstructiva y que conducen al establecimiento de la insuficiencia renal crónica (Chevalier, 2006; Martínez-Klimova *et al.*, 2019).

Desde el punto de vista fisiopatológico, los efectos que tiene la obstrucción de uréter sobre la función renal son consecuencia de una gran variedad de mecanismos que interactúan de forma compleja y que no se han comprendido completamente (Manucha, 2007). A pesar de los múltiples estudios que existen, el conocimiento sobre las alteraciones mitocondriales renales durante la OUU y su participación en la progresión hacia la enfermedad renal crónica (CKD) sigue siendo limitado debido en parte a que no existen estudios funcionales sobre bioenergética mitocondrial que profundicen en la capacidad respiratoria mitocondrial. De igual manera, se ha demostrado que si bien existe un proceso de hipertrofia en ambos riñones, tanto la respuesta metabólica adaptativa, como el gasto energético y los procesos de fibrosis y apoptosis son diferentes en el riñón obstruido en comparación con el contralateral (Chevalier *et al.*, 2009; Forbes *et al.*, 2012; Uceró *et al.*, 2014). Por lo tanto, es necesario realizar estudios comparativos que permitan tener una mejor aproximación de las alteraciones que ocurren en la función mitocondrial de ambos riñones conforme incrementa el tiempo de obstrucción.

### 4. Pregunta de investigación

¿Cuáles son los cambios o alteraciones que ocurren en los parámetros asociados a la bioenergética mitocondrial de los riñones obstruidos y contralaterales en el intervalo comprendido entre los 4 a 28 días posteriores a la OUU?



## 5. Hipótesis

La OUU generará de forma progresiva alteraciones en la bioenergética mitocondrial, específicamente la disminución de la capacidad del sistema de fosforilación oxidante. Estas alteraciones serán mayores en el riñón obstruido en comparación con el riñón contralateral.

## 6. Objetivo general

Evaluar en el modelo de OUU los cambios en la bioenergética mitocondrial de ambos riñones durante un curso temporal.

## 7. Objetivos específicos

Evaluar en el riñón obstruido y contralateral después de 4, 7, 14, 21 y 28 días de OUU:

- 1) Los parámetros respiratorios S3, S4o, RC y P cuando la respiración es alimentada vía CI.
- 2) El  $\Delta\Psi_m$  asociado a los estados respiratorios S3 y S4o cuando la respiración es alimentada vía CI.
- 3) Los parámetros respiratorios S3, S4o, RC y P cuando la respiración es alimentada vía CII.
- 4) El  $\Delta\Psi_m$  asociado a los estados respiratorios S3 y S4o cuando la respiración es alimentada vía CII.

## 8. Materiales y métodos

### 8.1 Modelo Experimental

Los experimentos que se realizaron durante este proyecto fueron aprobados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio de la Facultad de Química (FQ/CICUAL/260/18).



Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso aproximado de 250 a 350 g al momento de la cirugía. Los animales se alojaron en cajas de acrílico transparente, a temperatura ambiente con un ciclo de luz/oscuridad 12/12 h, con agua y alimento *ad libitum*. Las ratas se dividieron en dos grupos experimentales: Sham (Control) y con cirugía de OUU. Los grupos experimentales son descritos a continuación:

### **Grupo I. Sham o control**

Las ratas se anestesiaron vía inhalatoria con isoflurano/oxígeno (2%), posteriormente se afeitó y limpió el área abdominal con un antiséptico de yodo.

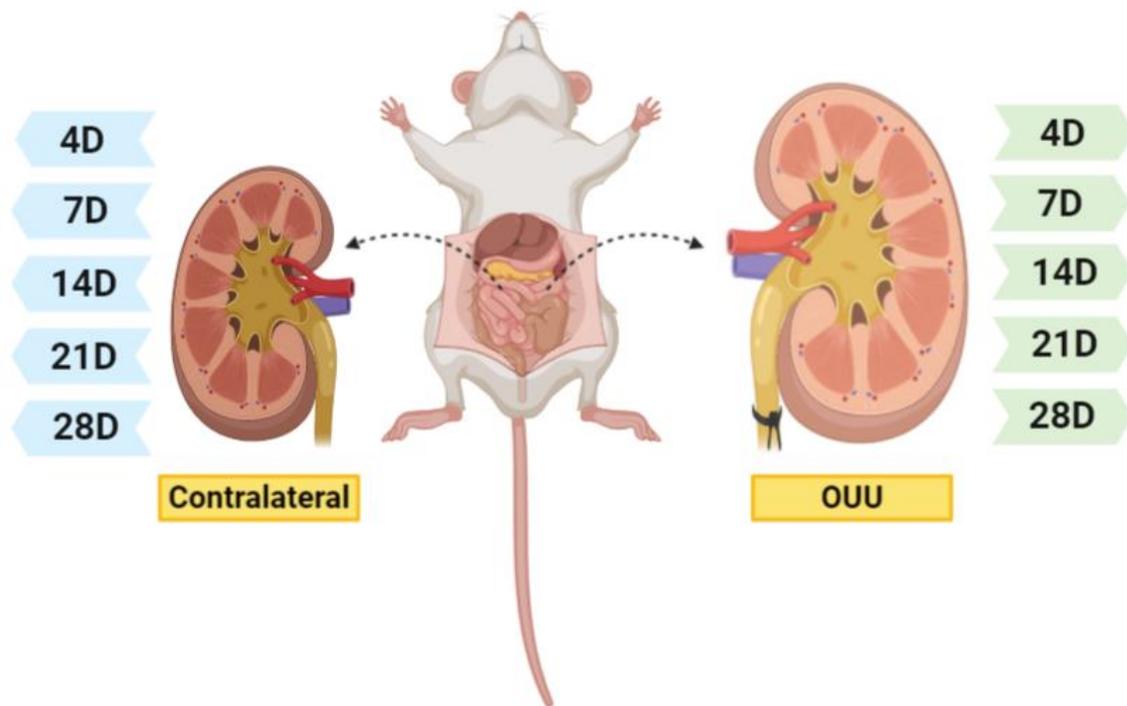
En todos los casos se usaron camas quirúrgicas colocadas sobre una tablilla termo-regulable cuyo objetivo fue preservar la temperatura corporal de los animales a lo largo del procedimiento, asimismo se utilizó un estereomicroscopio binocular de alta resolución para visualizar con mayor precisión la zona de intervención. Mediante una incisión sobre la línea media, se accedió a la cavidad peritoneal y con ayuda de unos hisopos se despejaron los intestinos del área, posteriormente se identificó el uréter izquierdo y en seguida se suturó al animal para permitir su recuperación.

### **Grupo II. OUU**

En este grupo de animales, se realizaron los mismos procedimientos previos a la cirugía que los descritos para el grupo Sham.

Durante la cirugía, el uréter derecho se mantuvo intacto a fin de obtener el grupo de riñones contralateral. Por otra parte, el uréter izquierdo se disectó y aproximadamente 2 cm por debajo del riñón se realizó una doble ligadura con hilo de sutura quirúrgica 3-0. De esta manera, quedaron dos riñones distintos dentro del mismo grupo experimental: el contralateral del lado derecho y el obstruido del lado izquierdo. Al término de la cirugía, cada animal se asignó en uno de los 5 subgrupos experimentales: 4, 7, 14, 21 y 28 días de obstrucción, respectivamente (**Figura 9**), con una n de 6 a 8 individuos por subgrupo.





**Figura 9. Animal con cirugía de obstrucción unilateral de uréter (OUU).** Se observa el riñón derecho sin obstrucción (o contralateral) y el riñón izquierdo con obstrucción. Al término de la cirugía el animal se asignó en uno de los 5 subgrupos experimentales: 4, 7, 14, 21 y 28 días (D) de obstrucción.

Una vez que concluyó el tiempo de evolución, se anestesió a los animales vía i. p con pentobarbital sódico (120 mg/kg) y mediante una incisión sobre la línea media se accedió a la cavidad peritoneal, posteriormente se extrajo sangre arterial además de ambos riñones. Después de haber obtenido las muestras, los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical. La sangre se recolectó en un tubo con heparina y después se centrifugó durante 10 min a 2500 x g; el plasma sanguíneo resultante se almacenó a -40 °C hasta su análisis.

Los riñones se pesaron en frío, se removió la cápsula y, se procesaron de acuerdo con el tipo de ensayo al que estaban destinados: (1) ensayos en mitocondrias aisladas: bioenergética, (2) ensayos en tejido íntegro: histología y microscopía electrónica y (3) ensayos en tejido homogeneizado: inmunoréplica tipo Western.



## 8.2 Aislamiento de mitocondrias por centrifugación diferencial

Cada muestra se procesó de manera independiente a 4°C, siguiendo el mismo procedimiento: Después de su extracción, los riñones se lavaron con amortiguador de aislamiento "A" (Composición: D-manitol 225 mM, sacarosa 75 mM, EDTA 1 mM, HEPES 5 mM y BSA 0.1%, pH 7.4) para eliminar los restos de sangre. Después se realizó un corte sagital y se obtuvieron pequeños trozos de la corteza renal, los cuales se colocaron en un tubo homogenizador tipo Potter-Elvehjem con 2 mL del amortiguador de aislamiento "A" a 4°C. Posteriormente el tejido se sometió a 3 ciclos de homogeneización suave con un mortero de TeflonVR acoplado a un taladro.

El homogeneizado de corteza se colocó en un microtubo de 2 mL y se sometió a una serie de tres centrifugaciones para obtener el precipitado rico en mitocondrias. La primera centrifugación se realizó a 2,500 x g durante cinco minutos y el sobrenadante que se obtuvo se transfirió a un microtubo de 2 mL. Posteriormente el sobrenadante se centrifugó una segunda ocasión a 12,000 x g durante 12 minutos. Para la tercera centrifugación se eliminó el sobrenadante y se preservó el precipitado de la parte inferior del tubo, el cual se resuspendió cuidadosamente en 150 µl de amortiguador de aislamiento "B" (misma composición y temperatura que el amortiguador "A", sin albúmina de suero bovino, BSA) y se centrifugó a 12,000 x g durante 12 minutos más. Finalmente, el sobrenadante se eliminó y se preservó el precipitado mitocondrial de color crema, el cual se resuspendió en 80-100 µl de amortiguador de aislamiento "B" (Aparicio-Trejo *et al.*, 2017; Aparicio-Trejo *et al.*, 2019; Aparicio-Trejo *et al.*, 2020).

