



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

TESIS:

“LA PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO DE 72 kDa HSP 72 COMO BIOMARCADOR SENSIBLE Y TEMPRANO DE LA NEFROTOXICIDAD INDUCIDA POR CISPLATINO.”

TESIS DE LICENCIATURA PRESENTADA POR:

JUAN CARLOS AGUILAR CARRASCO

PARA OBTENER GRADO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGIA

DIRECTORA DE TESIS: Dra. NORMA ARACELI BOBADILLA SANDOVAL.

Instituto de Investigaciones Biomédicas

ASESOR: M en Bra. MARÍA JUDITH VILLAVICENCIO MACIAS.

MAYO 2015

MÉXICO D.F



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.



Universidad Nacional
Autónoma de
México

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

"ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
PRESENTE.**

Comunico a usted que el alumno **AGUILAR CARRASCO JUAN CARLOS**, con número de cuenta **305305220**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **19 de mayo de 2015** a las **10:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE M. en C. **MARISELA VALDÉS RUIZ**

VOCAL Dra. **NORMA ARACELI BOBADILLA SANDOVAL***

SECRETARIO M. en BRA. **MARÍA JUDITH VILLAVICENCIO MACIAS**

SUPLENTE Dra. **ELIA ROLDÁN REYES**

SUPLENTE M. en C. **LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ**

El título de la tesis que presenta es: **La proteína de choque térmico de 72 kDa HSP 72 como biomarcador sensible y temprano de la nefrotoxicidad inducida por cisplatino.**

Opción de titulación: Tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D. F., a 10 de marzo de 2015

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR

ZARAGOZA
DIRECCIÓN

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
M. en C. **ARMANDO CERVANTES SANDOVAL**
JEFE DE CARRERA

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo se realizó en la Unidad de Fisiología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM y del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” bajo la tutoría de la Dra. Norma Araceli Bobadilla Sandoval.

Este trabajo fue realizado con el apoyo otorgado por el CONACYT a la Dra Norma Bobadilla con el número de registro 101030 y por la UNAM-DGAPA proyecto No IN203412-3 and from the National University of Mexico (to NAB).

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme ser parte de ella.

A la facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

A la **Dra. Norma Bobadilla** por permitirme ser parte del laboratorio, darme una gran enseñanza en lo académico y lo científico.

Al **Dr. Jonatan Barrera Chimal** quien me brindo su conocimiento, tiempo, enseñanza y amistad en la ciencia, así como en la vida personal.

A la **QFB. Rosalba Pérez Villalba** por su asesoría técnica y comentarios durante la realización de este trabajo.

Al **Biól. Cristino Cruz** por sus enseñanzas y ayuda, alentándome en todo momento.

A la **Dra. Victoria Ramírez** por la asesoría en técnicas moleculares.

Durante la realización de mis estudios de licenciatura recibí el nombramiento como Ayudante de Investigador Nacional Nivel III (Dra. Bobadilla) otorgado por el Sistema Nacional de Investigadores –CONACYT NO. de expediente 7497.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres **Adrián y Refugio** gracias por brindarme la vida y por apoyarme en todos mis objetivos, uno de ellos terminar mi carrera ya que sin ustedes esto no hubiera sido posible. Que aunque a veces no les haga caso por qué es más divertido (☺), recuerden que siempre les estaré agradecido de por vida por todo lo que han hecho por mí.

A mis hermanos **Adrián I. y Francisco R.** que han estado conmigo desde que nací gracias por estar conmigo siempre y brindarme su enseñanza y experiencia en esta época y siempre, gracias por su apoyo.

A la **Biól. Laura** por brindarme siempre tu apoyo, respeto y cariño durante la carrera.

A la **Mtra. Ixchel** por darme tu amistad, comprensión y compartir momentos alegres.

A mis grandes amigos **Miguel B., Chema B., Roberto D., Andrés V., Claudia P. y Corina A.** por ayudarme a empezar y terminar la carrera con su amistad.

A mis amigos de la Universidad **Arturo H., José, Daniel H., Susana G., Karla U., Diego M., Carlos C, Brenda C. y Jesús M.** gracias por su amistad y sonrisas durante la Universidad.

Y al trabajo de **Luis R.** por su excelente trabajo.

Y a mis compañeros que se encuentran y estuvieron en el departamento de **Nefrología** por formar un buen equipo para trabajar.

A mis 2 grandes amigos **Cleo y Odin** que aunque ya no se encuentran, me regalaron a mí y la familia grandes momentos de felicidad, siempre los recordare.

ÍNDICE

Resumen	1
Introducción	3
Anatomía de los riñones	4
Corpúsculo renal	5
Túbulos	7
Fisiología renal	10
Principales enfermedades Renales	12
Fisiopatología de la lesión renal aguda (LRA)	15
Clasificación de la lesión renal	19
Problema del diagnóstico de LRA	22
Desarrollo de nuevos marcadores	22
Hsp 72	25
Cisplatino	28
Hipótesis	32
Objetivos	32
Material y método	33
Modelo biológico	33
Primer protocolo	33
Segundo protocolo	33
Tercer protocolo	34
Parámetros fisiológicos y bioquímicos	34
Estudios histopatológicos	35
Cuantificación de daño tubular	35
Técnicas moleculares	36

Análisis estadístico	38
Resultados	39
Discusión	48
Conclusión	51
Bibliografía	52

RESUMEN:

Introducción: El cisplatino es un agente efectivo quimioterápico usado en el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades neoplásicas. Uno de los efectos adversos más importantes del cisplatino es la nefrotoxicidad, la cual resulta del daño epitelial del túbulo renal, que puede manifestarse como una lesión renal aguda. Aproximadamente del 25 al 35% de los pacientes desarrollan daño renal después de una dosis única de cisplatino, lo que en varias situaciones, obliga a una reducción de la dosis o la interrupción del tratamiento, por esta razón su uso se encuentra limitado por la nefrotoxicidad que produce y que muchas veces no es clínicamente detectable en fases tempranas porque no se cuenta con un biomarcador suficientemente efectivo.

Objetivo: Este estudio fue diseñado para evaluar si la excreción urinaria de Hsp 72 es un buen biomarcador para detectar el daño tubular inducido por la administración de una dosis única de cisplatino.

Métodos: Se incluyeron 32 ratas de la cepa Wistar macho con un peso de 250 a 300 g que fueron inyectadas con una dosis única de cisplatino (7.0 mg/Kg i.p.) y se sacrificaron después de 6, 12, 24, 72, 96, 120 y 192 h (n=4). El grupo control solo recibió una inyección de solución salina. Al finalizar el periodo experimental, se registró la tensión arterial media (TAM) y el flujo sanguíneo renal (FSR). Se determinó la depuración de creatinina (CrC), la proteinuria (UprotV) y los niveles urinarios de NGAL, Kim-1 (por ELISA) y Hsp72 por análisis de Western blot.

Conclusiones: La dosis única de cisplatino produjo nefrotoxicidad que se caracterizó por una reducción en la función renal y daño tubular después de 48-h. Ni NGAL, ni la proteinuria fueron capaces de reflejar el daño inducido por el cisplatino. La excreción urinaria de Hsp72 aumentó en forma paralela al daño tubular, siendo significativa a partir de las 48-h. En cambio, el aumento de Kim sólo fue significativo después de 72-h. Nuestros resultados muestran que Hsp72 fue superior a la creatinina en suero, NGAL, y a Kim1 y a la proteinuria, como biomarcador para la detección del daño tubular inducido por cisplatino.

INTRODUCCIÓN:

EMBRIOLOGÍA DE LOS RIÑONES

Durante el desarrollo embrionario se forman tres sistemas renales ligeramente superpuestos que de craneal a caudal son: 1) el *pronefros*, 2) el *mesonefros* y 3) el *metanefros*. El primero de estos sistemas es rudimentario y no funciona, pero sirve como base para la formación de túbulos pronefrales que darán paso a la diferenciación del mesonefros, el segundo puede funcionar durante un breve tiempo al comienzo del período fetal y el tercero es el responsable de formar el riñón (Sadler & Langman, 2007; Smith, Ferrés, & Fernández, 1992).

Al comienzo el *pronefros* está representado por 10 grupos celulares en la región cervical. Al final de la cuarta semana desaparecen dando lugar a los *Mesonefros* que se derivan del mesodermo intermedio, en la cuarta semana aparecen los primeros túbulos excretores que se alargan rápidamente y forman un asa en forma de “S”, adquiere un ovillo que constituye el glomérulo donde la sangre empieza a pasar y retorna hacia las venas mesonefrales. Durante la quinta semana aparece el *metanefros* o *riñón definitivo* que se desarrolla a partir del mesodermo metanéfrico, en ésta etapa existen estructuras llamadas esferas metanefrales que se duplican para tener las unidades filtrantes denominadas nefronas, ya se puede observar un sistema colector desarrollado a partir de la yema uréter al que servirá como sistema excretor (Sadler & Langman, 2007).

Al terminar el desarrollo embrionario se puede clasificar 30 tipos de células distintas. Esta diversidad celular modula diversos procesos fisiológicos complejos; como funciones

endocrinas, regulación de la presión arterial, transporte de solutos y agua, equilibrio ácido-base y eliminación de productos de desecho y metabolitos de fármacos (Harrison & Fauci, 2012).

ANATOMÍA DE LOS RIÑONES

Los riñones son dos órganos excretores que se encuentran en los vertebrados, estos tienen forma de frijol o alubia, estos se encuentran fuera de la cavidad peritoneal en contacto estrecho con la pared abdominal posterior, están orientados en la zona media hacia la columna vertebral.

En cada riñón existe una estructura llamada *hilio* y por cada *hilio* penetra una arteria renal, una vena renal y un nervio y la porción ensanchada del uréter llamada *pelvis renal*. La *pelvis renal* está unida con otras estructuras llamadas *cálices*. Estos actuarán como recipientes colectores de orina, que se eliminarán por los uréteres hasta la vejiga (Eaton C & Pooler P, 2006).

En el riñón se distinguen fácilmente dos secciones denominadas como: la *corteza* y la *médula renal* que se pueden diferenciar a simple vista ya que, la corteza tiene un aspecto granuloso y la médula no, también en la corteza se encuentran la mayoría de las nefronas, mientras que en la médula se encuentran las asas de Henle y la mayor cantidad de los túbulos colectores (Eaton C & Pooler P, 2006)

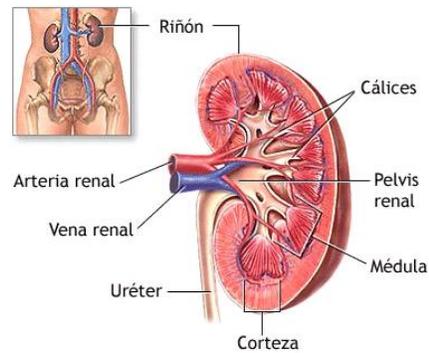


Fig 1. Corte Longitudinal a través del riñón.

Tomado de www.nlm.nih.gov

La unidad funcional del riñón se conoce como nefrona y cada riñón contiene cerca de un millón de nefronas, cada una tiene la capacidad de filtrar y excretar compuestos de desecho para formar la orina. El riñón no pueden regenerar nuevas nefronas y pasados los 40 años de edad, en cada década de la vida, el numero de nefronas funcionales desciende un 10% (Bobadilla, 2005; Guyton & Hall, 2006).

Cada nefrona consta de un componente filtrador esférico, denominado corpúsculo renal, o glomérulo y el epitelio tubular que se extiende desde este último (Thews & Mutschler, 1983).

CORPÚSCULO RENAL

El corpúsculo renal consiste en un mechón compacto de asas capilares interconectadas, conocidas como, glomérulo o capilares glomerulares, rodeado por una cápsula denominada cápsula de Bowman. La sangre entra y sale de la cápsula de Bowman por arteriolas que penetran la superficie de la cápsula a nivel del polo vascular (Thews & Mutschler, 1983).

La sangre que pasa por el glomérulo es filtrada hacia el espacio de Bowman a través de la membrana de filtración glomerular que está compuesta por tres capas: las células endoteliales glomerulares, la membrana basal glomerular y los podocitos. Las células endoteliales tienen numerosos poros, que son tan grandes que casi cualquier cosa más pequeña que un glóbulo rojo puede pasar a través del endotelio. La membrana basal glomerular es más gruesa y está cargada negativamente para repeler a las proteínas. Los podocitos tienen una morfología peculiar, caracterizada por prolongaciones a modo de tentáculos, de las que penden pedicelos ricos en actina, en contacto con la membrana basal glomerular y en donde se forma el diafragma que tiene una apertura menor que el endotelio fenestrado (Bobadilla, 2005).

En promedio la filtración glomerular (FG) en adultos es de 125 ml/min en hombres y 105 ml/min en mujeres, el volumen que pasa por los riñones es de 150 L a 180 L por día. Más del 99% de líquido retorna al plasma por reabsorción en los túbulos por lo que, solo 1 a 2 litros al día son excretados en la orina (Bobadilla, 2005; Thews & Mutschler, 1983).

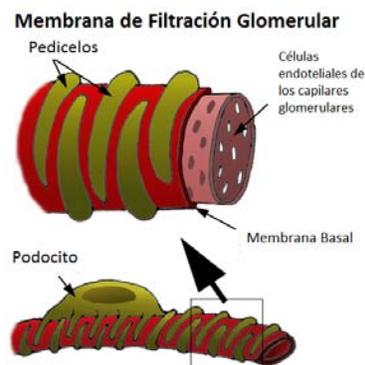


Fig 2. Membrana de filtración glomerular y sus estructuras.

Tomado de KidneyPathology.com

TÚBULOS

La mayor parte de los nutrientes (glucosa, acetato, vitaminas etc.) se filtran por el glomérulo y la mayoría son reabsorbidos en estructuras llamadas *túbulos* estos varían en sus funciones dependiendo de la parte del segmento de un mismo. Son estructuras que están constituidos por una capa sencilla de células epiteliales que descansan sobre una membrana basal tubular.

