



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTABILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO DE
72 kDa EN MUESTRAS DE ORINA PARA SER UTILIZADA COMO
BIOMARCADOR DE LESIÓN RENAL AGUDA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

JUAN ANTONIO ORTEGA TREJO



2017

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX.



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: PROFESOR: ELENA ZAMBRANO GONZÁLEZ
VOCAL: PROFESOR: MARTHA LETICIA JIMÉNEZ PARDO
SECRETARIO: PROFESOR: NORMA ARACELI BOBADILLA SANDOVAL
1ER. SUPLENTE: PROFESOR: MIGUEL ÁNGEL PEÑA ORTIZ
2° SUPLENTE: PROFESOR: SARA MARGARITA GARZA AGUILAR

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE MEDICINA GENÓMICA Y TOXICOLOGÍA AMBIENTAL, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM Y DEPARTAMENTO DE NEFROLOGÍA Y METABOLISMO MINERAL, INSTITUTO DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN, SALVADOR ZUBIRÁN

ASESOR DEL TEMA:

NORMA ARACELI BOBADILLA SANDOVAL

SUSTENTANTE:

JUAN ANTONIO ORTEGA TREJO

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

El presente trabajo se realizó bajo la asesoría de la Dra. Norma Araceli Bobadilla Sandoval en la Unidad de Fisiología Molecular del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México y en el Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” en el periodo comprendido de enero de 2012 a junio del 2016.

Este trabajo fue realizado con los apoyos otorgados a la Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT No. 48483, 101030 y 181267), por la Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA IN223915).

Durante la realización de mis estudios de Licenciatura recibí el nombramiento como Ayudante de Investigador Nacional Nivel III, otorgado por el Sistema Nacional de Investigadores-CONACyT (Dra. Norma Bobadilla, No. Expediente 7497) de noviembre 2012 a octubre 2015 el número de registro 8583.

Recibí también la beca PROBEI, por parte de la Comisión de Coordinadora de Institutos Nacionales de Salud y Hospitales de Alta Especialidad (Febrero 2014 a Abril

2015). Fui además acreedor a la beca para la terminación de estudios DGAPA-PAPIIT-UNAM del proyecto IN223915, previamente citado (agosto 2015 a junio 2016).

A la QFB Rosalba Pérez Villalva por su asesoría técnica durante la realización de este trabajo.

Los resultados del presente estudio fueron presentados en forma oral, en la Reunión anual del Instituto Mexicano de Investigaciones Nefrológicas (Diciembre 2015) donde recibió el primer lugar como mejor trabajo oral básico.

El trabajo actual concluyó con la publicación en la revista indizada *Biomarkers* publicado en línea en octubre de 2015.

(Ortega-Trejo JA, Pérez-villalva R, Barrera-chimal J, et al. Heat shock protein 72 (Hsp72) specific induction and temporal stability in urine samples as a reliable biomarker of acute kidney injury (AKI) Heat shock protein 72 (Hsp72) specific induction and temporal stability. *Biomarkers*. 2015;5804(January 2016):453-459. doi:10.3109/1354750X.2015.1096305.)

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	6
2. INTRODUCCIÓN	8
2.1. Sistema urinario y estructura del riñón	8
2.2. Lesión Renal Aguda (LRA).....	10
2.3. Fisiopatología de la LRA.....	12
2.4. Epidemiología de la LRA.....	15
2.5. Biomarcadores.....	17
2.6. Proteínas de Choque Térmico	22
3. HIPÓTESIS	26
4. OBJETIVOS.....	27
4.1. OBJETIVOS GENERALES	27
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES	27
5. METODOLOGÍA	28
5.1. Modelo animal de daño renal por I/R	28
5.2. Parámetros funcionales	29
5.3. Extracción de tejidos.....	30
5.4. Almacenamiento y manejo de orinas.....	30
5.5. Efecto de la temperatura ambiente y ciclos de congelamiento/descongelamiento en muestras de orina de pacientes diagnosticados con LRA.....	31
5.6. Extracción de proteínas y Western Blot	31
5.7. Detección de Hsp72 mediante ELISA	33
5.8. Muestras de orina de pacientes diagnosticados con LRA	33
5.9. Análisis estadístico	34
6. RESULTADOS.....	35
7. DISCUSIÓN	42
8. CONCLUSIONES	45
9. BIBLIOGRAFÍA	46

1. RESUMEN

La principal causa de la lesión renal aguda (LRA) es el daño por isquemia/reperfusión (I/R). Actualmente la LRA se diagnostica por la elevación de la creatinina sérica, a pesar de que es poco sensible y específica. En nuestro laboratorio identificamos que la concentración en la orina de la proteína de choque térmico de 72 kDa (Hsp72) es un biomarcador sensible y temprano de LRA superior a la creatinina y a otros biomarcadores tanto en un modelo murino, como en humanos. Sin embargo, se desconoce si la inducción de Hsp72 es específica del riñón y no se ha establecido la estabilidad de Hsp72 en las muestras de orina que son sometidas a ciclos de congelación/descongelación, o bien, las que son almacenadas a temperatura ambiente o congeladas por periodos de tiempo largos.