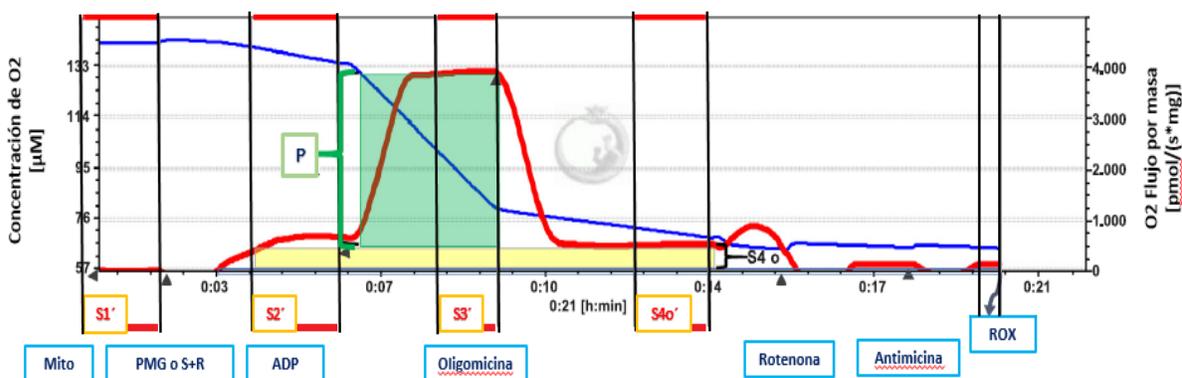
## 8.3 Cuantificación de proteínas

Se determinó la cantidad de proteínas por el método de Bradford, que se basa en el cambio de coloración que produce la unión de la proteína con el colorante azul de Coomassie en medio ácido. El método se ajustó a una placa de 96 pozos y se midió la absorbancia a 595 nm en un lector de placas Synergy HT. La absorbancia de las muestras se comparó con una curva patrón que se obtuvo tomando diferentes cantidades de la proteína estándar BSA y después se interpoló la concentración de proteínas a partir de la absorbancia.



## 8.4 Respiración mitocondrial

El consumo mitocondrial de  $O_2$  se evaluó a una temperatura constante de  $37\text{ }^\circ\text{C}$  en un respirómetro de alta resolución (Oxímetro O2k, **OROBOROS**, Innsbruck, Austria). Las mitocondrias recién aisladas ( $300\text{ }\mu\text{g}$  de proteína total) se colocaron dentro de la cámara del oxímetro que contenía  $2\text{ mL}$  de amortiguador de respiración MiR05 (Composición: EGTA  $0.5\text{ mM}$ ,  $\text{MgCl}_2$   $3\text{ mM}$ , ácido lactobiónico  $60\text{ mM}$ , taurina  $20\text{ mM}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $10\text{ mM}$ , HEPES  $20\text{ mM}$ , sacarosa  $110\text{ mM}$  y BSA libre de ácidos grasos  $1\text{ g/L}$ ). El transporte de electrones se inició de dos maneras: en la primera se agregaron sustratos asociados al Complejo I (CI): piruvato  $5\text{ mM}$ , malato  $2\text{ mM}$  y glutamato  $10\text{ mM}$  (PMG); y en la segunda se agregó succinato  $10\text{ mM}$  como sustrato del Complejo II (CII) más rotenona  $0.5\text{ }\mu\text{M}$  como inhibidor del CI. Los distintos estados respiratorios se estimularon de la siguiente manera: el estado respiratorio 3 (**S3**) adicionando ADP  $2.5\text{ mM}$  y el estado respiratorio 4 (**S4o**) inhibiendo a la ATP sintasa (CV) con oligomicina  $2.5\text{ }\mu\text{M}$ . La respiración residual (**ROX**) se obtuvo inhibiendo el CI con rotenona  $0.5\text{ }\mu\text{M}$  y el CIII con antimicina  $2.5\text{ }\mu\text{M}$ . El índice de control respiratorio (**RC**) se determinó como el cociente de  $S3/S4o$ , mientras que la respiración asociada a la fosforilación oxidante (**P**) se determinó como  $S3-S4o$  (**Figura 10**) (Aparicio-Trejo *et al.*, 2017; Aparicio-Trejo *et al.*, 2019; Aparicio-Trejo *et al.*, 2020). La velocidad de respiración se expresó en pico mol por segundo por miligramo de proteína [**pmol/(s\*mg)**] y los valores se normalizaron por el total de proteína que se había cuantificado previamente por el método Bradford.



**Figura 10. Esquema representativo de una respirometría de alta resolución.** Se observa la velocidad de consumo de oxígeno asociado a cada estado respiratorio y las adiciones de los sustratos e inhibidores que se utilizaron para obtener cada estado. La



línea azul representa la concentración de oxígeno y la línea roja representa la velocidad de consumo de oxígeno en función del tiempo. En los cuadros azules inferiores están los nombres de los reactivos adicionados secuencialmente: proteína, sustratos e inhibidores. Estado 1 (S1); Estado 2 (S2); Estado 3 (S3); Estado 4 inducido con oligomicina (S4o); Respiración residual (ROX); Fosforilación oxidante (P); Mitocondrias (Mito); Piruvato, Malato, Glutamato (PMG); Succinato más Rotenona (S+R).

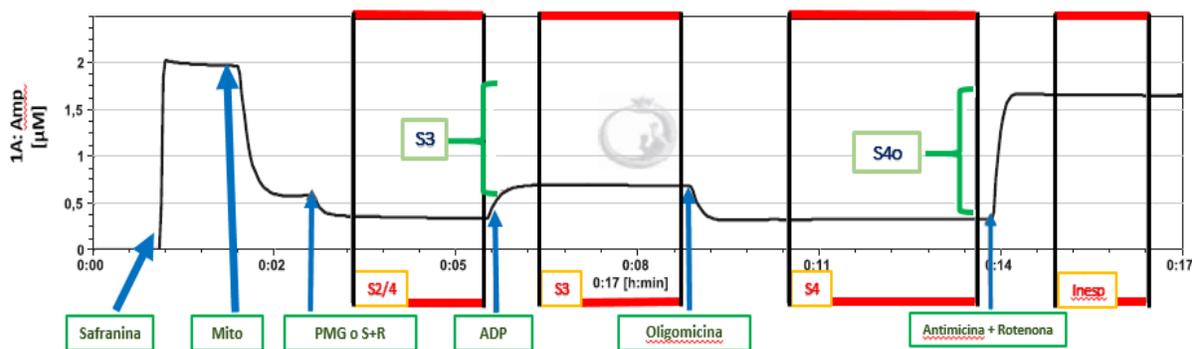
## 8.5 Potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ )

Los cambios en el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) se evaluaron de forma indirecta por fluorimetría, mediante el uso del colorante catiónico lipofílico safranina O 2  $\mu\text{M}$  que es un fluoróforo extrínseco con una longitud de onda de excitación de 495 nm y una longitud de onda de emisión de 587nm (Krumshnabel *et al.*, 2014). La absorción y fluorescencia de la safranina dependió de la activación de las mitocondrias (con los sustratos). Tras la activación de las mitocondrias, se observó que la intensidad de la fluorescencia disminuyó debido al transporte electroforético del colorante desde el compartimento extramitocondrial al intramitocondrial. Una vez en el interior de las mitocondrias la safranina se oligomerizó (se agregó en dímeros y polímeros) y los cambios ópticos que se registraron (incremento o decremento de la intensidad de fluorescencia) fueron reflejo de la distribución de la safranina a través de la MIM (interior negativo). Esta distribución a su vez, dependió del potencial de membrana eléctrico que existía entre el medio externo y el compartimento intra mitocondrial (Krumshnabel *et al.*, 2014; Chowdhury *et al.*, 2015). Por tanto, los valores de fluorescencia que se registraron y que fueron generados por la safranina, fueron inversamente proporcionales al  $\Delta\Psi_m$ : a mayor fluorescencia, menor potencial de membrana y a menor fluorescencia mayor potencial de membrana.

En primer lugar se estimuló la respiración vía CI o vía CII y después se estimularon los estados respiratorios 3 y 4 (como se describió previamente). De esta manera se obtuvieron los potenciales de membrana mitocondrial asociados a ambos estados ( $\Delta\Psi_m$  S3 y  $\Delta\Psi_m$  S4o). Finalmente, se disipó el  $\Delta\Psi_m$  agregando rotenona 0.5  $\mu\text{M}$  (únicamente en la respiración alimentada vía CI) y antimicina 2.5  $\mu\text{M}$  (**Figura 11**) (Aparicio-Trejo *et al.*, 2017; Aparicio-Trejo *et al.*, 2019; Aparicio-Trejo *et al.*, 2020).



La linealidad del ensayo se aseguró realizando curvas de calibración con safranina; los resultados se expresaron como el cambio en la concentración de safranina O ( $\Delta\mu\text{M}$  de SafO) durante S3 o S4o y los valores se normalizaron por miligramo de proteína ( $\Delta\mu\text{M}$  de Saf O/mg de proteína).



**Figura 11. Esquema representativo del uso de safranina O.** Se evaluaron los cambios en el  $\Delta\Psi_m$  en los estados respiratorios S3 y S4o. La línea negra corresponde a la concentración de safranina O que se determina por fluorescencia. En los cuadros verdes inferiores están los nombres de los reactivos adicionados secuencialmente: safranina, proteína, sustratos e inhibidores. Estado 3 (S3); Estado 4 inducido con oligomicina (S4o); Mitocondrias (Mito); Piruvato, Malato, Glutamato (PMG); Succinato más Rotenona (S+R); Inespecífico (Inesp).