El epitelio tubular de la nefrona está constituido por el túbulo próxima, que se divide en contorneado y recto, el asa de Henle con los segmentos del asa delgada descendente y ascendente y la rama gruesa, el túbulo distal y por último el túbulo colector a continuación se describen:

El *Túbulo proximal*, inicia en la cápsula de Bowman, es un aparato endocítico que su principal función es reabsorber moléculas que han pasado por el glomérulo, consiste en un segmento enrollado (S1 y S2) seguido por un segmento recto (S3) que desciende hacia la médula en una trayectoria perpendicular en relación con la superficie del riñón. En este túbulo es donde se tiene mayor actividad metabólica, las células que se encuentran en S1 contienen mucho citoplasma, suelen tener un gran número de mitocondrias, tiene un borde en cepillo. El segmento S2 contiene menos células interdigitadas y células en cepillo en comparación al S1. Las células del segmento S3 contiene células cuboidales. En el proceso de absorción están involucrados receptores para algunas hormonas como la GH, PTH, la insulina. Se absorbe un 60 y 70% de agua, puede absorberse por proteínas de membrana llamadas aquaporinas. Otros elementos que se reabsorben son la glucosa, aminoácidos y algunas sustancias como sodio potasio, fosfatos, calcio y carbonatos que se absorben por

endocitos. En el segmento S3 se secretan algunos ácidos, oxalatos y prostaglandinas, es por esto que por medio de transportadores se puede eliminar fármacos y algunos metabolitos del hígado (Borrero, Montero, Vélez, Rojas, & Restrepo, 2003; Guyton & Hall, 2006).

La *Rama del asa de Henle* es un tubo con forma de horquilla y tiene diferentes formas como cortas o largas dependiendo de la parte de la nefrona (corticales o yuxtamedulares), contiene células aplanadas con un núcleo pequeño, los bordes no están ciliados. La rama delgada descendente al estar en la médula renal es más hipertónica por lo que está encargada de absorber un 10% del agua filtrada ya que las células epiteliales se han observado que tienen aquaporinas que ayudan a absorberla. La rama delgada ascendente deja de ser permeable al agua y absorbe cloruro de sodio en forma pasiva. En la parte ascendente gruesa se sigue absorbiendo sodio pero de una forma más activa por medio de un transportador (NaKCC) que transporta un ion de Na^+ y dos de Cl por uno de K^+ pero al estar en menor cantidad el K^+ es recirculado para el transporte del sodio. También en este segmento se secreta una porción de urea igual a la absorbida en el túbulo proximal (Borrero et al., 2003; Eaton C & Pooler P, 2006).

El *Túbulo distal*, también forma parte de la *rama ascendente gruesa del asa de Henle* denominado *túbulo recto distal* que asciende a través de la médula y entra en la corteza en el rayo medular para alcanzar la vecindad de su corpúsculo renal de origen. Después sigue la parte denominada *túbulo contorneado distal*.

Se encuentra localizado en el laberinto cortical, tiene más o menos un tercio de la longitud del túbulo proximal, en este túbulo se vuelve a absorber otro 5% por el proceso de osmosis.

Se siguen absorbiendo Na^+ , y secretando K^+ , pero por otra bomba diferente a la NKCC, se realiza por un transportador sodio cloro. También se excretan algunos iones H^+ , NH_3 , bicarbonatos (Borrero et al., 2003; R, 2003) .

Los *Túbulos colectores y conductos colectores* están compuestos por epitelio simple, con células cilíndricas y se pueden distinguir con facilidad por los límites celulares en el microscopio. Tienen células llamadas “principales” con cantidad abundante de canales acuosos regulados por la hormona antidiurética (HAD), tiene una gran importancia para absorber el agua ya que cuando hay poca HAD la orina se encuentra muy diluida ya que regula aquaporinas de este sitio. El transporte de Na^+ y Cl^- en los túbulos colectores puede ser activo y pasivo dependiendo de la concentración de estos. También el túbulo colector es el encargado de recolectar toda la orina de nefronas adyacentes (Ross & Pawlina, 2007).

La corteza y la médula renal tienen propiedades estructurales y funcionales muy distintas. Cuando se observa más de cerca en un microscopio se encuentra: 1) que la corteza tiene un aspecto muy granuloso, no perceptible en la médula y 2) que cada pirámide medular puede dividirse en una zona externa (adyacente a la corteza) y una zona interna, que incluye la papila. Todas estas distinciones reflejan la distribución de los diversos túbulos y vasos sanguíneos.

FISIOLOGÍA RENAL

1) La función principal del riñón es la formación de la orina, esta se crea a partir de distintos procesos, entre los más importantes son: la degradación de proteínas que da como resultado la formación de urea siendo uno de los componentes más abundantes en la orina (20g por litro). La creación de creatinina que es un derivado de la creatina que es un nutriente necesario para los músculos, los valores van de 2000 mg/día pero se debe tener en cuenta el sexo, edad y la masa muscular del individuo.

Y agua que recibe un 95% algunas sales minerales y ácido úrico.

2) Existen otras sustancias que deben ser eliminadas del organismo que provienen de forma externa, estas moléculas son las hormonas y fármacos que la gran mayoría son degradados por el hígado pero el riñón los degrada por procesos normales que realiza como la filtración glomerular, reabsorción y secreción tubular.

3) Una de las funciones importantes es el intercambio de líquidos, este proceso toma en cuenta la ingesta de líquidos y la excreción. El riñón debe de igualar el equilibrio que va a depender del líquido que se incorpore con el que es secretado, (Guyton & Hall, 2006)

4) Los riñones son órganos importantes en la regulación de la presión arterial a través de regular el volumen sanguíneo por la pérdida o ganancia de agua diaria así como, por la ingesta de sodio. También el riñón puede generar sustancias vasoactivas para

regular la actividad en el musculo liso en los vasos periféricos (Eaton C & Pooler P, 2006; Layton, 2013; Suttorp et al., 2013).

- 5) El riñón es el encargado de la producción de eritropoyetina, una glicoproteína 30 kDa, se sintetiza principalmente en el riñón y es liberada por las células peritubulares en el intersticio renal cortical. Cuando hay reducción de la presión en el tejido renal, o bien un menor aporte de O₂ la eritropoyetina es producida más rápido para compensar la ganancia de falta de O₂. (Ates, Yalcin, Yilmaz, Koken, & Tokyol, 2005; Kowalska-Kańka, Maciejewski, & Niemiec, 2013).

Para que el riñón pueda realizar todas sus funciones es necesario que realicen ciertos procesos básicos:

- 1) El primer paso para la formación de orina es el proceso de *filtración* es el movimiento de la sangre que es llevada por la artería aferente y pasa por la penacho glomerular que se encuentra en la cápsula de Bowman (Bobadilla, 2005; Gal, López, Martín, & Prieto, 2007). Aquí en el glomérulo se filtra la sangre por la membrana de filtración, para formar un filtrado libre de proteínas que pasa al espacio de la cápsula de Bowman y drena dentro del túbulo proximal.
- 2) La mayor parte de lo filtrado es *reabsorbido* cuando se encuentra en los túbulos de la nefrona, este líquido retorna por capilares peritubulares y es regresado a la circulación de la sangre. En el día se filtran 180 L de sangre y solo el 1% conforma la orina (Gal et al., 2007; Ulate, 2007).
- 3) En los túbulos también se da un proceso denominado *secreción* este también se realiza en los túbulos, pero a diferencia de la filtración es un proceso más selectivo ya que utiliza proteínas de membrana para transportar sustancias de desecho. Uno

de estos productos son los iones K^+ y H^+ , estos procesos son importantes para mantener la homeostasis (Gal et al., 2007).

- 4) Por último el proceso de *excreción* que es la eliminación de la orina que se ha producido a través de los procesos anteriores llegando al túbulo colector y recorrerá su camino pasando del cáliz a la pelvis renal, una vez aquí pasa directo a los uréteres que llevara el líquido a la vejiga donde será excretado por un proceso llamado micción que es el vaciado de la orina acumulada, es un acto de reflejo que se desencadena por nervios que se encuentran en esta área (Eaton C & Pooler P, 2006; Thews & Mutschler, 1983; Ulate, 2007).

PRINCIPALES ENFERMEDADES RENALES

Las enfermedades del riñón se encuentran entre las causas de muerte e incapacidad más importantes de muchos países desarrollados y no desarrollados, como consecuencia cada vez es mayor la necesidad de recurrir a tratamientos como diálisis, hemodiálisis o trasplante de riñón para que el paciente pueda seguir con una vida sana (Claire-Del Granado, 2008).

El riñón se encuentra involucrado en muchos procesos patológicos y son estos distintos mecanismos los que se ven involucrados en la disfuncionalidad del riñón. Algunos de estos procesos se encuentran en los:

Mecanismos inmunes que pueden afectar la porción glomerular y tubular,. Específicamente, en el glomérulo, es posible la acumulación en la membrana de filtración de antígenos no renales, esto atrae a los anticuerpos provocando una glomerulonefritis que se caracteriza por que el glomérulo ya no puede filtrar bien. También se puede padecer una pequeña

lesión donde acuden a la reparación células especializadas (neutrófilos, monocitos y macrófagos) los cuales con sus mecanismos pueden liberar sustancias dañinas como H_2O_2 o hacer una reacción alérgica por antígenos provocando reacciones inflamatorias que dañan al riñón (William N. Kelle, 1992).

Los mecanismos inmunes también están implicados en los túbulos, se ha visto que en algunas enfermedades se encuentran inmunoglobulinas que llegan hasta este punto por presentarse glomerulonefritis sugiriendo que es un proceso que se puede hacer crónico (Greenberg, Cheung, Falk, Coffmann, & Jennette, 1994).

Se puede sufrir disfunción renal también por toxinas, estas suelen ser fármacos que llegan a dañar al riñón por que se encuentran diluidos en el agua y al filtrarse empieza a dañar las estructuras, especialmente los túbulos ya que se empiezan a concentrar toxinas en estos segmentos, o también suelen ser fármacos que dañan específicamente células que se encuentran en el riñón (células endoteliales). Los fármacos nefrotóxicos pueden provocar necrosis que depende de la cantidad y el tiempo de administración. Entre estos fármacos se encuentran aminoglucósidos, anfotericina B, los inmunosupresores tacrolimus y ciclosporina, así como, el cisplatino (Calderón-ospina et al., 2011).

Las enfermedades graves del riñón pueden agruparse en dos categorías principales: 1) *la lesión renal aguda*, en la que ocurre una disminución rápida de la función renal, pero que pueden terminar por recuperar la función normal. En algunos estudios se ha visto que en periodos cortos de isquemia (10 min) el riñón puede recuperar su función total, sin embargo a largo plazo los pacientes que han sufrido de este episodio son propensos a desarrollar 2) *la enfermedad renal crónica*, en la que existe una pérdida progresiva del número de

nefronas irreversible donde el riñón ya no puede realizar sus funciones de filtrado y se tienen que realizar diálisis que sirven para extraer metabolitos dañinos para el organismo, y en la mayoría de los casos a largo plazo se necesita un trasplante de órgano para poder que el paciente pueda seguir viviendo (Guyton & Hall, 2006; Li, Burdmann, & Mehta, 2013).

Existen otras lesiones en el riñón que son heredadas, las más conocida es la enfermedad del riñón poliquístico (PKD) (figura 3) que es una enfermedad genética progresiva existen dos tipos: policistina 1 y 2 y que se asocian a la aparición de quistes en el riñón, hígado y páncreas a diferentes edades (Maggard, Makary, Monteiro, & James, 2013).



Fig 3. Riñón poliquístico.

Tomado de www.nlm.nih.gov

Existen otras formas que afectan indirectamente al riñón como, las infecciones en la vejiga. También puede haber lesión uretral que la frecuencia de accidentes se recorre hasta los cálices renales, en éstas lesiones si no se tratan con precaución se puede empezar a necrosar y se puede expandir sobre todo el riñón (Preston, 2000).

Existen otras dificultades como pueden ser las *infecciones* estas se deben principalmente a infección de la vejiga o del uréter que se trasladan a la pelvis renal y contamina todo el riñón. Estas infecciones pueden deberse a bacterias y virus (William N. Kelle, 1992).

FISIOPATOLOGIA DE LA LESION RENAL AGUDA

La lesión renal aguda (LRA) es un síndrome que se desarrolla por la caída abrupta del flujo sanguíneo renal (FSR), lo que ocasiona una reducción de la función del riñón. Esta disminución suele estar acompañada de una reducción en la tasa de filtración glomerular (TFG) y la excreción urinaria. Si en este proceso el FSR disminuye un 20% las células renales entran en hipoxia, ya que no hay un suministro adecuado de oxígeno. Dependiendo del grado del daño se pueden dañar algunos vasos capilares, el endotelio y el epitelio tubular proximal (Layton, 2013).

Una de las estructuras que más sufre daño es el epitelio tubular proximal, específicamente el segmento S3. Esto es debido a que las células del epitelio tubular son altamente metabólicas y susceptibles a cambios ligeros en las concentraciones de oxígeno y ATP, reduciendo principalmente la absorción de los nutrientes como la glucosa, aminoácidos y agua. Además, la hipoxia resultante por la caída del flujo sanguíneo renal modifica la entrada de Ca^{2+} , lo que genera un incremento de la concentración intracelular de este ion, provocando que las células sufran de varias alteraciones en el citoesqueleto, la glucólisis, la cadena respiratoria y la degradación de fosfolípidos (Edelstein, 2000) A nivel estructural se observa la pérdida del borde en cepillo del epitelio tubular proximal, lo que dificulta una buena absorción de glucosa, aminoácidos y algunos iones. En estudios in vivo se ha observado que durante la isquemia, la bomba sodio-potasio

ATPasa disminuye su actividad ya que pierde su localización de la membrana basolateral y es translocada al citoplasma generando pérdida de la polaridad celular (Schrier, Wang, Poole, & Mitra, 2004). El incremento de Ca^{2+} puede activar algunas proteasas dependientes de calcio como la calpaína que realiza la proteólisis de las proteínas del citoesqueleto como los son: la espectrina ankyrina y la actina, esto puede desencadenar la muerte celular y con ello generación de restos celulares o desprendimientos que obstruirán la luz tubular (Edelstein, 2000; Schrier et al., 2004; Sharfuddin & Molitoris, 2011). Dependiendo de la intensidad del daño renal se produce muerte celular ya sea apoptosis o necrosis. La apoptosis puede deberse a la pérdida de procesos celulares como el mantenimiento del citoesqueleto, la disminución en la síntesis ATP y la modificación de ADN. Se ha propuesto que la ruta central de esta muerte en la LRA se debe principalmente al aumento de Ca^{2+} que favorece la pérdida de la actividad enzimática e interrumpe el transporte de electrones en la mitocondria perdiendo su capacidad homeostática, esto induce la formación de un poro en la membrana externa de las mitocondrias que permite la liberación de numerosas proteínas principalmente el citocromo c. Esto activa complejos proteicos como las caspasas, proteasas, nucleasas y lipasas que son esenciales para este proceso. Esta muerte se caracteriza por la fragmentación del ADN generando cuerpos apoptóticos que son fagocitados evitando la inflamación (Lemasters et al., 1998).