Para contestar dichas interrogantes, se incluyeron 2 grupos de ratas (n=20): uno sometido a cirugía falsa y otro al que se indujo isquemia renal bilateral de 45 min. Posteriormente los animales se colocaron en jaulas metabólicas y después de 24 h de reperfusión, se extrajo: intestino, pulmón, hígado, corazón, cerebro, corteza y médula renal, para estudiar la expresión de Hsp72 mediante Western blot. Las orinas se almacenaron en alícuotas que soportaron diferentes temperaturas (temperatura ambiente y a -80°C), diferentes periodos de almacenamiento desde un mes y hasta once meses, así como, diferentes ciclos de congelación/descongelación (5 procesos). Se analizó la presencia de Hsp72 en orinas de pacientes diagnosticados con LRA y voluntarios sanos mediante Western blot y se sometieron a las mismas condiciones de

almacenamiento de temperatura (temperatura ambiente y a -80°C). La determinación de la concentración de Hsp72 se realizó a través de ELISA.

Encontramos que la expresión de Hsp72 en la corteza renal aumentó contundentemente en los animales que sufrieron un periodo de I/R la cual no se observó en ningún otro de los tejidos. La concentración de Hsp72 permaneció constante durante los tres días de almacenamiento a temperatura ambiente (TA) y no fue afectada por los ciclos de congelación/descongelación. Respecto al almacenaje a -80°C , encontramos que la concentración de Hsp72 en las muestras de orina permaneció constante durante los primeros 9 meses. En las muestras de humano, Hsp72 solo se detectó en los pacientes diagnosticados con LRA y la concentración de Hsp72 no se vio alterada por las diferentes condiciones de almacenamiento.

Por lo tanto, Hsp72 es un biomarcador específico y un indicador estable de la LRA en muestras almacenadas por varios meses o almacenadas por periodos cortos de tiempo a temperatura ambiente, o cuando las muestras se exponen a diversos ciclos de congelamiento/descongelamiento, permitiendo que sea una excelente candidata para ser utilizada en la clínica y permitir un diagnóstico temprano y certero de LRA.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Sistema urinario y estructura del riñón

Los riñones son órganos pares retroperitoneales situados uno a cada lado de la columna vertebral, entre la doceava vértebra torácica y tercera vértebra lumbar. El peso de cada riñón va de 125 a 170 g en los hombres, y de 115 a 155 g en las mujeres.^{1,2} Cada riñón es penetrado por un uréter, por donde fluye la orina del riñón a la vejiga. Cada uréter dentro de un riñón se forma a partir de las estructuras en forma de embudo, llamadas cálices mayores que, a su vez, se forman a partir de cálices menores. Los cálices menores se ajustan sobre los tejidos renales llamadas pirámides en forma de cono subyacentes. Las pirámides constituyen la médula del riñón y sobre de ésta, se encuentra la corteza renal y una capsula de tejido conectivo muy fino en la superficie externa del riñón (Fig. 1).^{2,3} La unidad funcional del riñón es la nefrona y cada riñón contiene aproximadamente 1 millón de nefronas.^{4,5} Cada nefrona está constituida por la región glomerular (o corpúsculo renal) y una región tubular. El glomérulo es el responsable de la producción del ultrafiltrado del plasma. La barrera de filtración entre la vasculatura y el espacio urinario está conformada por un el endotelio fenestrado, la membrana basal glomerular y poros entre los procesos de las células epiteliales. El endotelio, forma la barrera inicial, está perforado por poros o fenestras, con diámetros que van de 70 a 100 nm. La superficie de las células endoteliales glomerulares tienen carga negativa debido a la presencia de un glucocáliz rica en glicosaminoglicanos polianiónicos y glicoproteínas. La membrana basal glomerular está compuesta principalmente de colágena IV, laminina, entactina y proteoglicanos sulfatados. Las

células mesangiales proporcionan un soporte al sistema vascular glomerular y las células epiteliales, forman la cápsula de Bowman, donde se colecta el filtrado urinario primario y se vacía al túbulo epitelial.¹ El túbulo se divide en: túbulo proximal, el asa de Henle, túbulo distal y finalmente un túbulo colector. Los túbulos de las nefronas y el túbulo colector expresan varios canales iónicos y de agua, así como transportadores que ayudan a concentrar y ajustar la composición del filtrado urinario por reabsorción y secreción. Este último paso es vital para la conservación de fluidos, el mantenimiento del balance electrolítico y la eliminación de desechos metabólicos.^{1,2,6,7}