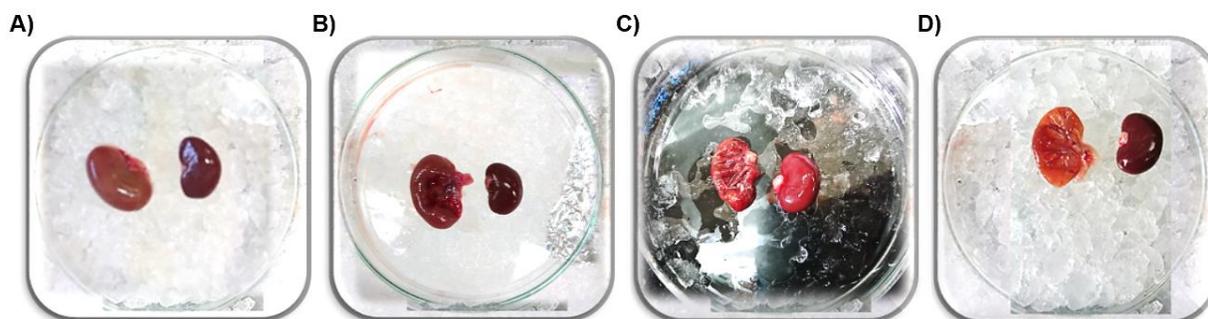
## 8.7 Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido de una prueba de Dunnett. La significancia estadística se definió como  $p < 0.05$ . En todas las gráficas se presenta la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM).



## 9. Resultados

En los días 4, 7, 14, 21 y 28 posteriores a la cirugía, se observó que los riñones obstruidos presentaron distensión (hinchamiento), cambio de coloración e incremento de peso debido a la acumulación de orina (**Figs.12A-12D, izquierda**).

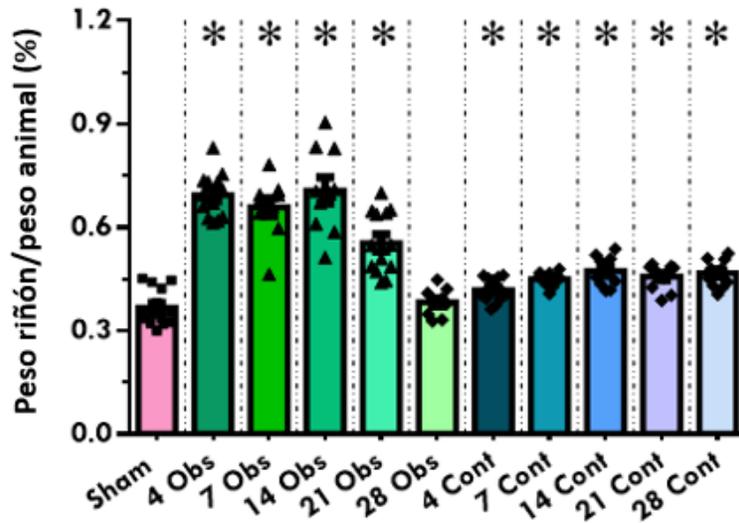


**Figura 12. Imagen representativa de los riñones de ratas con obstrucción unilateral de uréter a diferentes tiempos.** En cada recuadro se observan: el riñón obstruido del lado izquierdo y el riñón contralateral del lado derecho. **(A)** Día 7 de obstrucción, **(B)** día 14 de obstrucción, **(C)** día 21 de obstrucción y **(D)** día 28 de obstrucción.

Desde el día 4 hasta el día 14, el aumento en la relación peso del riñón/peso total del animal se sostuvo y posteriormente se registró una disminución en el resto de los días (**Fig.13, barras verdes**).

En los riñones contralaterales no se observó distensión alguna, ni cambio de coloración (**Figs.12A-12D, derecha**). Sin embargo, se registró un incremento de peso significativo desde el cuarto día posterior a la cirugía (**Fig.13, barras azules**).



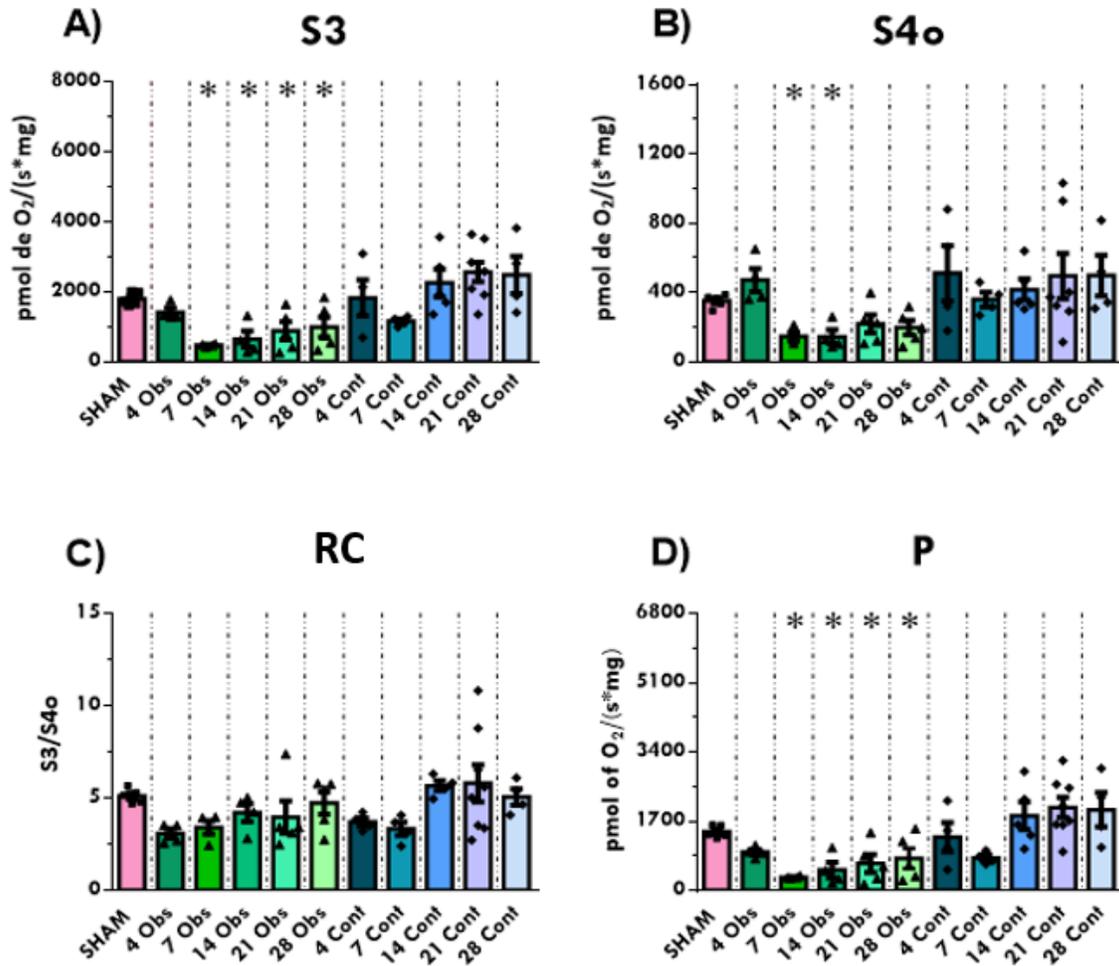


**Figura 13. Peso de los riñones en relación con el peso del animal durante el curso temporal.** Se presentan las barras que corresponden al grupo de riñones Sham (barra rosa), obstruido (Obs, barras verdes) y contralateral (Cont, barras azules) en los días 4, 7, 14, 21 y 28 posteriores a la cirugía de OUU. Los datos se presentan como la media±SEM. n=10-14. Análisis de varianza de una vía. \*p<0.05 vs Sham.

### 9.1 Parámetros respiratorios vía CI

Cuando la respiración se estimuló vía CI (utilizando piruvato, malato y glutamato como sustratos) se observó una disminución significativa en el grupo de riñones con obstrucción (**Fig. 14, barras verdes**), en los parámetros respiratorios S3 (**Fig. 14A**), S4o (**Fig. 14B**) y P (**Fig. 14D**) desde el séptimo día. A pesar de esto, el RC no cambió a lo largo del curso temporal (**Fig. 14C**), lo cual indica que aunque hubo alteraciones durante la obstrucción, las mitocondrias permanecieron acopladas. En cuanto a los parámetros respiratorios de los riñones contralaterales, no se observaron cambios significativos bajo estas condiciones experimentales (**Figs. 14A-14D, barras azules**).





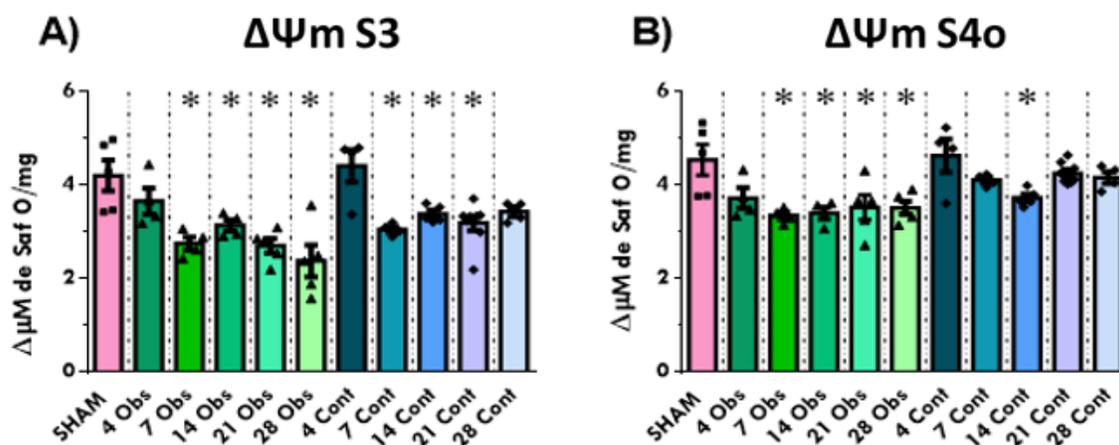
**Figura 14. Parámetros mitocondriales asociados a la respiración vía CI en el modelo de OUU.** Se observa el curso temporal de los grupos obstruido (barras verdes) y contralateral (barras azules) vs el grupo control (barras rosas). **(A)** Estado 3 (S3), **(B)** Estado 4 inducido con oligomicina (S4o), **(C)** Índice de control respiratorio (RC) y **(D)** Respiración asociada a la fosforilación oxidante (P). Los datos se presentan como la media±SEM. n=4-6. Análisis de varianza de una vía. \*p<0.05 vs Sham.