La necrosis tiene como características principal: la reducción de tamaño del núcleo, llamada picnosis, seguida de cariorrexis que es el proceso donde se fragmenta el núcleo. Este tipo de muerte se activa cuando la células están más de 20 min en un periodo de hipoxia o cuando se les suministra una alta dosis de un nefrotóxico, lo que induce la expresión de proteínas como: endonucleasas, proteasas y caspasas que evitan que el

contenido citoplasmáticos se escape al exterior y activa la inflamación. (Ueda & Shah, 2000).

Por otro lado se ha observado que el endotelio vascular sufre modificaciones y disfunciones en periodos de daño renal. Esto se desencadena al igual que en el epitelio cuando hay una disminución del FSR y en presencia de hipoxia provocando vasoconstricción, producida principalmente por el incremento de Ca^{2+} intracelular (Basile, 2007; Molitoris & Sutton, 2004).

Este efecto vasoconstrictor es acompañado de una alteración en la permeabilidad en las células endoteliales debido al desarreglo del citoesqueleto en los filamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios, lo que disminuye el transporte paracelular y transcelular desencadenando la acumulación de glóbulos rojos y produciendo que cierta parte de los leucocitos transmigran hacia el epitelio dañado. Se ha observado que las células endoteliales pueden sobre expresar moléculas de adhesión celular (MAC) lo que provoca una atracción de leucocitos en el momento de la reperfusión, que es el proceso donde se restablece nuevamente el FSR a la normalidad (Molitoris & Sutton, 2004; Sharfuddin & Molitoris, 2011).

Estos cambios en el epitelio y en el endotelio liberan proteínas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IFN- γ . Estas citocinas junto a las MAC y selectinas atraen a las células blancas como los neutrófilos y macrófagos, células T y células B en la reperfusión. Estos producirán una respuesta inflamatoria, donde se observan procesos de fagocitosis donde se degradarán productos de restos celulares de los que se habló en necrosis y apoptosis (Akca, Nguyen, & Edelstein, 2009).

El óxido nítrico (NO) es un gas que se ocupa en diversos procesos biológicos, es un modulador del tono vascular, un potente neurotransmisor en la sinapsis central y periférica, regula la presión arterial y media mecanismos inmunológicos. Se ha observado que este gas en bajas concentraciones produce estas funciones, sin embargo cuando es producido en altas concentraciones puede ser citotóxico para las células (Nathan & Xie, 1994).

El NO es sintetizado por la sintasa de óxido nítrico (NOS) de las cuales hay 3 isoformas: la neuronal, inducible y endotelial (nNOS, iNOS, eNOS). Se ha observado que la iNOS es producida principalmente en macrófagos que producen NO e interviene en la muerte de organismos patógenos. Sin embargo la acumulación de macrófagos cuando hay daño en el riñón induce sobreproducción de NO, que en el proceso de reperfusión reacciona con el oxígeno y pueden producir especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS) y radicales libres que son altamente reactivas y pueden producir daños en el ADN, oxidación de ácidos grasos poliinsaturados y de algunos aminoácidos (Bredt & Snyder, 1990; Nathan & Xie, 1994)

Se ha comprobado en experimentos *in vivo* e *in vitro* que las células del riñón pueden regenerarse llegando a recuperar el epitelio y el endotelio que se perdió durante la LRA. En distintos estudios se ha observado que las células que sobreviven pueden proliferar, o también que células troncales derivadas de la médula ósea llegan al riñón a realizar diferenciación celular y a restaurar el tejido dañado y restaurando la funcionalidad de la nefrona y con ella la funcionalidad del riñón. Esto se debe principalmente a la activación de genes para proteínas especializadas, las MAC aparte de atraer a leucocitos sirven para atraer células a regenerar el tejido dañado (Bonventre, 2003).

CLASIFICACIÓN DE LA LESIÓN RENAL

En la actualidad al menos 2 millones de personas al año mueren en el mundo a causa de lesión renal aguda (LRA). Además, se conoce que los pacientes que presentaron esta enfermedad y sobrevivieron están en riesgo de desarrollar enfermedad renal crónica (ERC).

Por lo que la LRA es considerada como un problema de salud pública (Coca, Yusuf, Shlipak, Garg, & Parikh, 2009).

Se ha observado que del 3.2 al 9.6% de los pacientes ingresados en un hospital desarrollarán LRA con una mortalidad tan alta como el 20%, mientras que, la incidencia aumenta a un 50% en las unidades de terapia intensiva. Además, se ha observado que el 5 al 6% de los pacientes que desarrollaron LRA necesitará una terapia de remplazo renal (Lewington, Cerdá, & Mehta, 2013; Li et al., 2013).

Como se mencionó anteriormente la LRA se puede desarrollar por distintos factores, siendo uno de los principales, la disminución de flujo sanguíneo al riñón principalmente por isquemia, sepsis o el uso de agentes nefrotóxicos. Se ha observado que en países en vías de desarrollo también se produce la LRA por deshidratación, diarrea, infecciones como malaria o dengue y a veces por mordeduras de animales venenosos (Li et al., 2013).

En el 2004, el grupo ADQI (Acute Dialysis Quality Initiative) propuso una clasificación denominada RIFLE por sus siglas en Ingles (Risk Injury Failure Loss End-stage renal disease) con el fin de unificar criterios para el diagnóstico, clasificación y prevención de la LRA (Bellomo, Ronco, Kellum, Mehta, & Palevsky, 2004)

En el 2007, el AKIN (por sus siglas en inglés Acute Kidney Injury Network) propuso una nueva clasificación de la LRA tomando como base a la clasificación de RIFLE, estos autores realizaron modificaciones en su nomenclatura proponiendo 3 estadios denominados (I, II, III), que a diferencia de la de RIFLE propone una mayor sensibilidad al momento de realizar el diagnóstico.

Las dos clasificaciones se basan en los cambios de creatinina sérica y del volumen urinario con respecto a los valores basales de cada individuo. En la clasificación de RIFLE se considera el primer estadio o la letra “R” cuando hay un incremento en la creatinina sérica basal de un 50% a valores aproximados de 1.5 a 2.0 mg/dL acompañado por una disminución <0.5 ml/kg/h en el volumen de orina durante las primeras 6 horas de medición o un descenso del 25% en la tasa de filtrado glomerular (TFG).

En el estadio “I” en la clasificación de RIFLE tienen como criterio el incremento en la creatinina sérica en comparación a la basal de 2.0-3.0 mg/dL, o bien <0.5 mL/kg/h en volumen de orina por 12 horas o descenso de TFG en un 50%.

Por último, en el estadio “F” en la clasificación de RIFLE la clasificación cambia cuando se encuentra en un rango >3.0 -5.0 mg/dL con respecto a la creatinina sérica o un volumen <0.3 mL/kg/h en 12 horas clasificándose como oliguria y si este síntoma persiste durante 24 horas se denomina anuria o el descenso de la TFG en un 75%.

En la clasificación de RIFLE se consideran otros 2 estadios “L” y “E” donde se consideran la disfunción renal, ya sea por la elevación de creatinina sérica o la disminución de volumen urinario presente en estadio “F” pero con respecto a la duración de la disfunción, si la disfunción dura semanas corresponde al estadio L y cuando ocurre de 1 a 3 meses

corresponde al estadio “E. En estos dos estadios se sugiere un remplazo de órgano o una terapia de diálisis (Bellomo et al., 2004, Metha et al., 2010, Claire-Del Granado 2008).

En el caso del estadio I de AKIN, el aumento de la creatina es más estricto, siendo una elevación de 0.3 mg/dl o 150%-200% en la elevación basal de la creatinina. Y teniendo una medida menor de 0.5ml/kg/hora en el volumen urinario, haciendo la medición por 6 horas, indicando que hubo un episodio de LRA.

En el estadio II de AKIN se toma en cuenta cuando hay un incremento de la creatinina sérica basal mayor al 200%-300% y teniendo un volumen urinario menor de 0.5 ml/kg/hora en 12 horas.

Por último, el estadio III en AKIN se toma en cuenta una elevación de creatinina sérica mayor que 4.0 mg/dl o una elevación mayor al 300% de creatinina basal. Y un volumen urinario menor a 0.3 ml/kg/hora por 12 o 24 horas.

Actualmente, ambas clasificaciones se usan en los hospitales y permiten el diagnóstico, tratamiento y cuidado de los enfermos que presentan esta enfermedad (Mehta et al., 2007).

Cuadro II. Clasificaciones de la RIFLE y de la AKIN para la lesión renal aguda.			
RIFLE Estadio	AKIN Estadio	Creatinina sérica	Volumen urinario
R Riesgo	1	Incremento en la creatinina sérica 1.5 a 2.0 veces del valor basal	< 0.5 mL/kg por hora x 6
I Lesión	2	Incremento en la creatinina sérica > 2.0 a 3.0 veces del valor basal	< 0.5 mL/kg por hora x 12 h
F Falla	3	Incremento en la creatinina sérica > 3.0 veces del valor basal, o creatinina sérica > 4 mg/dL con un incremento agudo > 0.5 mg/dL, o el inicio de terapia sustitutiva	< 0.3 mL/kg por hora x 24 h o anuria x 12 h
L Pérdida		Falla renal persistente > a 4 semanas	
E Insuficiencia renal terminal		Falla renal persistente > a 3 meses	

Fig 4. Clasificación de RIFLE y AKIN para detectar la lesión renal aguda.

PROBLEMA DEL DIAGNOSTICO DE LRA

Se conoce que los métodos de diagnóstico actuales no son 100% confiables debido a varios factores que se pueden presentar en la práctica clínica, uno de ellos es el volumen de orina pues en algunas ocasiones, cuando el paciente es hospitalizado no se logra obtener la orina basal esto dificulta conocer si hay cambios en el volumen excretado (Cruz, Ricci, & Ronco, 2009).

Otro factor puede ser la medición de creatinina sérica, ya que se ha observado que puede elevarse de forma tardía durante el daño renal, o simplemente que no haya una elevación significativa con respecto al periodo basal. Así mismo se ha descrito que la creatinina sérica está sujeta a diversas variables como el género, la edad y actividad física (Barrera-Chimal & Bobadilla, 2012).

El nitrógeno ureico en la sangre (BUN) al ser un producto del metabolismo no suele ser un buen marcador en la disfuncionalidad del riñón ya que es muy variable. El individuo puede estar bajo tratamiento médico y estos fármacos pueden aumentar los niveles de nitrógeno ureico. O podrían depender del tipo de alimentación que lleve la persona, ya sea alta o baja en proteínas, puede llegar a aumentar o disminuir los productos del metabolismo proteico sin la necesidad de haber una falla renal (Barrera-Chimal & Bobadilla, 2012; Claire-Del Granado, 2008).

DESARROLLO DE NUEVOS MARCADORES

Lo anterior ha propiciado que los investigadores busquen nuevas estrategias para identificar o desarrollar marcadores más precisos, rápidos y sensibles para detectar cuando hay una lesión en el riñón y así poder frenar el daño a tiempo. Estos biomarcadores pueden reportar

la función de la filtración glomerular, la función de los túbulos y el daño que puedan tener (Barrera-Chimal et al., 2011).

Existen nuevos marcadores que se han empezado a utilizar en la práctica clínica con el fin de detectar el daño renal en forma temprana, principalmente en la zona epitelial, algunos de estos son:

Lipocalina Asociada a Gelatinasa de Neutrófilos

La lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL) que es una proteína de 25 kDa y que está unida covalentemente a la gelatinasa de neutrófilos: Se encuentra en concentraciones muy bajas en la orina. Una de las funciones claves por la que se tomó en cuenta como marcador de la LRA es porque está implicada en procesos de inflamación, es sintetizada por granulocitos de la médula ósea, pero suele ser inducida en células epiteliales. En experimentos con ratones sometidos a isquemia se observó su presencia en orina y en tejido renal así mismo en pacientes con LRA (J. Cowland & Borregard, 1997; Trof, Di Maggio, Leemreis, & Groeneveld, 2006).

Molécula de Lesión Renal-1

La molécula de daño renal 1 (Kim-1) es una proteína transmembranal que no se expresa en el tejido renal en condiciones basales y es sobreexpresada durante episodios de isquemia o por administración de fármacos nefrotóxicos, por lo que, es considerada como biomarcador para detectar de la disfunción renal y su progresión. La sobreexpresión de esta proteína se localiza en células de túbulo proximal, específicamente en el segmento S3 donde ocurre la mayoría de las lesiones renales por isquemia o por administración de fármacos nefrotóxicos. Se ha observado que Kim-1 es una proteína altamente conservada desde

ratones y humanos. Es posible determinarla en orina, suero y en tejido renal por distintos métodos como son Western blot o ELISA. Kim-1 es detectable tan tempranamente como, tres horas posteriores al daño en modelos de daño renal (Ichimura et al., 2008; Vaidya et al., 2006).

Proteínas de Choque Térmico

La familia de proteínas de choque térmico (HSP) están presentes en todas las células procariontes y eucariontes, se clasifican por su peso molecular en varias subfamilias su peso molecular varía desde los 10 hasta los 160 kDa divididas en seis subfamilias conocidas como: las Hsp de 100-110 KDa, la de 90 KDa, la de 70 KDa, la de 60 KDa, la de 40 KDa, y la subfamilia de Hsp con peso molecular de 18-30kDa (Walter & Buchner, 2002). El nombre de las proteínas se les asigna debido a que en los primeros experimentos al someter un incremento de temperatura a glándulas salivales de *Drosophila* donde se observaba un abultamiento en el ADN que correspondían a los genes que se necesitan para la síntesis de las HSP. Estudios posteriores han confirmado que no solo se sobreexpresan durante un estrés térmico, también se sobreexpresan en diferentes tipos de estrés como son: exposiciones a sustancias tóxicas, infecciones virales, activación de mecanismos de inflamación, presencia de neoplasias, radiación ionizante, tipos de muerte celular ya sea apoptosis ó necrosis (Coronato et al., 1999; Ritossa, 1962).