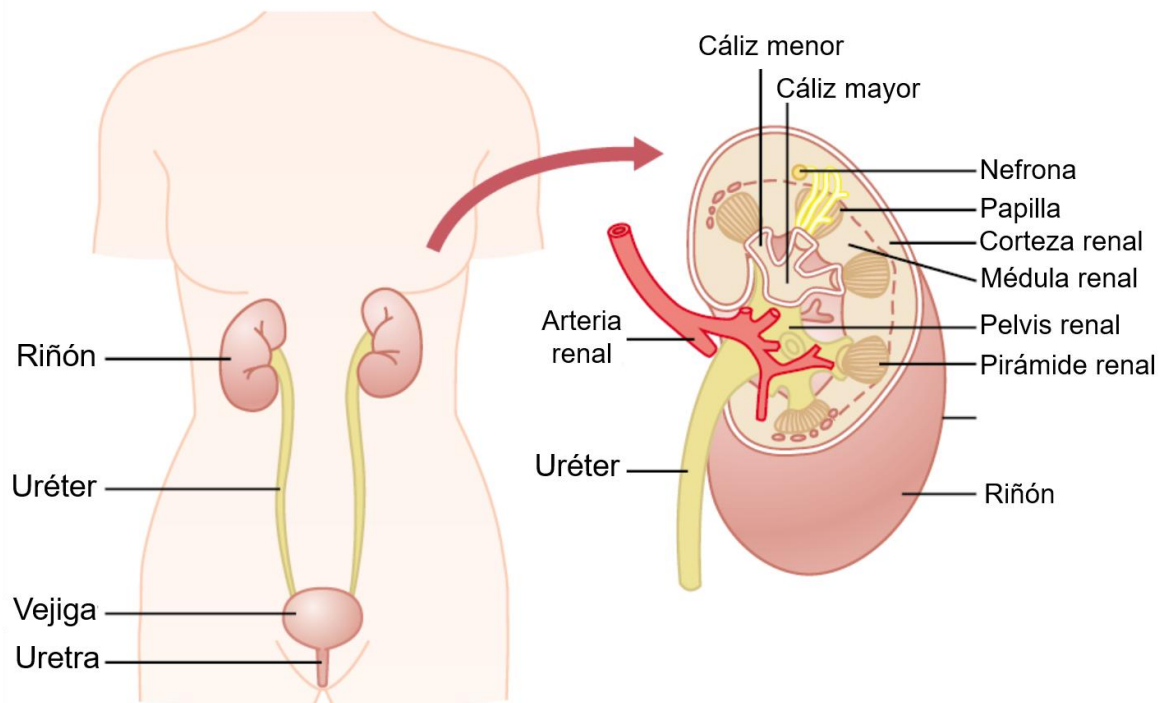


Figura 1. Sistema urinario. Esquema del riñón y sus elementos. Modificada de Guyton, A. 2006.²

Los riñones llevan a cabo una amplia gama de funciones para el cuerpo, la mayoría de ellas, esenciales para la vida. Dentro de sus principales funciones se encuentran: la excreción de desechos metabólicos y de productos tóxicos, la regulación

de la presión arterial, el mantener el pH sanguíneo, la producción de la hormona eritropoyetina y vitamina D, la absorción de nutrientes, la concentración de la orina (salvaguardando o no el agua, según las necesidades del organismo) y la regulación del balance electrolítico al regular la homeostasis de iones importantes como el sodio, el cloro, el potasio, el calcio, el fósforo y el magnesio.³ En condiciones de reposo, el flujo sanguíneo de los riñones representa aproximadamente el 20% de gasto cardiaco en humanos, aun cuando ambos riñones representen menos del 0.5% del peso corporal total.^{1,8} Este importante aporte de oxígeno es necesario para que los riñones desarrollen todas sus funciones por lo que un episodio de hipoxia, aunque sea de grado menor, compromete las funciones de estos órganos.

2.2. Lesión Renal Aguda (LRA)

La LRA es un problema clínico frecuente, ya que, cerca del 40-60% de los pacientes en unidades de cuidados intensivos están en riesgo de desarrollarla y además presenta tasas de morbilidad y mortalidad elevadas.¹ Es un síndrome que se desarrolla por la reducción transitoria del flujo sanguíneo renal, lo que ocasiona la reducción de la tasa de filtrado glomerular (TFG) y en consecuencia un aumento agudo (<48 h) en la concentración de creatinina en sangre y es a menudo acompañada por la disminución en el volumen de orina (Fig. 2).⁹ La LRA se caracteriza por daño al epitelio tubular renal (principalmente al túbulo proximal), disfunción vascular e inflamación. Dependiendo de la severidad de la LRA, habrá muerte celular por apoptosis y/o

necrosis. Posteriormente las células del epitelio tubular que sobrevivieron al episodio