## 9.2 Potenciales de membrana mitocondrial vía CI

Cuando la respiración se estimuló vía CI se observó una disminución en el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) asociado al S3 (**Fig. 15A, barras verdes**) y en el  $\Delta\Psi_m$  asociado a S4o (**Fig. 15B, barras verdes**) en el riñón obstruido a partir del séptimo día, lo cual concuerda con los cambios que se observaron en ambos estados respiratorios.



Por otro lado, se determinó que en el grupo de riñones contralaterales el  $\Delta\Psi_m$  asociado a S3 disminuyó transitoriamente durante los días 7, 14 y 21 (**Fig. 15A, barras azules**), mientras que el  $\Delta\Psi_m$  asociado al S4o (**Fig. 15B, barras azules**) se mantuvo constante en la mayoría de los días, con excepción del día 14. Las variaciones que se observaron en el  $\Delta\Psi_m$  contrastan con los resultados que se obtuvieron en ambos estados respiratorios.



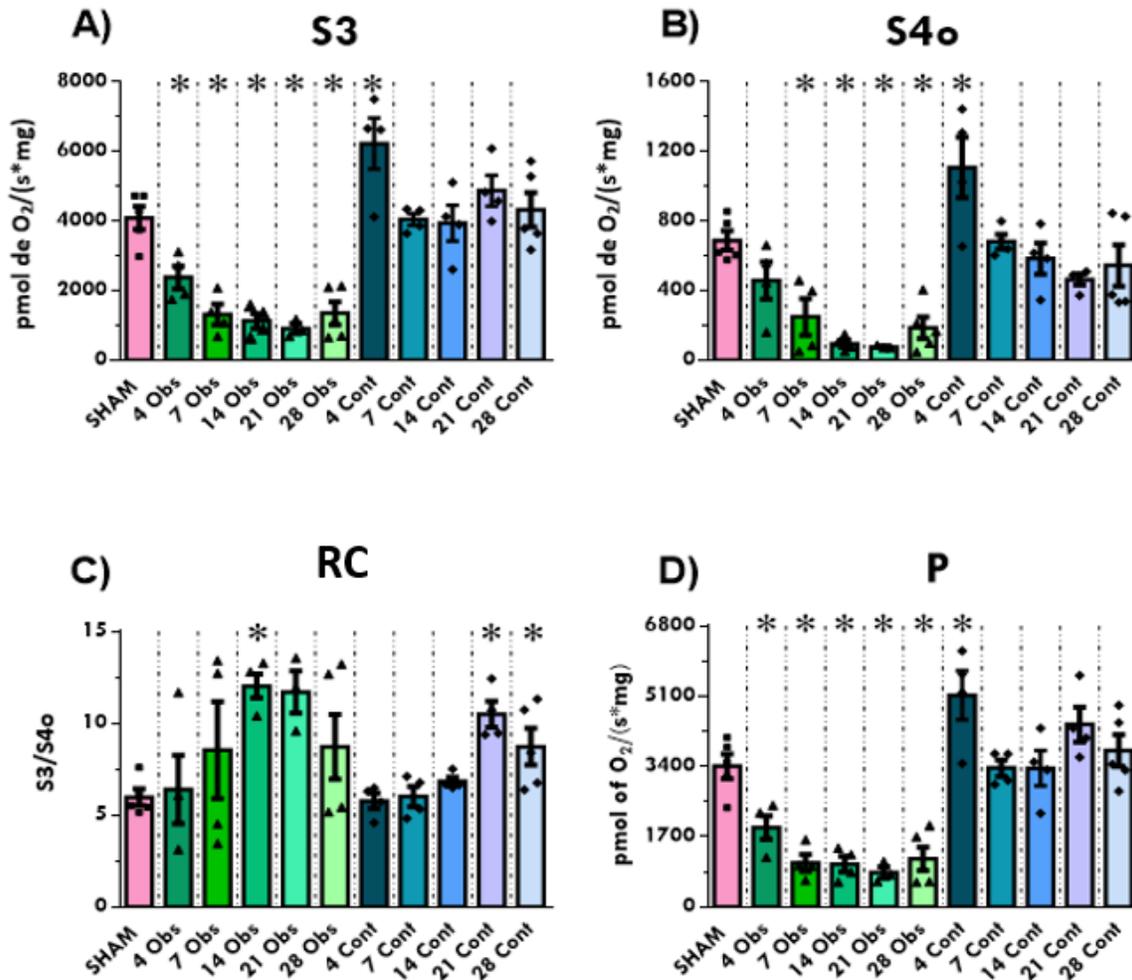
**Figura 15. Potencial de membrana mitocondrial asociado a la respiración vía CI en el modelo de OUU.** Se presenta el curso temporal de los grupos: obstruido (barras verdes) y contralateral (barras azules) vs el grupo control (barras rosas). **(A)** Potencial de membrana en el estado 3 ( $\Delta\Psi_m$  S3), **(B)** Potencial de membrana en el estado 4 inducido con oligomicina ( $\Delta\Psi_m$  S4o). Los datos se presentan como la media  $\pm$ SEM.  $n=4-6$ . Análisis de varianza de una vía. \* $p < 0.05$  vs Sham.

### 9.3 Parámetros respiratorios vía CII

Cuando la respiración se estimuló vía CII (utilizando succinato como sustrato) se observó una disminución progresiva en los parámetros respiratorios S3 (**Fig. 16A**), S4o (**Fig. 16B**) y P (**Fig. 16D**) en el riñón obstruido (**Fig. 16, barras verdes**) desde el cuarto día. Lo anterior contrastó con los valores del RC (**Fig. 16C**) que no presentó cambios significativos, con excepción del incremento que se observó en el día 14, lo cual indica que a pesar los cambios que se registraron en los parámetros respiratorios, las mitocondrias permanecieron acopladas y bastante eficientes. En cuanto al riñón contralateral, se observó durante el cuarto día del curso



temporal un incremento transitorio de los parámetros respiratorios S3, S4o y P y posteriormente no se registraron cambios con respecto al control (**Fig. 16A, B y D, barras azules**). Contrariamente, el RC permaneció sin cambios durante los primeros días e incrementó significativamente durante los últimos días del curso temporal (**Fig. 16C**).

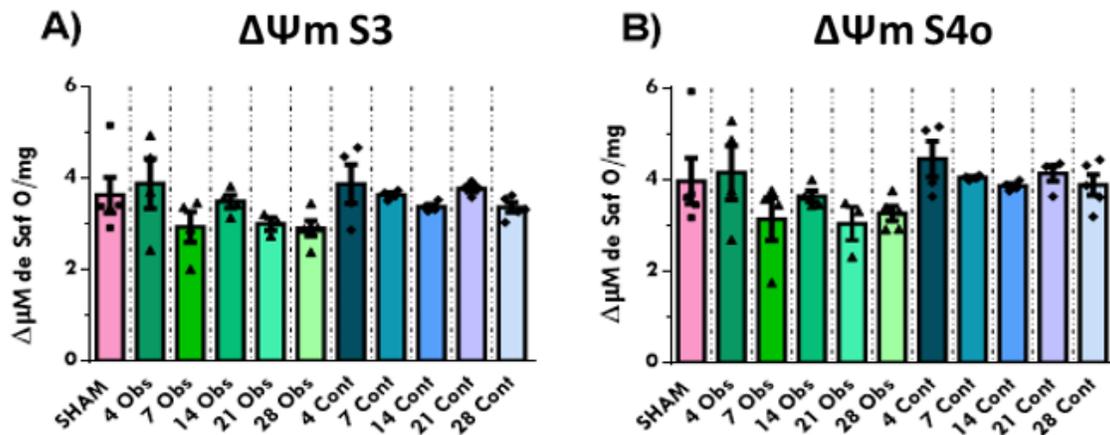


**Figura 16. Parámetros mitocondriales asociados a la respiración vía CII en el modelo de OUU.** Se presenta el curso temporal de los grupos obstruido (barras verdes) y contralateral (barras azules) vs el grupo control (barras rosas). **(A)** Estado 3 (S3), **(B)** Estado 4 inducido con oligomicina (S4o), **(C)** Índice de control respiratorio (RC) y **(D)** Respiración asociada a la fosforilación oxidante (P). Los datos se presentan como la media  $\pm$ SEM. n=4-6. Análisis de varianza de una vía. \*p<0.05 vs Sham.



## 9.4 Potenciales de membrana mitocondrial vía CII

Cuando la respiración se estimuló vía CII se observó que en el riñón obstruido, el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) asociado a S3 (**Fig. 17A, barras verdes**) y el  $\Delta\Psi_m$  asociado a S4o (**Fig. 17B, barras verdes**) se mantuvieron constantes durante los diferentes días de la obstrucción. De igual manera, se observó que en el grupo de riñones contralaterales, el  $\Delta\Psi_m$  asociado a S3 (**Fig. 17A, barras azules**) y el  $\Delta\Psi_m$  asociado a S4o (**Fig. 17B, barras azules**) no presentan cambios significativos en los diferentes días del curso temporal.



**Figura 17. Potencial de membrana mitocondrial asociado a la respiración vía CII en el modelo de OUU.** Se presenta el curso temporal de los grupos: obstruido (barras verdes) y contralateral (barras azules) vs el grupo control (barras rosas). **(A)** Potencial de membrana en el estado 3 ( $\Delta\Psi_m$  S3), **(B)** Potencial de membrana en el estado 4 inducido con oligomicina ( $\Delta\Psi_m$  S4o). Los datos se presentan como la media  $\pm$ SEM.  $n=4-6$ . Análisis de varianza de una vía.  $*p < 0.05$  vs Sham.