En la actualidad no se conocen todas las funciones de estas proteínas, pero se postula que forman parte de un sistema que regula la homeostasis celular inducido por estrés ya sea físico o químico

Hsp72

La estructura molecular de la subfamilia de Hsp70 presenta tres partes: un dominio N-terminal con 44 Kd ATPasa que al hidrolizar un ATP a ADP cambia la forma tridimensional de Hsp70, un dominio de ligandos peptídicos de 18 Kd que sirve para interactuar con otras proteínas ya sea dañadas o que no estén plegadas, y el dominio C-terminal que sirve como tapa para el dominio de sustrato, que al estar desfosforilado el ATP el dominio C-terminal sufre un cambio conformacional para que permita la unión de otras proteínas en el dominio de ligando. Se ha visto que los miembros se expresan en su forma constitutiva e inducible y la gran mayoría de estas proteínas se encuentra intracelularmente (Fan, Lee, & Cyr, 2003).

Esta subfamilia se ha observado que es la más conservada evolutivamente ya que existe en varios organismos además de actuar como chaperona, esto quiere decir que participa en procesos de maduración de otras proteínas celulares, puede servir de transporte, ayuda a la eliminación de proteínas desnaturalizadas.

La principal función de Hsp72 es la de ser chaperona molecular, esto quiere decir que la proteína participa en el plegamiento de las proteínas recién sintetizadas y ayuda a reparar las proteínas que se hayan dañado y pierdan su estructura tridimensional, facilita la degradación de aquellas que tienen un daño irreversible, así mismo se conoce que regula la actividad de otras proteínas, mantienen la estructura del citoesqueleto y participa en la proliferación celular y en la apoptosis (Csermely & Yahara, 1996).

La transcripción de la subfamilia de Hsp70 está regulada por dos factores de transcripción HSF1 y HSF2 que se encuentran unidos a Hsp, cuando la célula sufre algún tipo de estrés

se libera HSF de Hsp y se dirige hacia el núcleo y se une en la región 5' del gen que contiene el elemento promotor denominado (HSE) dando como resultado el ARNm que servirá para sintetizar más Hsp para regular el daño (Carrasco, Sañudo, Martínez, & De Hoyo, 2010).

Se conoce que durante LRA, hay varios mecanismos citoprotectores que son activados para compensar el daño celular resultante; uno de estos mecanismos de compensación es la sobre-expresión de proteínas de choque térmico (Hsp) cuya finalidad es restaurar la homeostasis celular (Beck, Neuhofer, & Müller, 2000).

Hsp72 como biomarcador de lesión renal aguda.

Previamente en nuestro laboratorio, se demostró que la Hsp72 es un biomarcador sensible y temprano de lesión renal aguda inducida por isquemia/reperfusión (Barrera-Chimal et al., 2011). En este estudio se incluyeron ratas sometidas a diferentes periodos de isquemia renal bilateral (de 10 a 60 min). La isquemia es un modelo de LRA donde se impide el flujo sanguíneo a los riñones mediante la colocación de clips no traumáticos en la arteria renal y después del tiempo indicado se retiran para permitir la reperfusión. Como se muestra en la Figura 5 observamos la presencia de Hsp72 en la orina de ratas sometidas a 10 minutos de isquemia y la concentración de esta proteína se incrementó de manera proporcional al periodo de isquemia inducido, siendo detectada la mayor cantidad de Hsp72 en las ratas sometidas a 60 min de isquemia.

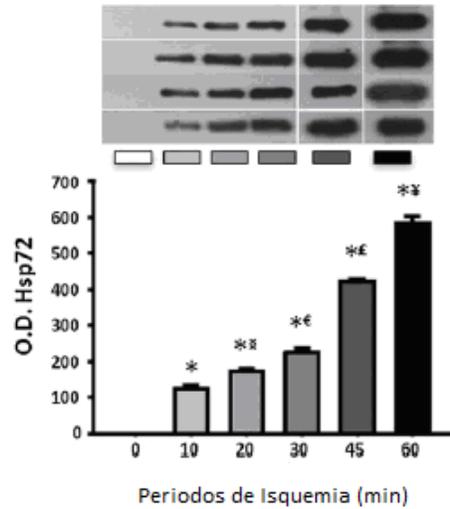


Fig 5. Niveles Urinarios de Hsp72 de ratas sometidas a diferentes periodos de isquemia.

Con el fin de conocer si Hsp72 es un biomarcador temprano de la lesión renal aguda por isquemia se evaluó la presencia de Hsp72 en la orina de los animales sometidos a isquemia desde 3 h de reperfusion y hasta 120 h después. En la figura 6 se muestra el análisis Western blot en orina que reveló que la Hsp72 está prácticamente ausente en los animales controles (sin isquemia), mientras que en los animales sometidos a isquemia, esta proteína se encontró desde las primeras 3 horas, sugiriendo que se trata de un biomarcador temprano de daño renal.

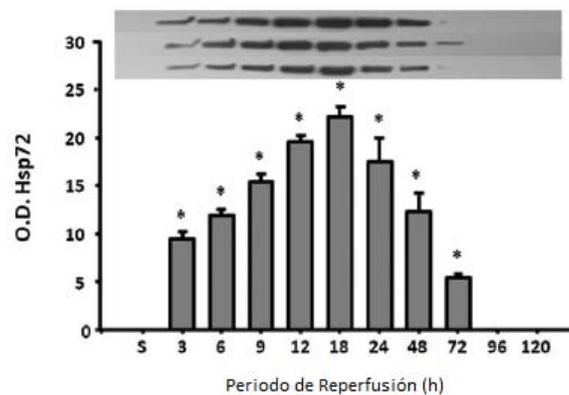


Fig 6. Detección de Hsp 72 en la orina después de inducir isquemia.

En la figura 7 se evaluaron los niveles de Hsp 72 en pacientes con LRA y se compararon con voluntarios sanos, donde se puede observar también que los niveles urinarios de Hsp 72 se incrementan en los pacientes que desarrollaron LRA.



Fig 7. Hsp 72 en pacientes con LRA contra personas sanas

Por lo tanto, nuestros resultados muestran que Hsp 72 es un biomarcador sensible y temprano de LRA inducida por un proceso isquémico

CISPLATINO

El cisplatino (cis-diaminadichloro-platino II) es un fármaco antitumoral potente. Se emplea para el tratamiento de cáncer testicular, los tumores de células germinales de ovario, tumores cerebrales y cuello, cáncer cervical avanzado, cáncer de vejiga, mesotelioma, cáncer de endometrio, melanoma maligno, cáncer de pene, carcinoma adrenocortical y carcinoma primario desconocido (Amptoulach & Tsavaris, 2011; Arany & Safirstein, 2003)

Su administración está limitada principalmente por sus efectos secundarios, a corto plazo. Uno de sus principales efectos secundarios es el desarrollo de nefrotoxicidad, seguido de neurotoxicidad, además de ocasionar daño hepatotóxico, ototoxicidad, alopecia, provocar náuseas y vómitos (Arany & Safirstein, 2003)

Existen fármacos sintetizados como el carboplatino y el oxyplatino que tienen menos efectos dañinos y se ocupan contra el cáncer y se pueden emplear a dosis más altas, pero no

tienen la misma eficacia del cisplatino. Es por eso que el cisplatino es la terapia de elección para los pacientes con cáncer (Amptoulach & Tsavaris, 2011).

En el tratamiento de quimioterapia existen diversos métodos donde se combinan diversos tratamientos un ejemplo de ellos son: doxorubicina, ifosfamida, dacarbazina, ciclofosfamida, taxol solo por mencionar algunas. Esta combinación de compuestos sirve para lograr mayor eficacia en la erradicación del cáncer y así causar los menores efectos secundarios. Es por esto que la dosis de cisplatino en humanos se encuentra limitada entre 50 y 130 mg/m² administrándose vía intravenosa solo o en combinación con otros fármacos como mitomicina, vindesina o simplemente con solución salina para disminuir su nefrotoxicidad (Chen et al., 2013; Leow et al., 2013).

Nefrotoxicidad por cisplatino en la rata

Para inducir nefrotoxicidad por cisplatino en el ratón y la rata se administra una dosis de 20 a 40 mg/Kg y 1.5 a 7.0 mg/Kg respectivamente, esto se debe a que el metabolismo del ratón es más acelerado y puede metabolizar el cisplatino más rápido sufriendo menos daño en comparación al metabolismo de la rata. Estas especies son estudiadas, ya que tienen los mismos efectos secundarios que en los humanos (Lucas et al., 2004; Sinha, Vence, & Salahudeen, 2013)

La nefrotoxicidad por cisplatino se caracteriza por una reducción de la tasa de filtración glomerular (TFG) y caída del flujo sanguíneo renal (FSR), lo que provoca una disminución del volumen urinario. A nivel estructural se observa daño tubular principalmente en los túbulos proximales, además de incrementar la síntesis de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS reaccionan fácilmente con diversas moléculas como lípidos, proteínas y el

ADN provocando citotoxicidad en las células cancerosas, pero también en las células normales (Dobyan, Levi, Jacobs, Kosek, & Weiner, 1980; Nishikawa, Nagatomi, Chang, Sato, & Inoue, 2001)

Se ha observado que si se administran dosis repetidas de cisplatino se induce disminución más rápida de TFG. En la orina se puede observar la presencia de glucosa, pequeñas cantidades de proteínas (proteinuria) y es común ver hipomagnesemia, lo que provoca más daño a las células del epitelio tubular y retarda la recuperación de la función renal (Arany & Safirstein, 2003; Miller, Tadagavadi, Ramesh, & Reeves, 2010)

Los túbulos proximales y distales son las estructuras que se más se afectan durante la administración de cisplatino, mientras que el glomérulo no parece sufrir daño. Esto se puede deber a que el cisplatino entra en las células tubulares por difusión y por transportadores de cationes orgánicos (OCT). Existen tres isoformas de OCT pero se ha visto que las isoformas OCT2 y la OCT3 se encuentran mayormente expresadas en los segmentos S2 y S3 del túbulo proximal, por lo que inducen que se altere en mayor medida este segmento de la nefrona.

Al administrar el cisplatino, uno de los cloros de la molécula se une al agua extracelular del organismo, por lo que facilita al ion platino a unirse a las purinas del ADN de las células. Esto daña al ADN y dispara varias vías de reparación, arresto del ciclo celular y con ello que se produzca muerte celular. El platino también se puede unir al ADN de la mitocondria cambiando las vías normales del organelo, principalmente la captación de Ca^{2+} que desregula la respiración y síntesis de ATP, lo que también puede provocar muerte por

apoptosis o generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Batista P & Da Cunha J, 2012).

Se ha observado que la proteína p53 se sobreexpresa en cultivos celulares, ratones y en personas después de la administración de cisplatino. Esto se debe principalmente a que el cisplatino daña al ADN, puede producir óxido nítrico y genera que haya un periodo de hipoxia en las células. El p53 se ha visto que se acumula principalmente en la mitocondria, PUMA interacciona con BAX que sufre un cambio conformacional haciendo huecos a la membrana de la mitocondria para liberar citocromo C que activará otras moléculas, principalmente la caspasa 3 lo que provocará como desenlace una muerte celular (Jiang & Dong, 2008).

HIPÓTESIS:

Sí la proteína de choque térmico de 72 kDa es un biomarcador sensible y temprano de lesión renal aguda inducida por isquemia, entonces esta proteína será un buen biomarcador para detectar eficientemente la nefrotoxicidad inducida por cisplatino en la rata.

OBJETIVOS:

General:

Evaluar si la proteína de choque térmico de 72kda (Hsp 72) es un biomarcador temprano de la nefrotoxicidad inducida por cisplatino en la rata.

Particulares:

1. Evaluar el efecto de la administración de cisplatino sobre la función renal y sus parámetros como presión arterial media, flujo sanguíneo, depuración de creatinina y creatinina en suero y medir la proteína excretada.
2. Determinar mediante un análisis histopatológico las zonas de la nefrona (corteza y médula) afectadas por el uso de cisplatino en cortes histológicos de riñón.
3. Estudiar si la administración de cisplatino provoca cambios en la expresión de Hsp72 en la corteza y en la médula renal.
4. Determinar la concentración urinaria de Hsp72 en ratas sometidas a tratamiento con cisplatino.
5. Comparar el comportamiento de la elevación de la creatinina en el suero con respecto al comportamiento en la concentración de Hsp 72 en la orina de los animales con nefrotoxicidad por cisplatino para ver si hsp 72 es un buen biomarcador renal.

MATERIAL Y MÉTODO:

Modelo Biológico: Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso entre 250 a 300g, sometidas a fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad y con una alimentación estándar de roedor y acceso libre a agua.

Las ratas al momento de suministrarles el cisplatino fueron colocadas en jaulas metabólicas donde tenían libre acceso de agua.

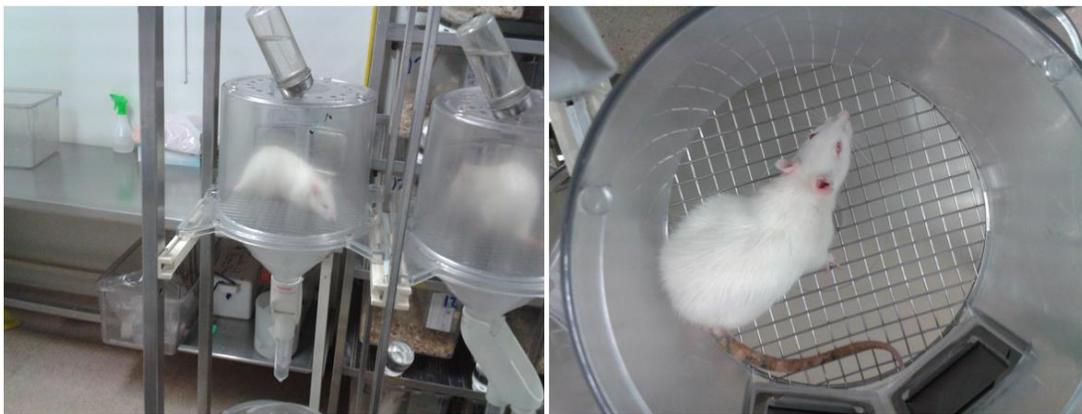


Fig 8. Rata en una jaula metabólica, una vez colocada se retira después de 24 horas.