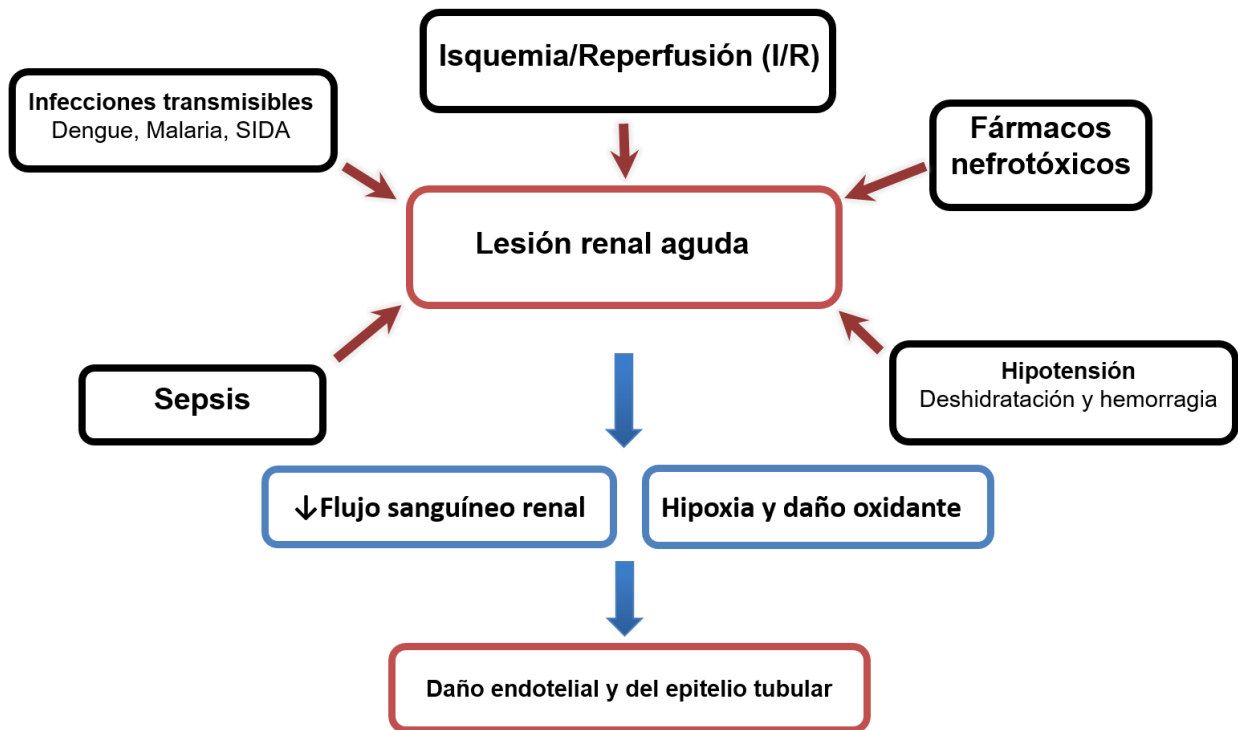


Figura 2. Principales causas de LRA y sus consecuencias fisiopatológicas. Modificado de: Bonventre JV et al. 2011.⁹

de LRA proliferarán para restablecer la estructura tubular.¹⁰

La LRA es un síndrome de etiología multifactorial, asociada con un incremento temprano y a largo plazo en la morbilidad y mortalidad, así como con el desarrollo subsecuente de enfermedad renal crónica (ERC),¹¹ eventos cardiovasculares y muerte prematura;^{12,13} y clínicamente se divide en pre-renal, renal y post-renal.¹⁴ La forma pre-renal está caracterizada por un decremento de la TFG, lo cual disminuye la presión de perfusión renal sin daño al parénquima renal. Las causas de LRA post-renal están caracterizadas por obstrucción aguda del flujo urinario ocasionando que se aumente la

presión intratubular y por lo tanto disminuye la TFG. Las causas renales de LRA son difíciles de clasificar, ya que existe una amplia variedad de alteraciones que pueden ocurrirle al riñón, pero para facilitar su comprensión se dividen con base en las principales estructuras del riñón que pueden ser afectadas. Estas estructuras son: daño al epitelio tubular, daño al glomérulo, daño intersticial y daño vascular.¹⁵

2.3. Fisiopatología de la LRA

La causa más común de LRA es el daño isquémico ya que resulta en una disminución en la oxigenación y la absorción de nutrientes y que se puede presentar tanto en riñones nativos, como en los trasplantados.^{16,17,18} Otras causas que disminuyen el flujo sanguíneo renal de manera local o generalizada son la sepsis, medicamentos nefrotóxicos, enfermedades renales vasculares, síndrome hepatorenal, disminución del volumen intravascular y la hipotensión.^{9,16}

Como respuesta a un daño, las células endoteliales incrementan los niveles de agentes vasoconstrictores como lo son: la endotelina-1, la angiotensina II, el tromboxano A₂, las prostaglandina H₂, los leucotrienos C₄, D₄ y la adenosina;¹⁹ al mismo tiempo, disminuye la respuesta de vasodilatadores como: la acetilcolina y el óxido nítrico.²⁰ Las células endoteliales sufren varias alteraciones como lo son: la pérdida de sus uniones intercelulares, alteraciones en el citoesqueleto y en el glicocáliz; lo que provoca un incremento en la permeabilidad de la microcirculación y edema intersticial.²¹ Existe un aumento en la expresión de moléculas de adhesión celular lo que facilita que las células inflamatorias se adhieran al endotelio, como los neutrófilos,

los cuales se acumulan particularmente en los capilares peritubulares y producen proteasas, mieloperoxidasas, especies reactivas de oxígeno y citocinas que incrementan la permeabilidad vascular y reducen la integridad tubular epitelial y endotelial.^{22,23}

En las células del epitelio, donde el segmento S2 y S3 del túbulo proximal son los más afectados,²⁴ debido al gran número de mitocondrias que poseen, bajo un daño por isquemia, desaparece la polaridad celular y por ende, una deslocalización de moléculas de adhesión, así como, otras proteínas transmembranales como lo es la ATPasa Na^+/K^+ , que pasa del lado basolateral al lado apical. Así mismo, la disminución de la producción del ATP en estas células epiteliales produce un desacople en la cadena respiratoria con la subsecuente formación de radicales libres, lo que contribuye a la muerte del epitelio tubular por apoptosis y/o necrosis,¹⁴ lo cual va muy relacionado a la duración y gravedad del insulto isquémico.²¹ También se observa la pérdida del borde en cepillo y existe un desprendimiento de células viables y no viables al lumen tubular, por lo que, las proteínas de estas células llegan a la orina (Fig. 3).⁹ El material liberado durante el daño interactúa con los receptores tipo Toll (TLRs, por sus siglas en inglés), específicamente los TLR2 y TLR4 que incrementan su expresión durante la LRA en las células epiteliales, activándolos e iniciando una respuesta pro-inflamatoria, liberando citocinas y quimiocinas.^{25,26}