## 10. Discusión

Existen diversos modelos experimentales de daño renal que se utilizan para estudiar los cambios que ocurren durante la insuficiencia renal y que conducen al desarrollo de fibrosis. Dentro de los que se utilizan con mayor frecuencia destaca la OUU debido a las ventajas que posee como modelo (Ucero *et al.*, 2014; Martínez-Klimova *et al.*, 2019), algunas de ellas incluyen: su semejanza con la uropatía obstructiva, un problema clínico frecuente; la sencillez del procedimiento quirúrgico; la baja tasa de mortalidad postoperatoria; la posibilidad de elegir el momento, duración y severidad de la obstrucción, que facilita el estudio del daño renal y la transición gradual hacia fibrosis en un periodo relativamente corto (Chevalier *et al.*, 2009; Hesketh *et al.*, 2014).

Acorde con la literatura, se constató que conforme se prolonga el tiempo de obstrucción ureteral, los cambios en el riñón obstruido son cada vez más notables (**Figs.12A-12D, izquierda**). Se observó que desde el cuarto día, el riñón se vuelve más pálido y tenso al tacto debido a la hidronefrosis o dilatación del sistema colector renal producto de la acumulación de orina (Jackson *et al.*, 2018). Hasta el día 14, la hidronefrosis fue sostenida y propició que los riñones aumentaran su tamaño y peso significativamente, posteriormente en los días 21 y 28 se observó que el grado de distensión ocasionó que el parénquima renal se redujera hasta formar bordes delgados (**Figs. 12C-9D, izquierda**) y de bajo peso, que contrastaron con el resto de los días (**Fig. 13, barras verdes**).

En el caso de los riñones contralaterales se determinó que, si bien no hubo hidronefrosis (**Figs.12A-12D, derecha**), el peso incrementó ligeramente a partir del cuarto día posterior a la cirugía de OUU (**Fig. 13, barras azules**). Se propone que lo anterior se debe a una hipertrofia compensatoria que ocurre en respuesta a las alteraciones que acontecen en el riñón obstruido (Paulson & Fraley, 1970; Dicker & Shirley, 1971; Zelman *et al.*, 1983; Chevalier *et al.*, 2000). Asimismo, se plantea que el principal motivo por el que se produce este efecto compensatorio se debe a que las nefronas de los riñones mamíferos no se pueden regenerar. Por consiguiente, cuando disminuye el número de nefronas funcionales y la tasa de filtración glomerular en un riñón o en ambos, las nefronas restantes experimentan cambios anatómicos (hipertrofia) y funcionales (hiperfunción) para compensar la pérdida y preservar a cualquier costo la función renal (Skorecki *et al.*, 2011). Algunas de estas modificaciones incluyen el



aumento del flujo plasmático, variaciones en los sistemas glomerular y tubular e incremento de la tasa de filtración glomerular por nefrona única (Fattah *et al.*, 2019).

En el riñón, las células del túbulo proximal precisan del suministro constante de oxígeno para satisfacer la gran demanda de energía que requiere la reabsorción tubular. Debido a lo anterior estas células requieren de la fosforilación oxidante y de la síntesis de ATP, procesos que se llevan a cabo dentro de la mitocondria; por tanto, dado que la función renal depende en gran medida de la actividad e integridad de las mitocondrias, así como de los procesos que se llevan a cabo dentro de las mismas (Erin *et al.*, 2017; Aparicio-Trejo *et al.*, 2018), se realizó un estudio comparativo y funcional de la bioenergética mitocondrial que permitió dilucidar algunos aspectos del metabolismo renal y los cambios que ocurren durante el daño por obstrucción. La bioenergética de ambos riñones se determinó por respirometría de alta resolución ya que a diferencia de las oximetrías convencionales, es un método mucho más preciso que requiere de una menor concentración de proteína (Gnaiger, 2008). Con esta herramienta se evaluaron los cambios en: (1) el consumo de oxígeno asociado a la fosforilación oxidante (OXPHOS) y (2) la actividad de algunos componentes del sistema de transferencia de electrones. De forma complementaria, se evaluó el potencial de membrana mitocondrial mediante fluorescencia.

De acuerdo con los resultados, después de alimentar la cadena respiratoria vía CI, se observó que en el riñón obstruido disminuye el consumo de oxígeno asociado al S3 en los días 7, 14, 21 y 28 posteriores a la obstrucción (**Fig. 14A, barras verdes**) lo cual indica de manera general que, tanto la respiración asociada a la fosforilación oxidante como la respiración asociada a otros procesos independientes de la fosforilación oxidante, disminuyen durante la obstrucción. De forma general, algunos de los procesos descritos que consumen oxígeno y que son independientes de la fosforilación oxidante incluyen al propio transporte de electrones mitocondrial (acoplado al consumo de oxígeno) ya que éste no es eficiente en su totalidad (ningún proceso lo es), además de reacciones mitocondriales de óxido-reducción (redox) (Herst *et al.*, 2004). En relación con lo anterior, se ha observado que en el modelo de OUU, los niveles proteicos de enzimas antioxidantes mitocondriales tales como catalasa, superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) se reducen (Dendooven *et al.*, 2011; Kaeidi *et al.*, 2020), lo que apunta a un desbalance del equilibrio redox.

Asimismo, después de que se alimentó la cadena respiratoria vía CII, se observó que



disminuyó el consumo de oxígeno asociado al S3 desde el cuarto día posterior a la obstrucción (**Fig. 16A, barras verdes**). Esto indica de manera general, que los cambios en el consumo de oxígeno asociado a la OXPHOS, se presentan con mayor rapidez en la respiración asociada al CII. Lo anterior, posiblemente se debe a la inhibición de CII por la acumulación de su sustrato: succinato. De hecho, Liu y colaboradores observaron que en las semanas 1 y 3 posteriores a la obstrucción, existe un incremento en las concentraciones de este y otros metabolitos provenientes del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) (Liu *et al.*, 2016). En conjunto con nuestros resultados, esto denota que los cambios en el consumo de oxígeno durante la respiración asociada a CII pudiera ser el resultado de la acumulación de succinato proveniente del TCA, mismo que a su vez podría tener efecto directo sobre la actividad del CII mitocondrial.

En cuanto al riñón contralateral, no se observaron cambios en el consumo de oxígeno asociado al S3 durante la respiración alimentada vía CI (**Fig. 14A, barras azules**) sin embargo, vía CII se observó un incremento en el cuarto día (**Fig. 17A, barras azules**). Esto demuestra que en el riñón contralateral la respiración asociada a la fosforilación oxidante se mantiene constante, independientemente del sustrato que se administre. Por otra parte, el incremento que se observó en el día 4, demuestra que las primeras respuestas adaptativas son transitorias y ocurren vía CII.

En general, la respiración mitocondrial opera a un nivel basal que es suficiente para cubrir los requerimientos energéticos diarios. No obstante, dependiendo de las condiciones celulares esta energía debe aumentar o disminuir (Yamamoto *et al.*, 2016). En el caso del riñón contralateral, cuando aumenta la carga de trabajo las células del túbulo proximal deben de filtrar y reabsorber en mayor proporción por lo que la capacidad mitocondrial de dichas células también debe de incrementar para satisfacer los requerimientos de energía adicional y de esta manera evitar una crisis energética por falta de ATP. En este sentido, la capacidad respiratoria de reserva se utiliza para describir la cantidad extra de ATP que se puede producir vía fosforilación oxidante cuando existe un incremento súbito de la demanda energética y se considera un aspecto importante de la función mitocondrial ya que una célula con mayor capacidad respiratoria de reserva puede producir mayor cantidad de ATP y sobreponerse a distintos tipos de estrés. En relación con lo anterior, el CII participa de manera crucial ya que se ha observado que cuando incrementa la oxidación de glucosa y de ácidos grasos, este complejo censa los cambios e incrementa su actividad, además de que es fuente de capacidad respiratoria de reserva (Pfleger *et al.*, 2015). Por consiguiente, es posible que el



incremento transitorio de la actividad de CII que se observa en el día 4, refleje el aumento de la capacidad respiratoria del riñón contralateral en respuesta al incremento en la demanda energética.

En el caso del riñón obstruido, el consumo de oxígeno asociado al leak durante la respiración vía CI disminuye significativamente en los días 7 y 14 posteriores a la obstrucción (**Fig. 14B, barras verdes**), lo cual indica que el consumo de oxígeno no asociado a la síntesis de ATP fue menor durante estos días. De hecho, la fuga total de protones de una mitocondria se atribuye principalmente a dos procesos: el leak pasivo o basal y el leak activo o inducible (Divakaruni & Brand, 2011). Aunque los mecanismos moleculares que generan el leak basal no se conocen con exactitud, se sabe de varios factores que lo modifican, por ejemplo: la superficie de la membrana interna mitocondrial y su composición. En cuanto al leak inducible, se ha descrito que las proteínas desacoplantes (UCP's), un tipo de proteínas específicas de la membrana interna mitocondrial, contribuyen de manera importante al mismo, permitiendo el incremento en la permeabilidad de los protones y contribuyendo de esta manera al aumento de la velocidad de respiración. Por tanto, es posible que la disminución que se observó en el S4o vía CI, esté relacionada en parte, con cambios que ocurren tanto en la morfología de este organelo así como en la actividad de las proteínas mitocondriales relacionadas al leak. De igual manera, en los días 7, 14, 21 y 28 posteriores a la obstrucción, el consumo de oxígeno asociado al S4o vía CII es menor (**Fig. 16B, barras verdes**). Lo anterior, junto con los resultados que se obtuvieron en el S4o vía CI, sugieren la hipótesis de que durante las diferentes etapas del modelo, existen cambios en la estructura y composición de las mitocondrias que se traducen en menor leak o fuga de protones.

En el caso del riñón contralateral, no se observaron cambios en el consumo de oxígeno asociado al S4o durante la respiración alimentada vía CI (**Fig. 14B, barras azules**) y vía CII, con excepción del día 4 (**Fig. 16B, barras azules**).