El estudio se dividió en 3 protocolos diferentes:

Estudios preliminares, primer protocolo: fue para determinar la dosis de cisplatino que induce la mayor sobreexpresión de Hsp 72. Para ello, se formaron 4 grupos, constituidos de 2 ratas Wistar macho. Se le suministró una dosis única de cisplatino de 1.75, 3.5, 7.0 mg/ml/i.p. y al último grupo se le inyectó solo solución salina 3.5 ml/i.p y se usó como grupo control. Se determinó la dosis que indujo mayor disfunción renal, para lo cual se recolectó la orina a las 24, 48 y 72 h después de cada uno de los tratamientos.

Segundo protocolo: decidimos utilizar las dosis de 3.5 y 7.0 mg/ml y se amplió el periodo de recolección desde 8, hasta 120 horas para ver el comportamiento de Hsp 72 en la

nefrotoxicidad inducida por cisplatino. Se ocuparon 24 ratas para este protocolo, 12 para el grupo de 3.5 y 12 para el grupo de 7.0 mg/ml

Tercer protocolo: se utilizó la dosis única de 7.0 mg/ml, estandarizando el periodo de recolección 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120h. Se midió la presión arterial media, el flujo sanguíneo renal, la creatinina sérica y la depuración de creatinina. Se utilizando 32 ratas, de las cuales se ocuparon 4 ratas para formar el grupo control, 4 para el grupo de 6 horas etc.

Parámetros Fisiológicos: Las ratas fueron anestesiadas con una inyección intraperitoneal de pentobarbital de sodio (30 mg/kg), manteniendo el cuerpo del animal sobre una mesa térmica manteniendo la temperatura a 37°C. Durante el experimento se registró la tensión arterial media PAM para ello se realizó una incisión inguinal para disecar la arteria femoral, posteriormente fue cateterizada con un tubo de polietileno (P50) donde se registró la PAM mediante un transductor acoplado a un polígrafo de GRASS. Después de 20 min de registrar la TAM se realizó una incisión media con la finalidad de registrar el flujo sanguíneo renal (FSR) para ello se disecó la arteria renal y se colocó una sonda de ultrasonido acoplada a un flujómetro marca Transonyc. El FSR se monitoreo por 30 min más. Los resultados de PAM y FSR son presentados como el promedio de todas las mediciones.

Parámetros bioquímicos:

Creatinina: Se tomaron 80 µl de muestra de sangre para medir creatinina sérica y se determinó la creatinina en la orina en un Synchron CX5 PRO de Beckman Coulter Incorporation.

El riñón izquierdo se utilizó para los estudios histopatológicos y en el riñón derecho se realizó un corte sagital que se dividió macroscópicamente en la corteza y en la médula renal

y los tejidos se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C para las técnicas moleculares.

Se determinó la concentración de creatinina en suero y en orina con el fin de calcular la depuración en creatinina con la fórmula $C = (U \times V) / P$ donde U es la concentración de creatinina en orina, V es el volumen de excreción de orina y P es la concentración de creatinina en suero.

Proteinuria: La excreción urinaria de proteínas se determinó por el método colorimétrico con precipitación de proteínas con ácido tricloroacético TCA, que al ser un ácido y las proteínas al tener una carga negativa se interacciona proteína-ácido y se desnaturaliza, el producto se precipita y este puede cuantificarse. Se realiza una curva de calibración de albumina donde se mide absorbancia vs concentración, se toma la muestra en orina y se mide su absorbancia y se interpola y se halla la concentración.

Estudios Histopatológicos.

Una vez registrada la TAM y FSR el riñón izquierdo se perfundió a través de arteria femoral con buffer de fosfatos pH 7.4 y posterior fijación con formalina al 4% para realizar tinción de PAS (periodic acid-Schiff), este contiene ácido peryódico que oxida a los azúcares que contienen los tejidos, creando una ruptura en uniones en el tejido y creando grupos aldehídos, posteriormente se coloca un reactivo llamado Schiff que reacciona con los grupos aldehídos dando una coloración púrpura.

Cuantificación de daño tubular

Una vez realizada la tinción se tomaron microfotografías de los portaobjetos con parte del tejido y la tinción PAS, empleando una cámara digital incorporada en un microscopio de luz Nikon. Donde se ocupó un objetivo de 40X para tomar 10 campos de la corteza renal de

cada uno de los animales de estudio. Estos campos tenían que tener la característica de tener un glomérulo para verificar que era una foto de corteza.

Se cuantifico el área de daño tubular mediante el software Eclipse NRT. Considerando como túbulos dañados aquellos en los que estaba presente la pérdida del borde en cepillo, el lumen dilatado y el desprendimiento del núcleo la membrana basal.

Técnicas Moleculares:

El riñón derecho fue ligado y separado macroscópicamente en corteza y médula, se criogenizo -80°C para su procesamiento posterior.

Detección de Hsp 72 en Orina y Riñón: Cada corteza renal se homogenizó en buffer de lisis (50mM HEPES pH 7.4, 250 mM NaCl, 5mM EDTA, 0.1% NP-40 e inhibidor de proteasas (ROCHE). Las muestras se colocaron en un gel de electroforesis de poliacrilamida 8.5% y se transfirió en membranas de fluoruro de polivinilo a 9 volts por 1h.

Para la detección de Hsp 72 en orina por Western blot la orina se diluyó en solución salina 1:10, ocupando 1µL de orina y 9 µL de solución salina, el gel para el Western blot fue de poliacrilamida al 8.5% y las proteínas se transfirieron en membranas de fluoruro de polivinilo 9 volts.

Las membranas fueron bloqueadas en leche a 5% e incubadas con un anticuerpo monoclonal anti-Hsp 72 mouse (Enzo Life Sciences) con una dilución 1:5000 en 0.1% con leche a 4°C toda la noche.

Después de la incubación se hicieron 3 lavados con TBS tween 1:10 y se volvió a incubar con el anticuerpo secundario IgG-HRP goat anti-mouse (Santa Cruz Bitechology) con una dilución 1: 5000 a temperatura ambiente durante 90 min.

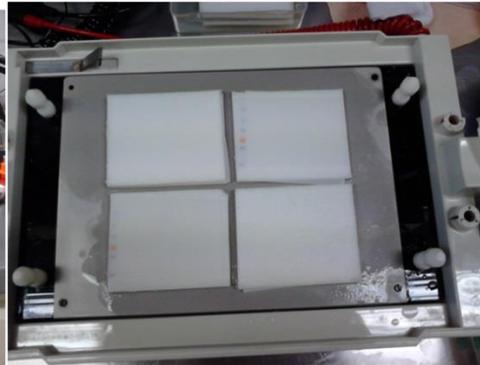
En el caso de los tejidos, se ocupó el mismo anticuerpo y el mismo método para detectar Hsp 72, pero al mismo tiempo la parte inferior de la membrana se incubo con el anticuerpo

para detectar actina también, con una disolución 1:5000 incubado a 4°C toda la noche con una concentración 0.1% con un agente bloqueante leche (BIORAD) Y para evitar errores por diferencias de carga se utilizó el anticuerpo primario policlonal anti- β -actina (Santa Cruz Biatechnology), se dejó durante la noche a 4°C. Al día siguiente las membranas fueron lavadas 3 veces cada 10 minutos con TBS-T y se incubaron con el anticuerpo secundario IgG-HRP donkey anti-goat (Santa Cruz Biatechnology) en temperatura ambiente 90 min. Las membranas con anticuerpos secundarios fueron lavadas 6 veces con PBS Tween. Las proteínas fueron detectadas con un kit de quimioluminiscencia (MILLIPORE).

A)



B)



C)



Fig 9. Técnica de Western Blot que incluye electroforesis en gel de acrilamida (A). Electrotransferencia de un gel a una membrana de nitrocelulosa (B). Colocación de anticuerpo primario a la nitrocelulosa (C).

Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA): Se utilizó un kit comercial para kim-1 (CosmoBIO Co CSB-E08808r) y NGAL (Innovative Research IRNGALKT) donde se siguieron los pasos del kit. El kit contiene una placa de ELISA con un anticuerpo específico para Kim-1 y NGAL, se agregó la orina a los pocillos de la placa y se puso en agitación para la unión de la proteína y el anticuerpo. Se realizaron algunos lavados, para tener mayor especificidad en la muestra y se colocó otro anticuerpo secundario que tiene una peroxidasa de rábano (HRP) que junto a un sustrato determinó un cambio de color que se mide por espectrofotometría a una longitud de 450 nm. Las concentraciones obtenidas por kim-1 y NGAL se determinan mediante la comparación de una curva estándar que trae el kit.

Análisis Estadístico: Las gráficas que se presentan se realizaron con el programa Sigma Plot 10.0 y se presentan como el promedio de los datos \pm el error estándar, y se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con el test de Bonferroni con el programa GraphPad Prism 3.0 que nos permite hacer comparaciones múltiples con un grado de significancia de $p < 0.05$.

RESULTADOS:

De acuerdo a los resultados obtenidos en el primer protocolo, al analizar las orinas de ratas con la técnica de Western blot con anticuerpos específicos para la proteína Hsp 72, se encontró que en las orinas de las ratas tratadas con cisplatino aparecía una banda de 72 kDa correspondiente a Hsp 72. En la figura 10 se muestra la fotografía de la placa radiográfica del análisis por Western blot donde se pueden apreciar que las bandas de mayor excreción urinaria de Hsp72 se ven en las ratas que recibieron 3.5 y 7.0 mg/kg de cisplatino.

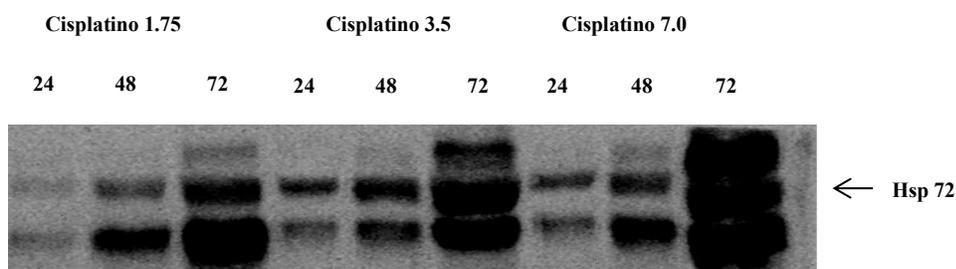


Fig 10. Niveles urinarios de la proteína de Hsp 72 por Western blot en las dosis de 1.75, 3.5 y 7.0 mg/kg con periodos de recolección de 24, 48 y 72 h después de la administración de cisplatino.

De acuerdo a los resultados anteriores, se decidió evaluar y ampliar el periodo experimental de 8, 24, 48, 72, 96, y 120 h para analizar el comportamiento de la excreción urinaria de Hsp 72. Y se encontró que la mayor cantidad de Hsp72 se encontraba en las orinas de las ratas que fueron administradas con la dosis de 3.5 y 7.0 mg siendo mayor después de 48, 72 y 96 h después de la administración de cisplatino y observándose una reducción de Hsp 72 a las 120 h. (ver figura 11)

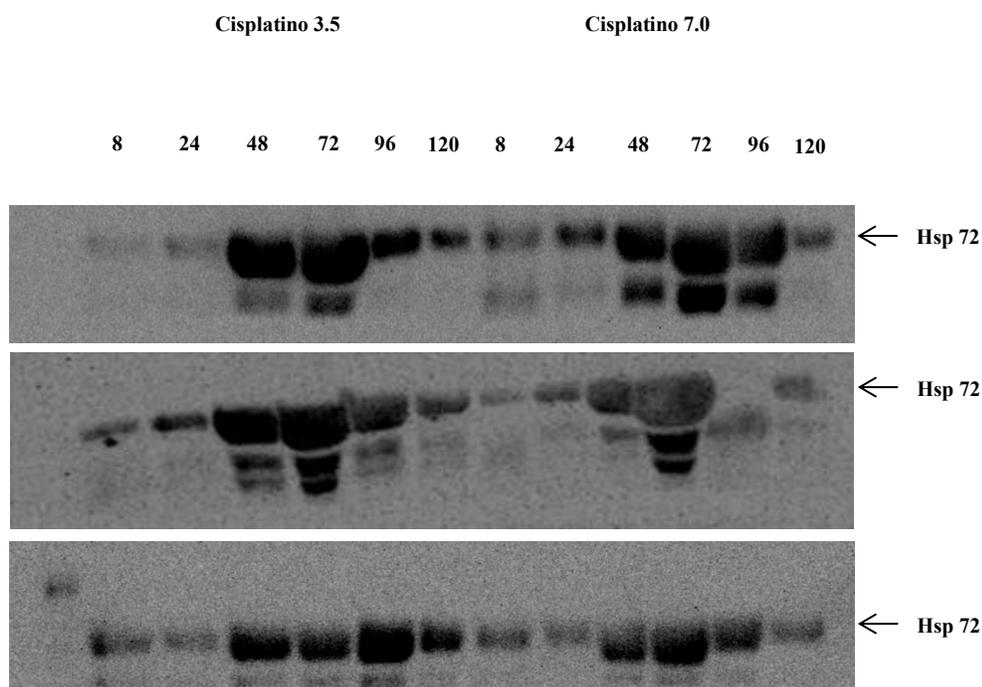
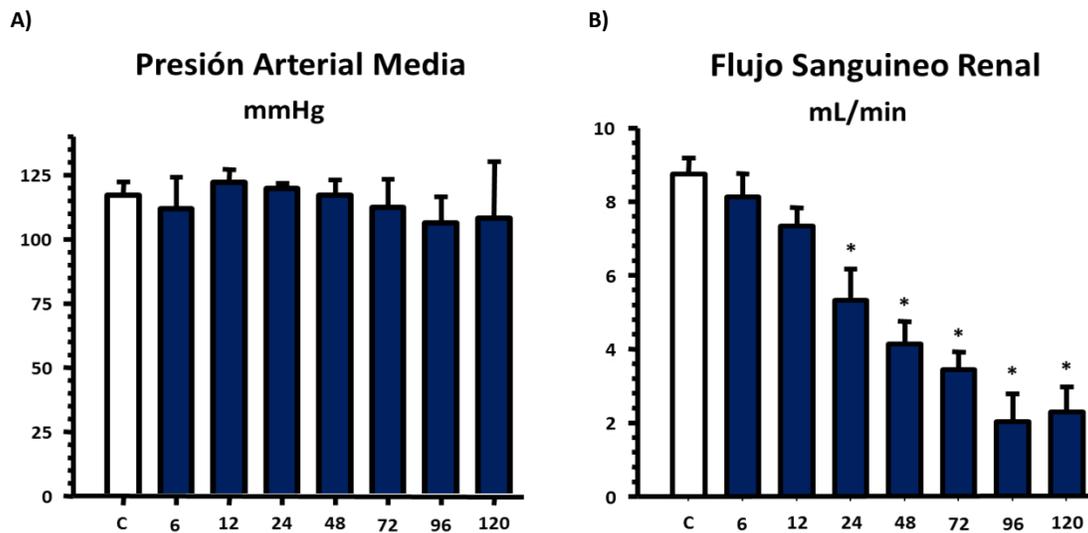


Fig 11. Niveles urinarios de la proteína de Hsp 72 por western blot en las dosis de 3.5 y 7.0mg/kg con periodos de recolección de 8, 24, 48, 72, 96, 120 horas después de la administración de cisplatino con una n= 6 ratas

Dentro de los resultados obtenidos en el segundo protocolo (arriba mencionado), al observar que no existía una diferencia en el comportamiento de Hsp72 entre las dos dosis utilizadas de cisplatino, se decidió llevar a cabo todos los experimentos con la dosis alta y estudiar su correlación con el daño histológico.