Después de un daño agudo, para la recuperación del riñón, las células epiteliales se expanden y migran para cubrir las áreas expuestas en la membrana basal, presentan una rápida proliferación seguida de una desdiferenciación para concluir en una restauración de la funcional integral del epitelio tubular (Fig. 3).²⁷

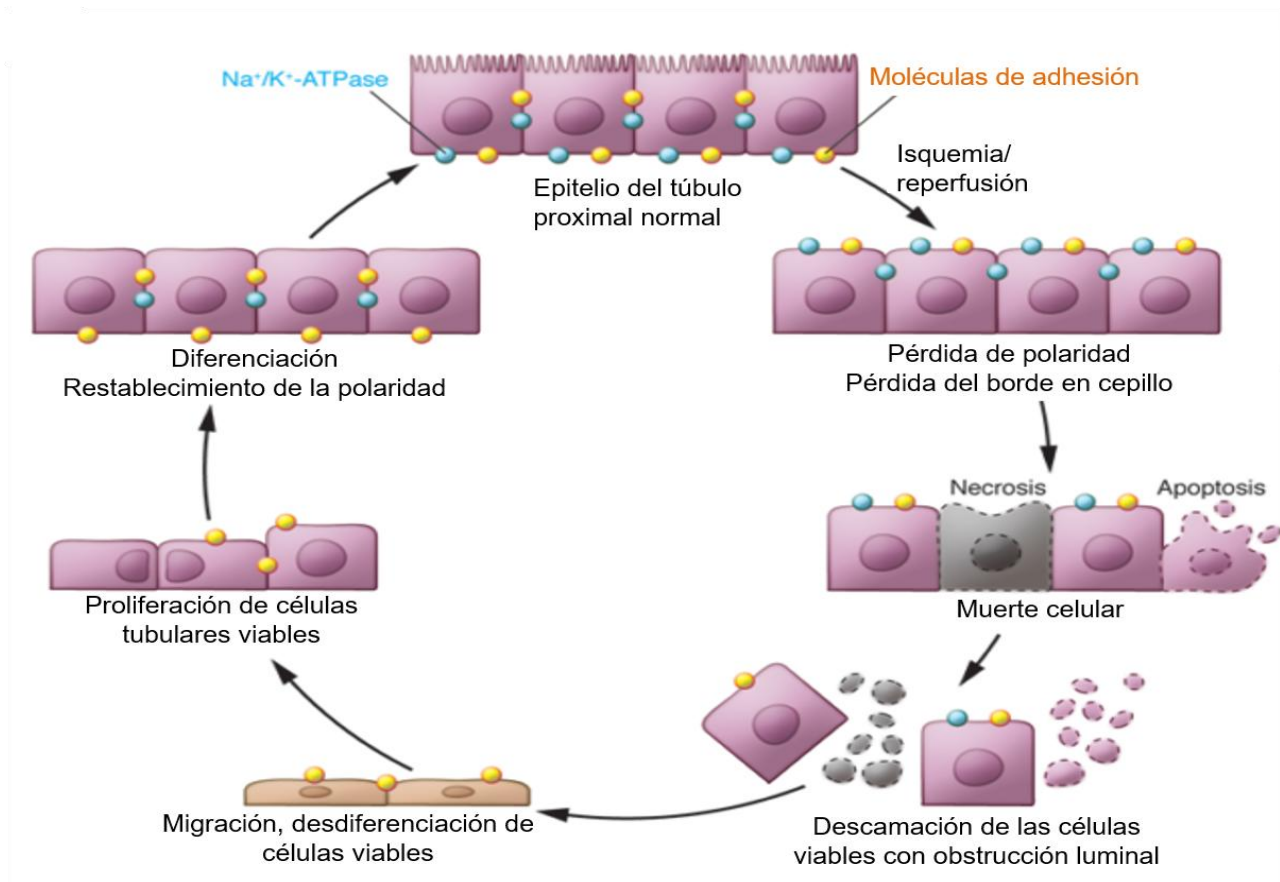


Figura 3. Daño tubular y reparación después de una LRA por isquemia. Modificada de Bonventre, J. V et al. *JCI*, 2011.⁹

Sin embargo, en los últimos años, se ha obtenido mucha información de trabajos publicados con experimentos con animales y humanos que indican que una LRA puede resultar en una reparación incompleta y presentar una inflamación túbulo intersticial persistente.^{28,29,30} Se ha encontrado que el arresto del ciclo celular de las células

epiteliales en G2 influye en el desarrollo de fibrosis,^{31,32} hipoxia crónica^{32,33} y la activación de vías de señalización donde se involucran citocinas pro-fibróticas y pro-inflamatorias.^{34,35} Esto hace que la LRA sea un factor para desarrollar ERC.^{13,28,33,36}