De acuerdo los resultados, cuando se estimula la respiración vía CI, disminuye el consumo de oxígeno asociado a la P en los días 7, 14, 21 y 28 posteriores a la obstrucción (**Fig. 14D, barras verdes**). De manera similar se observó que, cuando se estimula la respiración vía CII el consumo de oxígeno asociado a la P disminuye progresivamente a partir del cuarto día de obstrucción (**Fig. 16D, barras verdes**). En conjunto, esto indica que en el riñón obstruido disminuye la fosforilación oxidante, siendo la OXPHOS inducida vía CII la más susceptible, ya



que se observaron cambios desde el cuarto día.

En el riñón contralateral no se observaron cambios en el consumo de oxígeno asociado a P durante la respiración alimentada vía CI (**Fig. 14D, barras azules**), sin embargo se observó que vía CII, la OXPHOS incrementó de manera transitoria durante el cuarto día (**Fig. 16D, barras azules**). Lo anterior concuerda con el incremento que se observó durante el S3 y el S4o para esta vía (**Figs. 16A-16B, barras azules**). Dichos resultados sugieren que en el cuarto día existe una respuesta compensatoria ante los cambios metabólicos que ocurren en el riñón obstruido, la cual no es sostenida a lo largo del curso temporal.

De manera interesante, se observó que aunque en el riñón obstruido la respiración asociada a S3, S4o y P, vía CI (**Fig. 14C, barras verdes**) y vía CII (**Fig. 14C, barras verdes**) disminuyó en distintos días de la obstrucción, el RC no disminuyó, lo cual indica que se mantiene el acoplamiento entre el transporte de electrones y la fosforilación oxidante, es decir, no existe desacoplamiento mitocondrial. No obstante, se determinó que el RC de la respiración vía CII incrementa de manera significativa en el día 14, indicativo de que las mitocondrias en este tiempo son altamente eficientes (**Fig. 16C, barras verdes**). Una posible explicación a estos resultados, podría ser la disminución de la masa mitocondrial, pues aunque se observó que la fosforilación oxidante disminuye, la eficiencia de estas mitocondrias no disminuye en los diferentes días. Dicho de otro modo, es posible que el decremento que se observa en la fosforilación oxidante no sea producto de la pérdida en la eficiencia de las mitocondrias (el RC vía CII no cambia e inclusive incrementa en el día 14), sino más bien sea el reflejo de la disminución en el número de mitocondrias que llevan a cabo el proceso.

En el riñón contralateral no se observó ningún cambio en el RC durante la respiración alimentada vía CI (**Fig. 14C, barras azules**), lo cual concuerda con los resultados que se obtuvieron durante S3, S4o y P. No obstante, se observó que en la respiración alimentada vía CII, el acoplamiento entre el transporte de electrones y la fosforilación oxidante incrementa durante los días 21 y 28 (**Fig. 16C, barras azules**). Aunque este incremento indica que existe una mayor eficiencia, esto no se traduce en una mayor síntesis de ATP, pues no se observaron cambios en P con respecto al control. A pesar de que en el intervalo de tiempo que se evaluó no se observaron cambios en los riñones contralaterales, se espera que ocurran en algún punto como respuesta compensatoria a las crecientes demandas de energía que propicia la pérdida funcional de uno de los riñones.



De forma complementaria a los parámetros respiratorios S3 y S4o, se determinó el  $\Delta\Psi_m$  ya que es un excelente indicador de la integridad mitocondrial (Divakaruni & Brand, 2011; Figueira *et al.*, 2012). De acuerdo con el análisis para el grupo de riñones obstruidos, se determinó que vía CI, el  $\Delta\Psi_m$  asociado al S3 disminuye significativamente en los días 7, 14, 21 y 28 posteriores a la obstrucción (**Fig. 15A, barras verdes**). Lo anterior concuerda con los datos que se obtuvieron en los estados respiratorios S3 y P e indica que existe una disminución en la producción de ATP (disminuye P) que no es producto del desacoplamiento (el RC no cambia). Una posible explicación es que, tanto la ATP sintasa, como el número de bombas de protones que contribuyen con el  $\Delta\Psi_m$  (CI, III y IV) se encuentren disminuidos en los diferentes días posteriores a la obstrucción. De hecho, esto concuerda con Nishida *et al.*, (2014) quienes reportaron mediante inmunoréplica tipo western que la expresión de la ATP sintasa y de los complejos mitocondriales (I, II, III y IV) disminuye en el quinto día posterior a la obstrucción.

De manera similar, se observó que el  $\Delta\Psi_m$  asociado a la respiración durante S4o, vía CI disminuye significativamente a partir del séptimo día y permanece disminuido durante los días restantes (**Fig. 15B, barras verdes**). La explicación más probable es que, el  $\Delta\Psi_m$  disminuya a fin de evitar la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ERO) y de esta manera prevenir el aumento de estrés oxidante mitocondrial. De hecho, se puede afirmar que estas mitocondrias se mantienen funcionales aún en las etapas más avanzadas de la obstrucción, ya que el análisis del RC indica que no hubo desacoplamiento mitocondrial. Esto nuevamente reafirma la hipótesis de que los cambios que se observan en la bioenergética, son reflejo de una disminución de la masa mitocondrial que ocurre a consecuencia del daño por obstrucción.

Aunque lo anterior sugiere que durante las diversas etapas de la OUU, el daño asociado a la producción de ERO mitocondriales podría estar disminuido, diversos autores reportan que el estrés oxidante es característico en el modelo (Manucha, 2012; Chevalier *et al.*, 2009; Forbes *et al.*, 2012; Uceró *et al.*, 2014; Martínez-Klimova *et al.*, 2019). Cabe señalar que ambas observaciones no son mutuamente excluyentes, ya que si el  $\Delta\Psi_m$  permanece muy bajo, no sólo disminuye la capacidad para producir ATP (desabasto energético), también disminuye la producción de ERO mitocondriales lo que conlleva al desbalance de la homeóstasis redox y propicia un estado alternativo de estrés denominado “estrés reductor” (Zorova *et al.*, 2018).



Asimismo, es probable que el estrés oxidante que se observa sea debido al decremento de las enzimas que forman parte del sistema de defensa antioxidante y al incremento en la producción de ERO no mitocondriales. En este sentido, se ha reportado que en el día 14 de OUU incrementa la expresión de la NAD(P)H oxidasa (NOX) y disminuye la expresión de las enzimas catalasa y superóxido dismutasa (Hosseinian *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017).

Siguiendo con el análisis para el grupo de riñones obstruidos, se determinó que vía CII,  $\Delta\Psi_m$  S3 (**Fig. 17A, barras verdes**) y el  $\Delta\Psi_m$  S4o (**Fig. 17B, barras verdes**) no disminuyen en ninguno de los días posteriores a la obstrucción. Esto indica que la diferencia de potencial electroquímico que se genera para mantener la fosforilación oxidante y para mantener otros procesos que requieren de energía pero que no implican la síntesis de ATP, se mantienen de alguna manera; se deberá estudiar este mecanismo en el futuro.

En cuanto al riñón contralateral, se determinó que vía CI, el  $\Delta\Psi_m$  asociado al S3 disminuye significativamente en los días 7, 14 y 21 (**Fig. 15A, barras azules**) lo cual indica que, la diferencia de potencial electroquímico generado para la fosforilación oxidante ( $\Delta\Psi_m$  en S3) cambia, aunque no se observen cambios significativos en P ni en RC. De igual manera observamos que con excepción del día 14, el  $\Delta\Psi_m$  asociado al S4o no cambia (**Fig. 15B, barras azules**). Una posible explicación a esto es la presencia de proteínas desacoplantes las cuales generan un “ligero” desacoplamiento que es benéfico y que reduce el  $\Delta\Psi_m$  a niveles en los que se producen cantidades suficientes de ATP, al mismo tiempo que disminuye la producción de ERO mitocondriales (Divakaruni & Brand, 2011; Zorova *et al.*, 2018). Por otra parte, se determinó que vía CII, el  $\Delta\Psi_m$  S3 (**Fig. 17A, barras azules**) y el  $\Delta\Psi_m$  S4o (**Fig. 17B, barras azules**) no cambian.

Lo anterior, en conjunto con los parámetros respiratorios, indica que se requieren más de 28 días para observar alteraciones en la bioenergética mitocondrial del riñón contralateral, esto contrasta con lo que recientemente descubrieron Bianco *et al.*, (2019). De acuerdo con los autores, en el día 14 de OUU se observa que la función mitocondrial y la homeostasis redox de los riñones contralaterales se encuentra deteriorada, no obstante, estas afirmaciones deben tomarse con reserva ya que acuerdo con sus resultados, no observaron cambios en el  $\Delta\Psi_m$  ni en los parámetros respiratorios S3, S4o y RC cuando la respiración es alimentada vía CI.