Los resultados del tercer protocolo aparecen en la Figura 12, en donde aparecen determinaciones fisiológicas como la presión arterial media, el flujo sanguíneo renal, la creatinina sérica, la depuración de creatinina y la proteinuria a las 6, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 h después de administrar el cisplatino en la comparación con el grupo control que solo se le administró solución salina. Se encontró que, los niveles de presión arterial media fueron similares en todos los grupos de estudio, es decir la administración de cisplatino no

modificó este parámetro (figura 12A). Una característica de la nefrotoxicidad producida por cisplatino es la reducción del flujo sanguíneo renal seguido de una disminución de filtrado glomerular que se asocia con necrosis y otros padecimientos que se van agudizando, esto se observa claramente en la Figura 12B que desde las 24 horas después de la administración de cisplatino hay una reducción progresiva del FSR. Esta reducción del FSR se asoció con una reducción de la función renal que fue significativa a partir de las 48 h de haber administrado el cisplatino. De forma tal que observamos una elevación de la creatinina sérica (Figura 12C) y una reducción de la depuración de creatinina (Figura 12D). En la figura 12E) aparece la proteinuria, en donde no observamos diferencia en la excreción urinaria de proteínas que se encuentra en un rango normal.



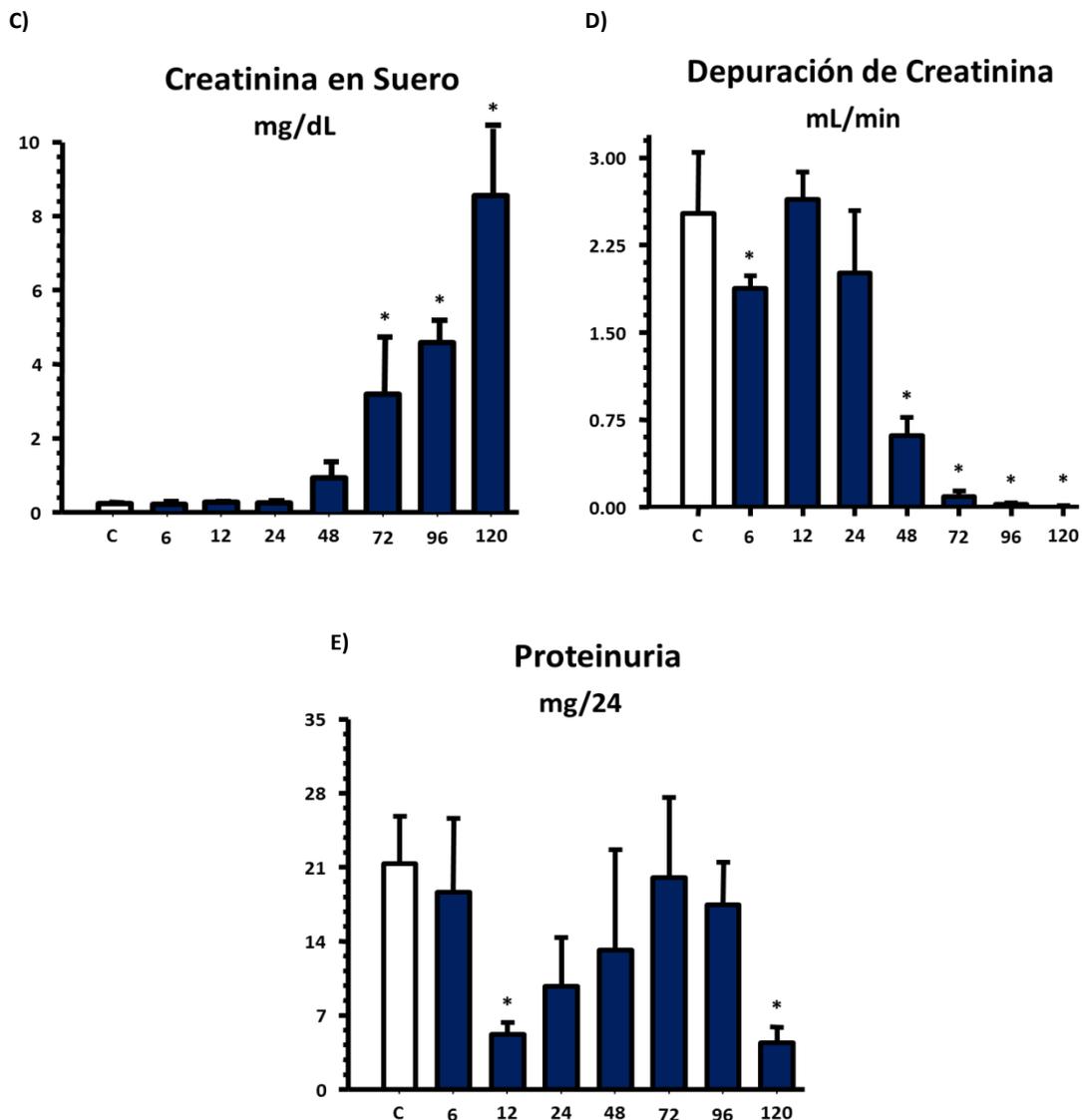


Fig 12. Parámetros fisiológicos para medir la función renal A) PAM, B) FSR C) Creat. S., D) Dep. Creat., E) Proteinuria a las 6, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 horas con el grupo control con la administración de 7.0mg/kg de cisplatino. * $p < 0.05$ vs. Grupo control.

En cuanto al estudio histopatológico, la microfotografía de la Figura 13A representa una imagen representativa del grupo control, en donde se pueden percibir con flechas azules un túbulo normal, en ella las características que se pueden observar son la diferencia entre las

membranas apical y baso lateral, estructuras uniformes y se aprecia que los núcleos se encuentran dentro de las células del epitelio tubular.

Se puede ver que en las imágenes que representan(13B-13D) 6, 12, 24 horas no hay un cambio estructural visible distinto con respecto al grupo control y todas estas imágenes son muy parecidas ya que no hay tanto daño y se distinguen los distintos tipos de túbulos que se encuentran en el riñón. Sin embargo en la imagen 13E) a las 24h. El daño empieza a ser más visible ya que la mayoría de túbulos han perdido el borde en cepillo lo que perjudica en la reabsorción de agua e iones.

En las imágenes de la 13E a la 13H se encuentra (flechas rojas) el daño que sufren los túbulos caracterizado por el desprendimiento de núcleos de las células, el daño va siendo mayor y se puede ver una atrofia tubular y cuando existe un daño irreparable se encuentra la presencia de necrosis.

Para las 72h en la imagen 13F) después de la administración de cisplatino, se observó que algunos núcleos de las células se empiezan a desprender y se pueden observar en la parte apical del túbulo, lo que dejan de ser funcionales.

En la figura 13G y 13H a las 96 y 120h se observó el mayor daño histológico, al verse claramente que existe una hipertrofia en la mayoría de los túbulos, las células presentan necrosis por todos los restos celulares que se encuentran en el lado apical de los túbulos.

De acuerdo a lo reportado en otros trabajos, los principales túbulos afectados por cisplatino son los túbulos proximales, pero los resultados demuestran también que dependiendo del tiempo puede afectar otros túbulos. Tomando en cuenta que este es el daño real que existe en los riñones se puede decir, que la proteinuria no sirve como marcador para ayudar a cuantificar el daño producido por cisplatino.

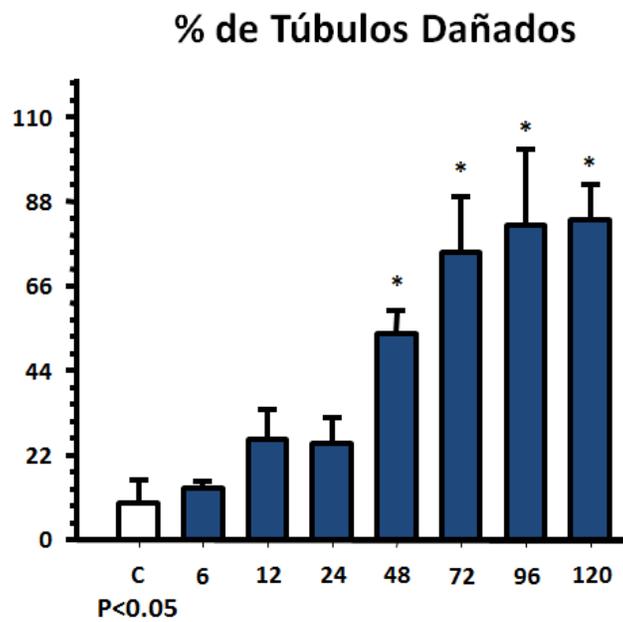
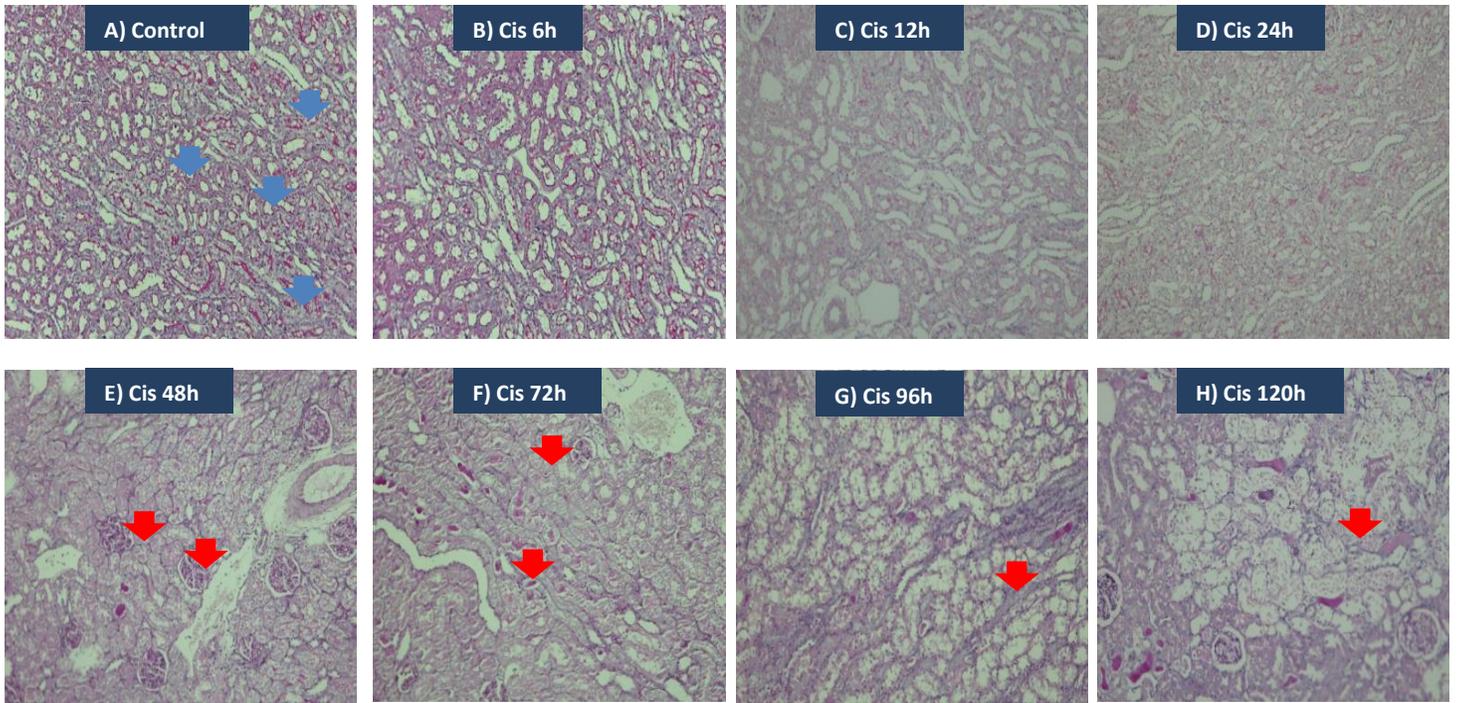


Fig 13. A-H Microfotografías representativas de cortes histológicos de riñón del grupo control y de las ratas tratadas con cisplatino después de 6, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 h, respectivamente. (I) Cuantificación del porcentaje de túbulos dañados. *p<0.05 vs. Grupo control.