2.4. Epidemiología de la LRA

La incidencia de la LRA en la población general se encuentra entre 2,147 a 4,085 por millón de habitantes por año.^{37,38} Estudios recientes realizados en hospitales de países con alto ingreso económico reportaron que la incidencia de la LRA se encuentra entre el 3.2 al 9.6% de las admisiones, con una mortalidad global intrahospitalaria alrededor del 20%, mientras que, en las unidades de cuidados intensivos (UCI), la incidencia es de hasta el 60%.^{39,40} La LRA que requiere terapia de remplazo renal ocurre en el 5 al 6% de los pacientes en la UCI, con una elevada tasa de mortalidad, hasta de un 60%.⁴¹ Se estima que cerca de dos millones de personas mueren a causa de la LRA cada año alrededor del mundo y los pacientes que sobreviven tienen un riesgo mayor para desarrollar ERC.^{11,40,41,42} La LRA también es frecuente en los pacientes que son sometidos a cirugía cardíaca mayor (30%), que presentan shock séptico, hemorragia, deshidratación; diabetes mellitus o que son sometidos a infusión de medios de contraste.^{16,41,43,44}

La presencia de la LRA en pacientes hospitalizados, incrementa directa e indirectamente los costos al sistema de salud. La LRA está asociada con mayores cuidados, exámenes, estancias no planeadas u hospitalizaciones prolongadas, así

como, con un incremento en el riesgo de re-hospitalización temprana. En un estudio realizado en Estados Unidos, que incluyó 52 pacientes que desarrollaron LRA, se demostró una estancia hospitalaria más prolongada (>3.5 días) y un costo adicional en la hospitalización de \$9,000 dólares en comparación con los pacientes hospitalizados que no desarrollaron LRA. Los costos para la atención de la LRA rebasan las de condiciones más prevalentes como hospitalizaciones por falla cardíaca (\$2,200), neumonía (\$2,100) y sangrado gastrointestinal (\$2,100).^{45,46}

En México, según un estudio en el 2010, se estima una incidencia de pacientes con insuficiencia renal de 377 casos por millón de habitantes.⁴⁷ El INEGI, en el 2014, reporta 12 788 defunciones debido a la insuficiencia renal, 5 106 casos en hombres y 5 617 en mujeres, ocupando el décimo primer y noveno lugar, respectivamente, de principales causas de mortalidad.

La prevalencia de la LRA ha aumentado durante los últimos años y la mortalidad sigue siendo elevada, principalmente debido a la falta de biomarcadores tempranos y sensibles y a la ausencia de una terapia eficaz y accesible. Más preocupante es el hecho de que la LRA se ha asociado recientemente con el desarrollo de la ERC^{11,33,36} y se ha demostrado en modelos animales que episodios de diferente grado de severidad de LRA progresan a ERC.^{28,29} Por años, la LRA se continua diagnosticando por un aumento en la creatinina sérica y una reducción en la excreción de orina de acuerdo según las clasificaciones AKIN y RIFLE.^{42,48,49} Sin embargo, sus criterios están basados en los cambios a partir del valor basal, el cual no siempre está disponible, además de que varios estudios han encontrado que la creatinina sérica se elevó 48 h después de la lesión inicial que se ha producido en el riñón o que pequeños cambios en los niveles es

suficiente para producir una LRA, por lo tanto, su cuantificación no es un biomarcador fiable para LRA y provoca un retardo en su diagnóstico y en su terapia.⁵⁰ Por tanto, hay una necesidad de realizar una definición única para la práctica, la investigación y la salud pública. La KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcome) definió la LRA cuando el incremento de la Creatinina Sérica es mayor a 0.3 mg/dL en 48 h; ó cuando el incremento en la creatinina sérica es igual o mayor que 1.5 veces con respecto a la medición basal dentro de un tiempo de 7 días; ó cuando el flujo urinario es menor que 0.5 mL/kg/h en 6 horas.⁵¹

Por lo tanto, a pesar de lo anterior, la LRA constituye un problema de salud pública por su frecuencia creciente, su asociación con graves complicaciones y altos costos, así como elevada mortalidad a corto y a largo plazo.⁴⁶

2.5. Biomarcadores

La progresión de la enfermedad renal puede retardarse si la enfermedad es diagnosticada a tiempo,^{29,30} podría revertir los procesos anteriormente mencionados y mejorar la regeneración del epitelio tubular y de la misma manera una recuperación en la función renal. Los biomarcadores pueden ayudar al diagnóstico de la lesión renal, prediciendo la progresión y proveyendo información que muestre la efectividad de la intervención terapéutica.

En el 2001, la Administración de comida y medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) definió un biomarcador como “una característica que es objetivamente medible

y evaluable como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o de respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica”.⁵²

Recientemente, numerosas técnicas novedosas en el campo de la genómica, proteómica y metabolómica ha permitido interrogar a cientos o miles de biomarcadores potenciales.^{53,54} A pesar de los notables logros de estas técnicas se siguen utilizando los mismos biomarcadores en la clínica de manera rutinaria para el diagnóstico y monitorear la lesión renal, como lo son los niveles de nitrógeno ureico y la concentración de creatinina en la sangre y, sin embargo, no son óptimos para detectar daño o disfunción renal de manera temprana. Aunque existen candidatos adicionales como biomarcadores, ninguno ha sido validado de manera adecuada para justificar su uso en las decisiones del cuidado del paciente.