## 11. Conclusiones

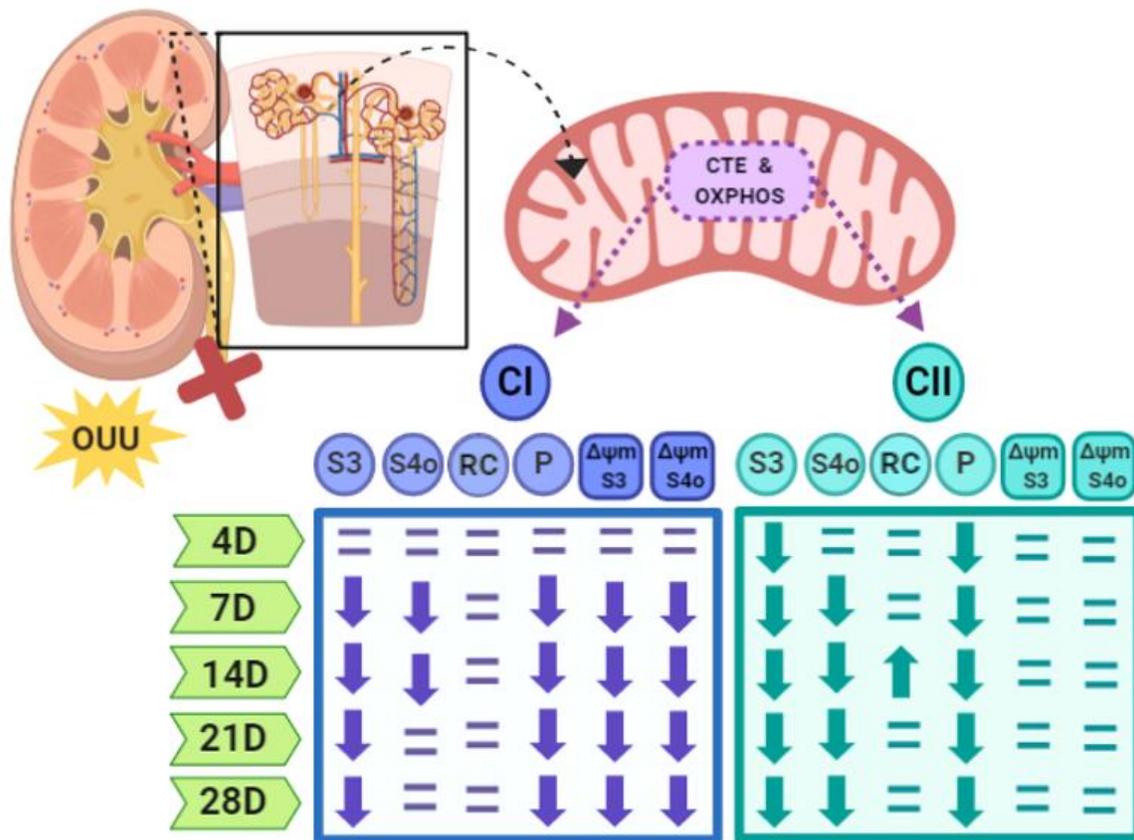
A lo largo del curso temporal, la OUU induce una respuesta diferencial sobre la función mitocondrial de los dos riñones: en el obstruido ocasiona una disminución progresiva de la capacidad de la OXPHOS, la cual no está asociada al desacoplamiento mitocondrial, mientras que en el contralateral no genera alteraciones en la capacidad de la OXPHOS. Sin embargo ocasiona cambios que podrían ser una respuesta adaptativa a la pérdida de la función del riñón obstruido. En el presente estudio se describe por primera vez un modelo de daño renal, el modelo de OUU, en el que las alteraciones mitocondriales no se encuentran asociadas al desacoplamiento mitocondrial.

## 12. Perspectivas

- ❖ Realizar estudios de microscopía electrónica y western blot para dilucidar los mecanismos a través de los cuales disminuye la masa mitocondrial en los riñones obstruidos.
- ❖ Estudiar los cambios que ocurren en la ultraestructura, dinámica mitocondrial de ambos riñones durante el curso temporal.

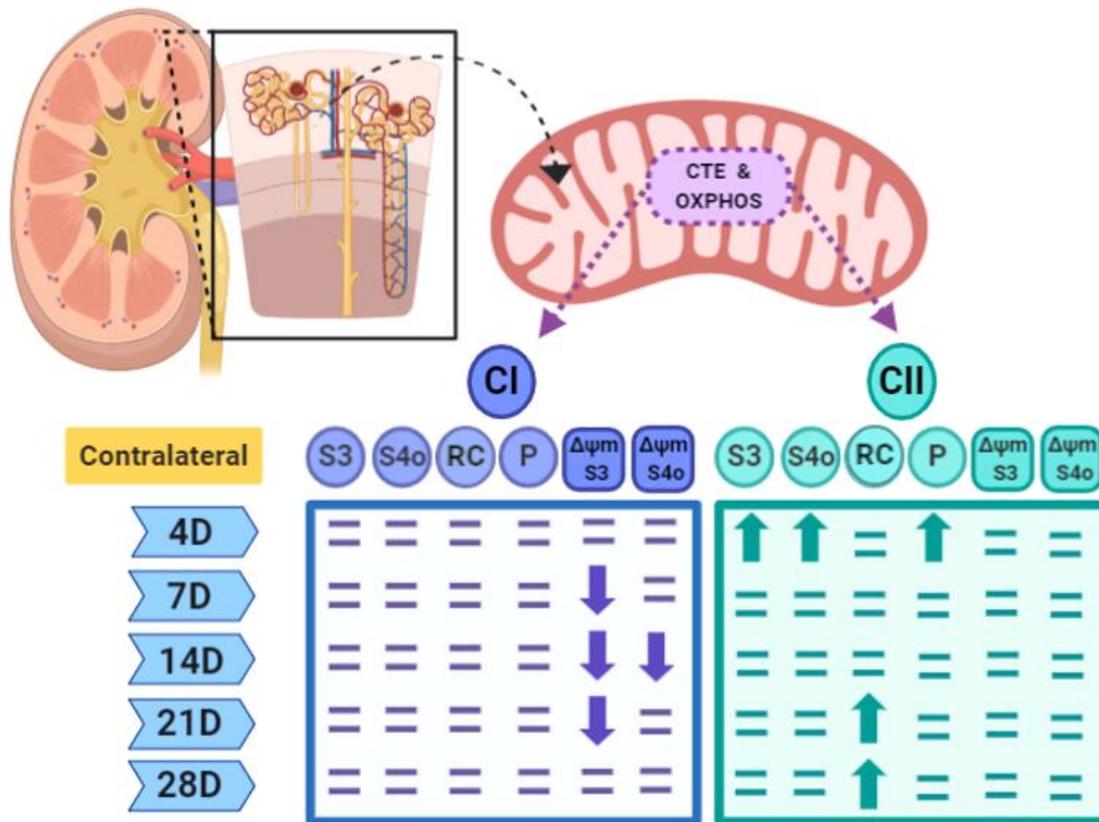


### 13. Esquemas integrativos



**Figura 18. Bioenergética mitocondrial del riñón obstruido en el modelo de OUU.** Se observa que ocurren diversos cambios en los parámetros mitocondriales asociados a la respiración alimentada vía CI y vía CII en los días (D): 4, 7, 14, 21 y 28 posteriores a la obstrucción. Las flechas hacia arriba indican incremento, las flechas hacia abajo indican disminución y el signo de igual indica que no hubo cambios. Obstrucción unilateral de uréter (OUU); Cadena transportadora de electrones (CTE); Fosforilación oxidativa (OXPHOS); Complejo I (CI); Complejo II (CII); Estado 3 (S3); Estado 4 inducido con oligomicina (S4o); Control respiratorio (RC); Potencial de membrana mitocondrial asociado al estado 3 ( $\Delta\Psi_m$  S3); Potencial de membrana mitocondrial asociado al estado 4 inducido con oligomicina ( $\Delta\Psi_m$  S4o).





**Figura 19. Bioenergética mitocondrial del riñón sin obstrucción o contralateral en el modelo de OUU.** Se observa que ocurren pocos cambios en los parámetros mitocondriales asociados a la respiración alimentada vía CI y vía CII en los días (D): 4, 7, 14, 21 y 28 posteriores a la OUU. Las flechas hacia arriba indican incremento, las flechas hacia abajo indican disminución y el signo de igual indica que no hubo cambios. Obstrucción unilateral de uréter (OUU); Cadena transportadora de electrones (CTE); Fosforilación oxidativa (OXPHOS); Complejo I (CI); Complejo II (CII); Estado 3 (S3); Estado 4 inducido con oligomicina (S4o); Control respiratorio (RC); Potencial de membrana mitocondrial asociado al estado 3 ( $\Delta\psi_m$  S3); Potencial de membrana mitocondrial asociado al estado 4 inducido con oligomicina ( $\Delta\psi_m$  S4o).



## 14. Referencias bibliográficas

- ❖ Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts K., Walter P. (2017). *Molecular biology of the cell*, CRC Press, 6th Edition.
- ❖ Aparicio-Trejo O.E., et al. (2017). Curcumin prevents mitochondrial dynamics disturbances in early 5/6 nephrectomy: relation to oxidative stress and mitochondrial bioenergetics, *Biofactors* 43:293–310.
- ❖ Aparicio-Trejo O.E., et al. (2019). Protective effects of N-acetyl-cysteine in mitochondria bioenergetics, oxidative stress, dynamics and S-glutathionylation alterations in acute kidney damage induced by folic acid. *Free Radic Biol Med.* 130:379-396.
- ❖ Aparicio-Trejo OE, Avila-Rojas SH, Tapia E, et al. (2020). Chronic impairment of mitochondrial bioenergetics and beta-oxidation promotes experimental AKI-to-CKD transition induced by folic acid. *Free Radic Biol Med.* 154:18– 32.
- ❖ Baker, N., Patel, J., Khacho, M. (2019). Linking mitochondrial dynamics, cristae remodeling and supercomplex formation: How mitochondrial structure can regulate bioenergetics. *Mitochondrion.* 49, 259-268. doi:10.1016/j.mito.2019.06.003.
- ❖ Bhargava, P. & Schnellmann, R. G. (2017). Mitochondrial energetics in the kidney. *Nat Rev Nephrol.* Oct; 13 (10): 629-646. doi: 10.1038/nrneph.2017.107.
- ❖ Bianco M, Lopes JA, Beiral HJV, et al. (2019). The contralateral kidney presents with impaired mitochondrial functions and disrupted redox homeostasis after 14 days of unilateral ureteral obstruction in mice. doi:10.1371/journal.pone.0218986.
- ❖ Brand, M. D., & Nicholls, D. G. (2011). Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochemical Journal*, 435(2), 297-312.
- ❖ Chowdhury, S., Djordjevic, J., Albeni, B., and Fernyhough, P. (2015). Simultaneous evaluation of substrate-dependent oxygen consumption rates and mitochondrial membrane potential by TMRM and safranin in cortical mitochondria. *Biosci. Rep.* 36, e00286.
- ❖ Clarke Ronald J, Catauro Michelina, Rasmussen Helge H. & Hans-Jürgen Apell (2013). Quantitative calculation of the role of the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in thermogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, Volume 1827, Issue 10, Pages 1205-1212.
- ❖ Chevalier R.L, Thornhill B.A., Chang A.Y. (2000). Unilateral ureteral obstruction in neonatal rats leads to renal insufficiency in adulthood. *Kidney Int*, 58, pp. 1987-1995.