Encontrando que en la figura 14A) la densitometría es sacada del Western blot 14B) donde al medir la expresión de Hsp 72 en la orina de las ratas administradas con cisplatino, se puede ver un pequeño aumento de Hsp a las 6 h y se normaliza a las 12 y 24 h existiendo un pico de sobreexpresión a las 48 72 y 96 h. A las 120 h en 2 animales disminuye Hsp 72, y en los otros 2 se mantiene igual que a las 96 h. Esto indica que Hsp 72 detecta el daño más rápido que la proteinuria que son métodos convencionales para medir cuando existe lesión renal.

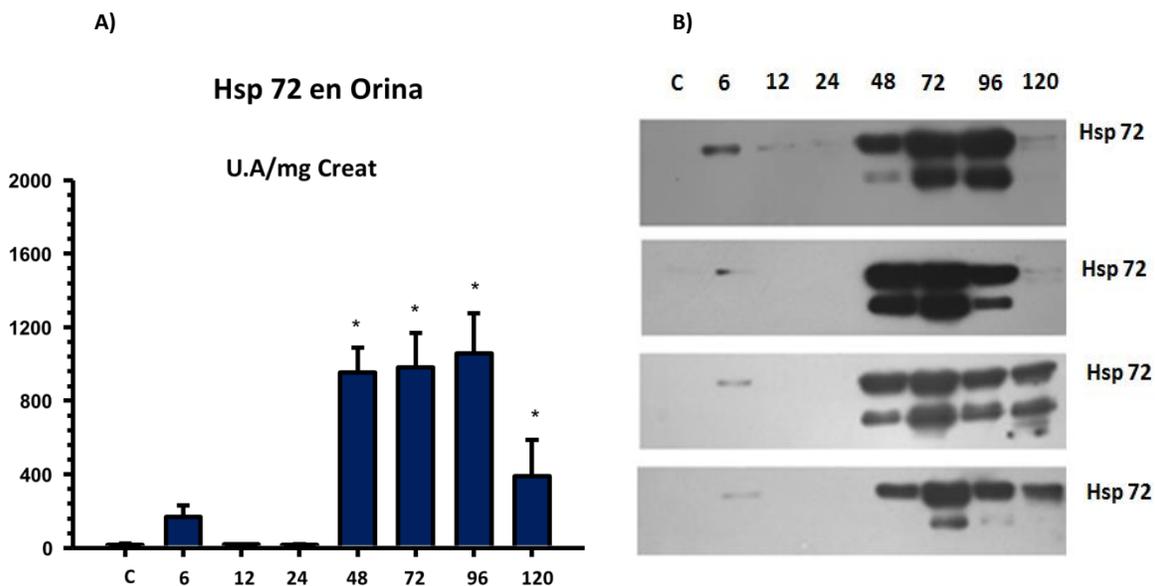


Fig. 14. Análisis de Western blot de Hsp72 en la corteza renal. A) Representación gráfica de la densitometría de las B) placas autorradiográficas. Que se realizó en 4 ratas de cada periodo experimental y se compararon con 4 ratas control (C)* $p < 0.05$ vs. Grupo control.

También realizamos un Western blot para detectar Hsp 72 en el tejido de la corteza e identificar como se comportaba la expresión de Hsp72 en el tejido renal frente al daño por cisplatino como se muestra en la Figura 15. El análisis de Western blot y la densitometría de corteza renal mostró que Hsp72 se expresa en forma normal y que en los animales que

recibieron cisplatino, la cantidad de Hsp72 tendió a aumentar, sin embargo la diferencia no fue estadísticamente

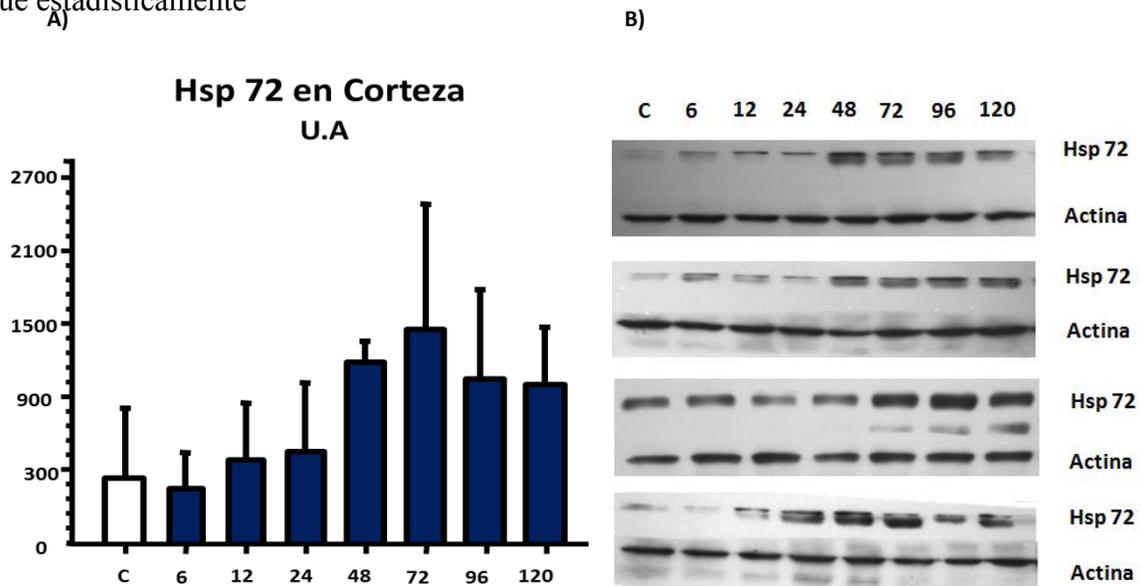


Fig. 15. Análisis de Western blot de Hsp72 en la corteza renal. A) Representación gráfica de la densitometría de las B) placas autoradiográficas. El análisis se llevó acabo al menos en 4 ratas. * $p < 0.05$ vs. Grupo control.

Despues de observar el comportamiento Hsp 72, decidimos comparar nuestros resultados con otros dos biomarcadores comerciales Kim-1 y NGAL que se detecatron por medio de un análisis de ELISA. En la Figura 16 aparecen los resultados de la excreción urinaria de Kim-1, en donde se puede apreciar que este biomarcador se elevó hasta las 72 y 96 horas después de la administración de cisplatino.

Molécula de Daño Renal-1

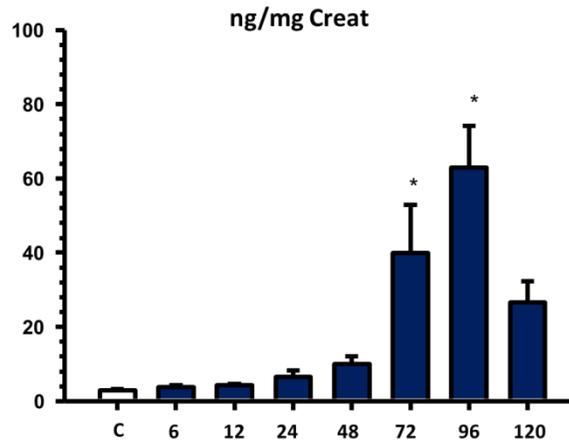


Fig. 16. Excreción urinaria de Kim-1 por el método de ELISA * $p < 0.05$ vs. Grupo control.

Como se aprecia en la Figura 17, aunque se observó un incremento en la excreción urinaria de NGAL a partir de las 48 h de la administración de cisplatino, solo fue estadísticamente significativa esta diferencia hasta las 120 horas después de la administración del fármaco.

Lipocalina Asociada a Gelatinasa de Neutrofilos

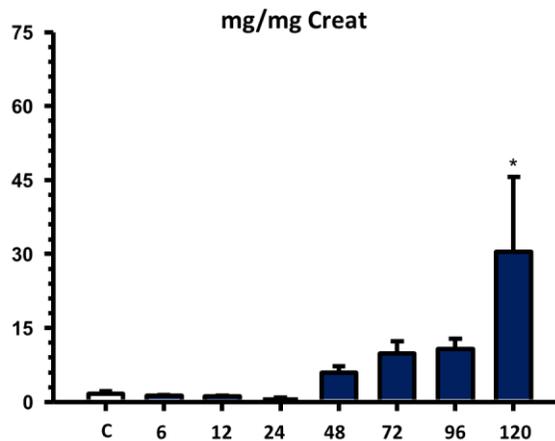


Fig. 17. Excreción urinaria de NGAL en los diferentes grupos de estudio * $p < 0.05$, vs. Grupo control.

DISCUSIÓN:

Como muestran los resultados, el cisplatino causa daño renal importante. El daño renal se caracterizó por una reducción del flujo sanguíneo renal, lo que ocasiona un menor aporte de oxígeno, condicionado a las células a un estado de hipoxia. Este proceso ocasiona que las células del epitelio tubular sufran un desplazamiento de la bomba Na/K ATPasa de la zona basolateral a la apical y se altera su función y con ello, la re-absorción de glucosa, sodio, aminoácidos y agua (Sharfuddin & Molitoris, 2011). Esto se debe principalmente a la pérdida del borde en cepillo y alteraciones en la actina de los microtúbulos del citoesqueleto. Estas alteraciones en el epitelio tubular se observaron en la histología de los animales que recibieron cisplatino después de 48 horas. En este estudio no se realizó ningún método para identificar el tipo de muerte celular que se encuentra por la administración de cisplatino en el tejido renal, sin embargo en la histología podemos observar que la muerte que más predomina es la necrosis, ya que, se pueden ver células atrofiadas y en muchos casos se encuentran los núcleos al exterior lo que sugiere que todos los componentes celulares se encuentran dispersos. Sin embargo, algunos estudios han mostrado que administrar una dosis baja de cisplatino puede ser tolerable por las células epiteliales y algunas de ellas presentan muerte celular por apoptosis, pero con dosis mayores las células presentan mayor daño (Lemasters et al., 1998).

Debido a que el riñón se encuentra en un proceso de daño, no puede realizar su principal función de excretar desechos mediante la orina. Uno de estos desechos es la creatinina, es por esto, que la creatinina sérica se acumula en la sangre y esto se traduce con una menor depuración de la creatinina, efecto que se observó después de 48 horas de administrar el cisplatino. Sinha et al. (Sinha et al., 2013), después de administrar 5.5 mg/kg de cisplatino

a ratas observó un descenso significativo de la función renal en el tercer día. En este estudio usamos una dosis mayor y la disfunción renal apareció a las 48 h.

La proteinuria se presentó antes de la disfunción renal (12 h), sin embargo, se normalizó en horas posteriores, lo que muestra que este marcador que se toma en cuenta en la clínica no es un marcador confiable, dado que no refleja lo que está ocurriendo en el epitelio tubular.

La proteína de 72 kDa, (Hsp 72) tiene la cualidad de expresarse cuando existe un estrés en las células, este mecanismo se realiza para tratar de contrarrestar el daño que está teniendo las células. En un estudio previo de nuestro laboratorio (Barrera-Chimal) demostramos que Hsp72 es un marcador sensible y temprano del daño renal inducido por isquemia reperusión renal. Por lo tanto, en este estudio decidimos evaluar si esta proteína podía ser un biomarcado confiable del daño renal inducido por cisplatino y compararlo con otros biomarcadores disponibles comercialmente. Encontramos que la administración de cisplatino en cualquiera de las dosis utilizadas indujo la presencia de Hsp72 en la orina de estos animales desde las 24 h posteriores a la administración de cisplatino y con un aumento gradual alcanzando la mayor concentración a las 72h. Dado que encontramos la mayor cantidad de Hsp72 con la dosis alta de cisplatino, decidimos utilizar esta dosis en el resto de los experimentos. Cuando evaluamos el comportamiento de Hsp72 a lo largo del tiempo con la dosis alta, encontramos que Hsp72 aparece en la orina desde la sexta hora después de la administración de cisplatino, pero la mayor presencia se encontró entre las 48 y 96 h. Estos resultados estuvieron muy de acuerdo con el daño histológico posterior a la administración del cisplatino, que es el gold estandar para evaluar el daño tubular inducido por el fármaco. Por lo tanto, nuestros resultados indican que Hsp72 es un biomarcador útil que refleja claramente el daño que esta ocurriendo posterior a la administración del cisplatino, sin ser un método invasivo (Fan et al., 2003).

En el Western blot de corteza se observó una tendencia a la elevación de los niveles de proteína de Hsp 72, sin embargo los resultados no fueron estadísticamente significativos con respecto al grupo control. Estos resultados nos permiten conocer si el cisplatino está induciendo a Hsp72, aunque es muy factible que esto está ocurriendo debido a que un gran número de células del epitelio tubular no existen debido a necrosis y apoptosis y otro gran número se han desprendido de la membrana basal tubular y las que se encuentran viables son en las que se induce Hsp72 y mantienen la producción de Hsp72 similar al control.

Si se compara los datos de Hsp 72 con los datos clínicos tomados en el estudio se puede decir que Hsp 72 estratificó el daño antes que los métodos convencionales como la proteinuria que el daño se llega a hacer visible hasta las 120 horas.

Como se sabe NGAL y Kim-1 están asociadas a moléculas de neutrófilos y fagocitos, esto les confiere la propiedad de detectar daño cuando existe una anomalía en el riñón. Estos marcadores comerciales se llegan a usar en la clínica. En el estudio se puede ver que hay un aumento en Kim-1 a las 72 horas y en NGAL hasta las 120 horas, estos resultados no detectaron el daño real con relación a la histología lo que significa que no fueron marcadores adecuados que reflejen el daño renal por cisplatino (J. B. Cowland & Borregaard, 1997; Ichimura et al., 2008). Es por esto, que nuestro estudio demuestra que Hsp 72 es un biomarcador más temprano para detectar el daño tubular inducido por el cisplatino.

Los animales nunca tuvieron recuperación debido a que fueron sacrificados, pero se cree que si se hubieran seguido pudieran haber recuperado la función renal normal, ya que el epitelio puede regenerarse.

CONCLUSIÓN:

La dosis única de cisplatino produjo nefrotoxicidad que se caracterizó por una reducción en la función renal y daño tubular después de 48-h. NGAL, Kim-1 y la proteinuria fueron menos capaces de reflejar el daño tubular que ocurre después de la administración del cisplatino. La excreción urinaria de Hsp72 aumentó en forma paralela al daño tubular, siendo significativa a partir de las 48-h. En cambio, el aumento de Kim y de NGAL sólo fue significativo después de 72 h. Nuestros resultados muestran que Hsp72 fue superior a NGAL, Kim1 y a la proteinuria, como biomarcador para la detección del daño tubular inducido por cisplatino.