El proceso para la identificación y desarrollo de un biomarcador es arduo e involucra varias fases. Estas son: 1) identificar genes o proteínas que se encuentren reguladas positiva o negativamente en una enfermedad, 2) desarrollar y validar un ensayo para la determinación o identificación del biomarcador en muestras clínicas, 3) demostrar que el biomarcador tiene una utilidad potencial en estudios retrospectivos, 4) realizar dichos estudios y 5) validar la viabilidad del biomarcador en la rutina de la práctica clínica.⁵⁵

Detectar el daño de manera temprana, identificar la causas de la LRA, ser sitio específico, permitir los cambios patológicos en varios segmentos de los túbulos renales y correlacionar con lo encontrado de manera histológica, ser fácilmente y confiablemente medible de una manera no invasiva (o lo mínimo posible) y que no sea costoso son las características de un biomarcador ideal para enfermedad renal.¹

Tanto biomarcadores séricos como urinarios tienen ventajas y desventajas. Los séricos no son estables y son difícilmente medibles debido a la interferencia con varias proteínas séricas. En contraste, los urinarios son relativamente estables y de fácil acceso, sin embargo, su concentración está altamente influenciada por el volumen del paciente y otras condiciones que afectan el volumen urinario. Para tratar este inconveniente, se ha considerado normalizar la concentración del biomarcador urinario por la concentración de la creatinina sérica para eliminar la influencia del volumen urinario, en el supuesto de que la tasa de excreción de la creatinina urinaria es constante sobre el tiempo y la producción o excreción del biomarcador tiene una relación lineal con la tasa de excreción de la creatinina urinaria.⁵⁶

Recientemente, se han propuesto algunas moléculas cuya concentración se modifica en la orina de los pacientes con LRA como biomarcadores de esta enfermedad renal, tales como:

α 1-microtubulina. Glicoproteína de bajo peso de 27 a 30 kDa detectada en suero, orina y fluido cerebroespinal. Un incremento de esta proteína en la orina indica daño en el túbulo proximal, ya que en donde se reabsorbe y se metaboliza. Entre sus limitaciones esta que los niveles séricos se ven influidos por el género, la edad y las condiciones clínicas.^{57,58}

β 2-Microtubulina. Péptido de bajo peso molecular de 11.8 kDa presente en la superficie de todas las células nucleadas y se encuentra en la mayoría de los fluidos biológicos. Es filtrada por el glomérulo y reabsorbida casi completamente y metabolizada en el túbulo proximal.⁵⁹ Un inconveniente es que como biomarcador

urinario es inestable a temperatura ambiente, particularmente cuando el pH es menor de 5.5.⁶⁰

Glutation S-Transferasa (GST). Principalmente, dos subtipos de enzimas se encuentran en el riñón: la α -GST en el túbulo proximal y la π -GST en el túbulo distal. Su elevación en la orina se ha reportado en modelos animales que son tratados con nefrotóxicos o después de un daño renal isquémico.⁶¹ Sin embargo, pacientes que desarrollaron LRA de la UCI no mostraron diferencia en los niveles de α -GST de aquellos que no. Por otro lado, la π -GST se elevó en todos los pacientes con sepsis pero su elevación no predijo la LRA.⁶²

Interleucina-18 (IL-18). Citocina de 18 kDa pro-inflamatoria, producida por células del túbulo renal y macrófagos. Inducida mayoritariamente en el túbulo proximal. Participa en la progresión de una gran variedad de enfermedades renales, como lo son el daño por I/R, rechazo de trasplante, infección, condiciones autoinmunes, etc. El incremento urinario en pacientes con LRA se ha reportado en diversos estudios, sin embargo, presenta pobre discriminación, una sensibilidad menor a 40%. Además, en pacientes de UCI, la concentración de IL-18 no predijo el desarrollo de LRA.^{63,64}

Molécula de daño renal-1 (Kim-1, por sus siglas en inglés). Glicoproteína de membrana de 104 kDa con expresión sostenida en el túbulo proximal después de un daño isquémico hasta su completa recuperación, virtualmente ausente en riñones sanos y tiene alta expresión en células del túbulo proximal que en cualquier otra célula del riñón u otro órgano. Además, los niveles de RNAm correlacionan de manera muy importante con la excreción urinaria de Kim-1 en ratas que fueron expuestas a

isquemia por varios periodos, indicando que el riñón es la única fuente de la producción de Kim-1 seguida de un insulto renal. Se ha demostrado que las concentraciones urinarias de Kim-1 pueden diagnosticar LRA en niños que son sometidos a cirugías cardíacas 12 horas después de la cirugía.^{1,65,66,67}

Proteína de unión a ácidos grasos tipo-hígado (L-FABP, por sus siglas en inglés).

Se une de manera selectiva a ácidos grasos libres y los transporta a la mitocondria o a peroxisomas. Se encuentra en el citoplasma de las células del túbulo proximal, tanto por su expresión dentro de la célula como por la reabsorción de la L-FABP circulante que se filtró por el glomérulo. Diversos estudios clínicos han reportado el potencial como biomarcador de lesión renal. Los niveles de L-FABP ha correlacionado con el tiempo isquémico en el trasplante renal,⁶⁸ ha predicho el desarrollo de LRA en niños con cirugía cardíaca⁶⁹ y los niveles urinarios de L-FABP son significativamente más elevados en pacientes con LRA en comparación con pacientes hospitalizados que no desarrollan LRA, teniendo un rendimiento de diagnóstico similar al que presentan otros biomarcadores como NGAL y Kim-1, pero mejor que IL-18.⁷⁰ Debido a que L-FABP también se expresa en el hígado, un daño hepático podría ser un potencial contribuyente en el aumento en los niveles urinarios, sin embargo, estudios previos muestran que los niveles séricos de L-FABP no tienen influencia sobre los niveles urinarios.^{69,71}