- ❖ Chevalier, R. L. (2006) a. Obstructive nephropathy: towards biomarker discovery and gene therapy. *Nat Clin Pract Nephrol.* Mar; 2(3):157-68.
- ❖ Chevalier, R. L. (2006) b. Pathogenesis of renal injury in obstructive uropathy. *Curr Opin Pediatr.* Apr; 18 (2): 153-60.
- ❖ Chevalier, R. L., et al. (2009). Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. *Kidney Int.* Jun; 75(11):1145-1152. doi: 10.1038/ki.2009.86.
- ❖ Chevalier, R. L. (2012). *Obstructive Uropathy in Nephrology and Fluid/Electrolyte Physiology: Neonatology Questions and Controversies (Second Edition).*
- ❖ Dendooven, A., Ishola, D. A., Jr, Nguyen, T. Q., Van der Giezen, D. M., Kok, R. J., Goldschmeding, R., & Joles, J. A. (2011). Oxidative stress in obstructive nephropathy. *International journal of experimental pathology*, 92(3), 202–210.
- ❖ Dicker, S.E. Shirley D.G. (1971). Mechanism of compensatory renal hypertrophy *J Physiol*, 219, pp. 507-523 <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1971.sp009675>.
- ❖ Divakaruni A.S., Brand M.D. (2011). The regulation and physiology of mitochondrial proton leak, *Physiology*, 26 192-205.
- ❖ Djafarzadeh, S., Jakob, S.M. (2017). High-resolution Respirometry to Assess Mitochondrial Function in Permeabilized and Intact Cells. *J. Vis. Exp.* (120), e54985, doi: 10.3791/54985.
- ❖ Edwards A, Palm F, Layton AT. (2020). A model of mitochondrial O2 consumption and ATP generation in rat proximal tubule cells *Am J Physiol Renal Physiol.* 318: F248- F259.
- ❖ Eirin A, Lerman A, Lerman LO. (2017). The emerging role of mitochondrial targeting in kidney disease. *Handb Exp Pharmacol*; 240: 229–250.
- ❖ Fattah H, Layton A, Vallon V. (2019). How do kidneys adapt to a deficit or loss in nephron number? *Physiology (Bethesda)* 34: 189–197.
- ❖ Figueira T.R., Melo D.R., Vercesi A.E., Castilho R.F. (2012). Safranin as a fluorescent probe for the evaluation of mitochondrial membrane potential in isolated organelles and permeabilized cells *Methods Mol. Biol.*, 810, pp. 103-117.
- ❖ Forbes M.S., et al. (2012). Fight-or-flight: murine unilateral ureteral obstruction causes extensive proximal tubular degeneration, collecting duct dilatation, and minimal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol.* Jul 1; 303(1):F120-9. doi: 10.1152/ajprenal.00110.2012.



- ❖ Gnaiger E (ed) (2007). Mitochondrial pathways and respiratory control. OROBOROS MiPNet, Innsbruck. <http://www.orooboros.at>.
- ❖ Gnaiger E., (2008). Polarographic oxygen sensors, the oxygraph and high-resolution respirometry to assess mitochondrial function. In: Dykens JA, Will Y (eds) Mitochondrial dysfunction in drug-induced toxicity. Wiley, New York, pp 327–352.
- ❖ Herst PM, Tan AS, Scarlett DJ, Berridge MV. (2004) Cell surface oxygen consumption by mitochondrial gene knockout cells. *Biochim Biophys Acta*. Jun 7;1656(2-3):79-87.
- ❖ Hesketh, E.E., Vernon, M.A., Ding, P., Clay, S., Borthwick, G., Conway, B., Hughes, J. A. (2014). Murine Model of Irreversible and Reversible Unilateral Ureteric Obstruction. *J. Vis. Exp.* (94), e52559, doi: 10.3791/52559.
- ❖ Hosseinian, S.; Rad, A.K.; Bideskan, A.E.; Soukhtanloo, M.; Sadeghnia, H.; Shafei, M.N.; Motejadded, F.; Mohebbati, R.; Shahraki, S.; Beheshti, F. (2017). Thymoquinone ameliorates renal damage in unilateral ureteral obstruction in rats. *Pharmacol. Reports*, 69, 648–657.
- ❖ Jackson, L., Woodward, M. & Coward, R, J. (2018). The molecular biology of pelvi-ureteric junction obstruction. *Pediatr Nephrol*, 33:553–571.
- ❖ Jastroch M, Divakaruni AS, Mookerjee S, Treberg JR, Brand MD (2010). Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays Biochem*, 47:53-67.
- ❖ Joshi, D.C. & Bakowska, J.C. (2011). Determination of Mitochondrial Membrane Potential and Reactive Oxygen Species in Live Rat Cortical Neurons. *J. Vis. Exp.* (51), e2704, doi: 10.3791/2704.
- ❖ Kaeidi, A., Taghipour, Z., Allahtavakoli, M. et al. (2020). Ameliorating effect of troxerutin in unilateral ureteral obstruction induced renal oxidative stress, inflammation, and apoptosis in male rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 393, 879–888.
- ❖ Krumschnabel G, Eigentler A, Fasching M, Gnaiger E. (2014). Use of safranin for the assessment of mitochondrial membrane potential by high-resolution respirometry and fluorometry. *Methods Enzymol* 542:163-81.
- ❖ Liu, H., et al. (2016). Mass spectrometry imaging of kidney tissue sections of rat subjected to unilateral ureteral obstruction. *Scientific Reports Volume7*, Article number: 41954.
- ❖ Manucha, W. (2007). Biochemical-molecular markers in unilateral ureteral obstruction. *Biocell*, 31 (1): 1-12.



- ❖ Manucha, W. & Vallés, P. G. (2012). Apoptosis modulated by oxidative stress and inflammation during obstructive nephropathy. *Inflamm Allergy Drug Targets*. Aug 1; 11 (4): 303-12.
- ❖ Martínez-Klimova E., et al. (2019). Unilateral Ureteral Obstruction as a model to investigate fibrosis-attenuating treatments. *Biomolecules*, Apr 8; 9(4). pii: E141. doi: 10.3390/biom9040141.
- ❖ Mårtensson, J. (2019). Renal Energy Consumption and Metabolism. In *Critical Care Nephrology* (pp. 59-64).
- ❖ Nelson, D.L., Lehninger, A.L. & Cox, M.M. (2017). *Lehninger principles of biochemistry*, New York: W.H. Freeman, 7th Edition.
- ❖ Nicholls, DG, y Ferguson, SJ (2013). *Bioenergetics 4*. Academic Press.
- ❖ Nishida H, Kurahashi T, Saito Y, Otsuki N, Kwon M, Ohtake H, et al. (2014). Kidney fibrosis is independent of the amount of ascorbic acid in mice with unilateral ureteral obstruction. *Free Radic Res*; 48 (9):1115–1124.
- ❖ Paulson D.F., Fraley E.E. (1970). Chemical evidence for early but unsustainable growth in the obstructed mouse kidney *Am J Physiol*, 219, pp. 872-875 <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1970.219.4.872>.
- ❖ Perry SW, Norman JP, Barbieri J, Brown EB, Gelbard HA. (2011). Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *BioTechniques*, 50:98–115.
- ❖ Pflieger, J., He, M. & Abdellatif, M. (2015). Mitochondrial complex II is a source of the reserve respiratory capacity that is regulated by metabolic sensors and promotes cell survival. *Cell Death Dis* 6, e1835.
- ❖ Shamakhi, A. F. (2019). Intracellular organelles in health and kidney disease. *Nephrol Ther*. Mar; 15 (1): 9-21. doi: 10.1016/j.nephro.2018.04.002.
- ❖ Skorecki, K., Chertow, G. M., Marsden, P.A., Taal, M. W., Yu, A.S.L. (2011). *Brenner and Rector's: The kidney*, Elsevier Health Sciences Division, 9th edition.
- ❖ Ucero, A. C., et al. (2010). Obstructive renal injury: from fluid mechanics to molecular cell biology. *Open Access J Urol*. Apr 22; 2:41-55.
- ❖ Ucero, A. C., et al. (2014). Unilateral Ureteral Obstruction: beyond obstruction. *Int Urol Nephrol*. Apr; 46(4):765-76. doi: 10.1007/s11255-013-0520-1.
- ❖ Yamamoto, H., Morino, K., Mengistu, L., Ishibashi, T., Kiriya, K., Ikami, T., & Maegawa, H. (2016). Amla Enhances Mitochondrial Spare Respiratory Capacity by Increasing Mitochondrial Biogenesis and Antioxidant Systems in a Murine Skeletal



Muscle Cell Line. Oxidative medicine and cellular longevity, 1735841.

- ❖ Zecher, M., et al. (2009). Implications of oxidative stress in the pathophysiology of obstructive uropathy. *Urol Res* 37: 19.
- ❖ Zelman Si, Zenser TV, Davis BB. (1983). Renal growth in response to unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int* 23:594—598. <https://doi.org/10.1038/ki.1983.63>.
- ❖ Zhang, Y. & Avalos, J. L. (2017). Traditional and novel tools to probe the mitochondrial metabolism in health and disease. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med*, 9, Article e1373.
- ❖ Zhang, Z.H., He, J.Q., Qin, W.W., Zhao, Y.Y., Tan, N.H. (2018). Biomarkers of obstructive nephropathy using a metabolomics approach in rat *Chem. Biol. Interact.*, 296, pp. 229-239.
- ❖ Zhao, R.Z.; Jiang, S.; Zhang, L.; Yu, Z.B. (2019). Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *Int. J. Mol. Med*, 44, 3–15.
- ❖ Zorova, L.D., Popkov, V.A., Plotnikov, E.Y., Silachev, D.N., Pevzner, I.B., Jankauskas, S.S., Babenko, V.A., Zorov, S.D., Balakireva, A.V., Juhaszova, M., Sollott, S.J., Zorov, D.B. (2018). Mitochondrial membrane potential. *Anal. Biochem.* 1–10.