BIBLIOGRAFIA:

- Akcay, A., Nguyen, Q., & Edelstein, C. L. (2009). Mediators of inflammation in acute kidney injury. *Mediators of Inflammation*, 2009, 137072. doi:10.1155/2009/137072
- Amptoulach, S., & Tsavaris, N. (2011). Neurotoxicity caused by the treatment with platinum analogues. *Chemotherapy Research and Practice*, 2011, 843019. doi:10.1155/2011/843019
- Arany, I., & Safirstein, R. L. (2003). Cisplatin nephrotoxicity. *Seminars in Nephrology*, 23(5), 460–464. doi:10.1016/S0270-9295(03)00089-5
- Ates, E., Yalcin, A. U., Yilmaz, S., Koken, T., & Tokyol, C. (2005). Protective effect of erythropoietin on renal ischemia and reperfusion injury. *ANZ Journal of Surgery*.
- Barrera-Chimal, J., & Bobadilla, N. a. (2012). Are recently reported biomarkers helpful for early and accurate diagnosis of acute kidney injury? *Biomarkers Biochemical Indicators of Exposure Response and Susceptibility to Chemicals*, 17(5), 385–93. doi:10.3109/1354750X.2012.680070
- Barrera-Chimal, J., Pérez-Villalva, R., Cortés-González, C., Ojeda-Cervantes, M., Gamba, G., Morales-Buenrostro, L. E., & Bobadilla, N. a. (2011). Hsp72 is an early and sensitive biomarker to detect acute kidney injury. *EMBO Molecular Medicine*, 3(1), 5–20. doi:10.1002/emmm.201000105
- Basile, D. P. (2007). The endothelial cell in ischemic acute kidney injury: implications for acute and chronic function. *Kidney International*, 72(2), 151–6. doi:10.1038/sj.ki.5002312
- Batista P, L. A., & Da Cunha J, A. D. (2012). Review Article Acute Nephrotoxicity of Cisplatin : Molecular mechanisms, 332–340. doi:10.5935/0101-2800.20130052
- Beck, F. X., Neuhofer, W., & Müller, E. (2000). Molecular chaperones in the kidney: distribution, putative roles, and regulation. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 279(2), F203–15. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10919839>
- Bellomo, R., Ronco, C., Kellum, J. a, Mehta, R. L., & Palevsky, P. (2004). Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute

- Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Critical Care (London, England)*, 8(4), R204–12. doi:10.1186/cc2872
- Bobadilla, N. A. (2005). Filtración glomerular. In M. Moderno (Ed.), *Fisiología Médica* (1st ed., pp. 49–62). México D.F.
- Bonventre, J. V. (2003). Dedifferentiation and Proliferation of Surviving Epithelial Cells in Acute Renal Failure. *Journal of the American Society of Nephrology*, 14(90001), 55S–61. doi:10.1097/01.ASN.0000067652.51441.21
- Borrero, J. R., Montero, O. G., Vélez, H. A., Rojas, W. M., & Restrepo, J. M. (2003). *Fundamentos de Medicina: Nefrología* (4th ed.). Colombia: CIB.
- Bredt, D. S., & Snyder, S. H. (1990). Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(2), 682–5. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=53329&tool=pmcentrez&endertype=abstract>
- Calderón-ospina, C. A., Guzmán-ramírez, G. M., Sarmiento-monroy, J. C., Gómez-angulo, D. L., Joya-higuera, A. Y., Ríos-barajas, L. F., ... Soler-barrera, J. N. (2011). Nefrotoxicidad inducida por medicamentos. *Médicas UIS*, 24(1), 65–85.
- Carrasco, L., Sañudo, B., Martínez, I. C., & De Hoyo, M. (2010). PROTEÍNAS DE ESTRÉS Y EJERCICIO FÍSICO. *Revista Multidisciplinar de Las Ciencias Del Deporte*, 10(37), 1–21.
- Chen, Z., Luo, Q., Jian, H., Zhou, Z., Cheng, B., Lu, S., & Liao, M. (2013). Long-term results of a randomized controlled trial evaluating preoperative chemotherapy in resectable non-small cell lung cancer. *OncoTargets and Therapy*, 6, 645–50. doi:10.2147/OTT.S44503
- Claire-Del Granado, R. (2008). Lesión Renal Aguda; Ya no más insuficiencia.pdf. *Artemisa En Linea*, 3(3), 79–85.
- Coca, S. G., Yusuf, B., Shlipak, M. G., Garg, A. X., & Parikh, C. R. (2009). Long-term risk of mortality and other adverse outcomes after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *American Journal of Kidney Diseases : The Official Journal of the National Kidney Foundation*, 53(6), 961–73. doi:10.1053/j.ajkd.2008.11.034
- Coronato, S., Girolamo, W. D. I., Salas, M., Spinelli, O., Laguens, G., B, C. D. P., ... Plata, D. La. (1999). Biología de las Proteínas de Shock Térmico. *MEDICINA*, 59, 477–486.
- Cowland, J. B., & Borregaard, N. (1997). Molecular characterization and pattern of tissue expression of the gene for neutrophil gelatinase-associated lipocalin from humans. *Genomics*, 45(1), 17–23. doi:10.1006/geno.1997.4896

- Cowland, J., & Borregard, N. (1997). Molecular characterization and pattern of tissue expression of the gene for neutrophil gelatinase-associated lipocalin from humans. *Genomics*, 45(1), 17–23.
- Cruz, D. N., Ricci, Z., & Ronco, C. (2009). Clinical review: RIFLE and AKIN--time for reappraisal. *Critical Care (London, England)*, 13(3), 211. doi:10.1186/cc7759
- Csermely, P., & Yahara, I. (1996). Heat shock proteins, 67–75.
- Dobyan, D. C., Levi, J., Jacobs, C., Kosek, J., & Weiner, M. W. (1980). Mechanism of cis-Platinum Nephrotoxicity: *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 213 (3), 551–6.
- Eaton C, D., & Pooler P, J. (2006). *Fisiología Renal de Vander* (6th ed.).
- Edelstein, C. L. (2000). Calcium-mediated proximal tubular injury-what is the role of cysteine proteases? *Nephrology, Dialysis, Transplantation : Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 15(2), 141–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10648654>
- Fan, C.-Y., Lee, S., & Cyr, D. M. (2003). Mechanisms for regulation of Hsp70 function by Hsp40. *Cell Stress & Chaperones*, 8(4), 309–16. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=514902&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Gal, B., López, M., Martín, A. I., & Prieto, J. (2007). *Bases de la Fisiología*. (Tébar, Ed.) (2nd ed., pp. 319–350). Madrid.
- Greenberg, A., Cheung, A., Falk, R. J., Coffmann, T. M., & Jennette, J. C. (1994). *Primer on Kidney Disease*. (A. Press, Ed.) (2nd ed.). California.
- Guyton, A. C., & Hall, J. E. (2006). *Textbook of Medical Physiology. Physiology* (Vol. 51, pp. 1204–1209). doi:10.1136/pgmj.51.599.683-c
- Harrison, & Fauci. (2012). *Principios de Medicina Interna* (18th ed.). Mcgraw-Hill Interamericana.
- Ichimura, T., Asseldonk, E. J. P., Humphreys, B. D., Gunaratnam, L., Duffield, J. S., & Bonventre, J. V. (2008). Kidney injury molecule – 1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells, 118(5). doi:10.1172/JCI34487.)
- Jiang, M., & Dong, Z. (2008). Regulation and Pathological Role of p53 in Cisplatin Nephrotoxicity, 327(2), 300–307. doi:10.1124/jpet.108.139162.imbalanced

- Kowalska-Kańka, A., Maciejewski, T., & Niemiec, K. T. (2013). The role and regulation of secretion of erythropoietin in pregnancy. *Medycyna Wieku Rozwojowego*, 17(3), 270–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24296452>
- Layton, A. T. (2013). Modeling Transport and Flow Regulatory Mechanisms of the kidney. *ISRN Biomath*, 2012(2012), 1–32. doi:10.5402/2012/170594.Modeling
- Lemasters, J. J., Nieminen, a L., Qian, T., Trost, L. C., Elmore, S. P., Nishimura, Y., ... Herman, B. (1998). The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1366(1-2), 177–96. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9714796>
- Leow, J. J., Martin-Doyle, W., Rajagopal, P. S., Patel, C. G., Anderson, E. M., Rothman, A. T., ... Bellmunt, J. (2013). Adjuvant Chemotherapy for Invasive Bladder Cancer: A 2013 Updated Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Trials. *European Urology*, null(null). doi:10.1016/j.eururo.2013.08.033
- Lewington, A. J. P., Cerdá, J., & Mehta, R. L. (2013). Raising awareness of acute kidney injury: a global perspective of a silent killer. *Kidney International*, 84(3), 457–67. doi:10.1038/ki.2013.153
- Li, P. K. T., Burdmann, E. a, & Mehta, R. L. (2013). Acute kidney injury: global health alert. *Kidney International*, 83(3), 372–6. doi:10.1038/ki.2012.427
- Lucas, A. G., Benitez Collante, C., Aizpuru, G., Alvarez, M. A., Llanos, I. C., Miño, C., ... Brandan, N. (2004). Respuesta del tejido renal y hepático a diferentes dosis de cisplatino, 4–7.
- Mehta, R. L., Kellum, J. a, Shah, S. V, Molitoris, B. a, Ronco, C., Warnock, D. G., & Levin, A. (2007). Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Critical Care (London, England)*, 11(2), R31. doi:10.1186/cc5713
- Miller, R. P., Tadagavadi, R. K., Ramesh, G., & Reeves, W. B. (2010). Mechanisms of Cisplatin nephrotoxicity. *Toxins*, 2(11), 2490–518. doi:10.3390/toxins2112490
- Molitoris, B. a, & Sutton, T. a. (2004). Endothelial injury and dysfunction: role in the extension phase of acute renal failure. *Kidney International*, 66(2), 496–9. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.761_5.x
- Nathan, C., & Xie, Q. (1994). Minireview Regulation of Biosynthesis of Nitric Oxide *, (44), 13725–13728.
- Nishikawa, M., Nagatomi, H., Chang, B.-J., Sato, E., & Inoue, M. (2001). Targeting Superoxide Dismutase to Renal Proximal Tubule Cells Inhibits Mitochondrial Injury

- and Renal Dysfunction Induced by Cisplatin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 387(1), 78–84. doi:10.1006/abbi.2000.2237
- R, J. B. (2003). *Nefrología* (p. 826). Corporación para Investigaciones Biológicas. Retrieved from <http://books.google.com/books?id=UQ9XNWX7cmMC&pgis=1>
- Ritossa, F. . (1962). New puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*, 18(12), 571–573.
- Ross, & Pawlina. (2007). *Histología: Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular* (5th ed., pp. 703–719). Panamericana.
- Sadler, T. ., & Langman. (2007). *Embriología médica*. (Panamericana, Ed.) (10th ed., pp. 237–242). Buenos Aires.
- Schrier, R. W., Wang, W., Poole, B., & Mitra, A. (2004). Science in medicine Acute renal failure: definitions , diagnosis , pathogenesis , and therapy, 114(1), 5–14. doi:10.1172/JCI200422353.The
- Sharfuddin, A. A., & Molitoris, B. A. (2011). Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Nature Reviews. Nephrology*, 7(4), 189–200. doi:10.1038/nrneph.2011.16
- Sinha, V., Vence, L. M., & Salahudeen, A. K. (2013). Urinary tubular protein-based biomarkers in the rodent model of cisplatin nephrotoxicity: a comparative analysis of serum creatinine, renal histology, and urinary KIM-1, NGAL, and NAG in the initiation, maintenance, and recovery phases of acute kidney inj. *Journal of Investigative Medicine: The Official Publication of the American Federation for Clinical Research*, 61(3), 564–8. doi:10.231/JIM.0b013e31828233a8
- Smith, V., Ferrés, E., & Fernández, M. (1992). *Manual de embriología y anatomía general*. (U. DE VALENCIA, Ed.) (p. 945). Valencia. Retrieved from <http://books.google.com.mx/books?id=MTxGo4G1hAwC&pg=PA691&dq=embriologia+de+riñones&hl=es&sa=X&ei=2F8EUrKEGonY8gTHjYCoBw&ved=0CEUQ6AEwBA#v=onepage&q=embriologia+de+riñones&f=false>
- Suttorp, M. M., Hoekstra, T., Mittelman, M., Ott, I., Franssen, C. F. M., & Dekker, F. W. (2013). Effect of erythropoiesis-stimulating agents on blood pressure in pre-dialysis patients. *PloS One*, 8(12), e84848. doi:10.1371/journal.pone.0084848
- Thews, G., & Mutschler, E. (1983). Riñon y vias excretoras urinarias. In *Anatomía Fisiología y Patofisiología del hombre* (p. 472).
- Trof, R. J., Di Maggio, F., Leemreis, J., & Groeneveld, a B. J. (2006). Biomarkers of acute renal injury and renal failure. *Shock (Augusta, Ga.)*, 26(3), 245–53. doi:10.1097/01.shk.0000225415.5969694.ce

- Ueda, N., & Shah, S. V. (2000). Nephrology Dialysis Transplantation Tubular cell damage in acute renal failure — apoptosis , necrosis , or both. *Nephrol Dial Transplant*, (15), 318–323.
- Ulate, G. (2007). *Fisiología renal*. (EUCR, Ed.) (2nd ed., pp. 1–216). Costa Rica.
- Vaidya, V. S., Ramirez, V., Ichimura, T., Bobadilla, N. A., Bonventre, J. V, Vishal, S., & Bobadilla, A. (2006). Urinary kidney injury molecule-1 : a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury, *02115*, 517–529. doi:10.1152/ajprenal.00291.2005.
- Walter, S., & Buchner, J. (2002). Molecular chaperones--cellular machines for protein folding. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 41(7), 1098–113. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12491239>
- William N. Kelle. (1992). *Medicina Interna*. (Panamericana, Ed.) (2nd ed., p. 749). Argentina.