N-acetil-β-D-glucosaminidasa (NAG). Enzima lisosomal del borde en cepillo de células epiteliales. El daño a estas células ocasiona el desprendimiento de la enzima llegando a la orina. Debido a esto, el incremento urinario de NAG se ha encontrado en pacientes con LRA, nefropatía diabética, con nefrotoxicidad por fármacos y sepsis.⁷²⁻⁷⁴

Sin embargo, existen limitaciones en el uso como biomarcador de NAG. Se ha reportado la inhibición de su actividad enzimática cuando hay presencia de iones metálicos o cuando la concentración de urea en la orina es alta. Además, existen estudios donde muestran incremento de NAG en la orina en enfermedades no renales como la artritis reumatoide e hipertiroidismo.^{75,76}

Lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL, por sus siglas en inglés). Proteína de 25 kDa con 178 aa perteneciente a la familia de lipocalinas, proteínas encargadas de transportar sustancias hidrofílicas para mantener la homeostasis celular. Se une de manera covalente a la gelatinasa provenientes de neutrófilos y se expresa en glándulas salivales, próstata, útero, pulmón, estómago y riñón.⁷⁷ Estudios transcriptómicos en modelos de roedor identificaron a NGAL como uno de los genes más regulados positivamente de manera temprana después de un daño tubular. Se ha investigado que la concentración de NGAL presenta un incremento significativo en plasma y orina, de 10 a 100 veces respectivamente, en pacientes que sufrieron un episodio de LRA en la UCI en comparación con el grupo control.^{53,78,79} Sin embargo, se ha encontrado que los niveles urinarios de NGAL se eleva de manera considerable después de una cirugía cardiaca.

2.6. Proteínas de Choque Térmico

Como es bien conocido, durante la LRA, varios mecanismos son activados para compensar el daño celular resultante; uno de ellos es el mecanismo compensatorio de

la regulación positiva de las proteínas de choque térmico (Hsp, por sus siglas en inglés), las cuales ayudan a restaurar la homeostasis celular. Las Hsp pertenecen a una familia que se encuentra, en su mayor parte, en forma constitutiva en todas las células, tanto procariotas como eucariotas.^{80,81} Estas proteínas son inducidas ante diferentes tipos de estímulos, como los son el aumento de temperatura (estímulo con el que se descubrieron),⁸⁰ diversos tipos de estrés celular, como estrés oxidante, estrés osmótico, hipoxia, entre muchos otros.⁸²

Las Hsp se han clasificado en células eucariotas de acuerdo con su peso molecular. Actualmente, existen seis familias identificadas: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 y las HSP pequeñas. Las familias HSP90 y HSP 70, en particular, tienen un papel importante en el mantenimiento de la función celular bajo condiciones normales o de estrés.⁸¹

La subfamilia de proteínas de choque térmico de 70 KDa comprende chaperonas moleculares altamente conservadas que participan en roles esenciales en la biogénesis, transporte y degradación de proteínas y está compuesta de cuatro isoformas: Hsc70, la isoforma inducible Hsp72, mHsp75 y Grp78. Hsp72 es expresada en respuesta a estrés celular y su inducción puede ser tan grande que llega a representar el 15% de las proteínas totales de la célula.^{83,84,85}

En estudios previos, se ha reportado que Hsp72 está regulado positivamente en los túbulos del riñón después de daños isquémicos o nefrotóxicos.^{86,87} Dado que después de un episodio de LRA, los segmentos S2 y S3 del túbulo proximal sufren muerte celular por necrosis y apoptosis, así como, el desprendimiento de la membrana

basal epitelial, razonamos que es posible encontrar a Hsp72 en la orina después de una isquemia renal y de esta manera fungir como un biomarcador de LRA.

En un estudio anterior de nuestro laboratorio mostramos que Hsp72 era capaz de detectar de manera temprana el desarrollo de la LRA y lo suficientemente sensible para estratificar a los diferentes grados de lesión renal, así como para controlar la eficacia de una terapia renoprotectora en ratas que se sometieron a isquemia renal bilateral.⁸⁵ Además, Hsp72 también se detectó en la orina de pacientes críticamente enfermos durante su estancia en la UCI y su elevación se presentó tres días antes de realizarse el diagnóstico de LRA mediante un incremento en la creatinina sérica. Esta elevación temprana no se presentó en otros biomarcadores evaluados, como Kim-1, IL-18 y NGAL. Kim-1, IL-18, NGAL y Hsp72 presentaron un incremento significativo dos días antes del diagnóstico. La mejor sensibilidad/especificidad se observó en Kim-1 y Hsp72 con una tasa de 83/95% y 100/90%, respectivamente, en la medición de un día antes del diagnóstico de LRA.^{85,88}

Existe poca información acerca de la especificidad de la detección en la orina de Hsp72 como un marcador de la LRA porque se desconoce si la isquemia renal puede inducir a Hsp72 en otros tejidos y si, debido al daño renal, la Hsp72 del torrente sanguíneo puede alcanzar la orina. Por otro lado, la estabilidad de Hsp72 en muestras de orina no se ha evaluado adecuadamente. Este tipo de biomarcadores no invasivos son frecuentemente analizados en muestras de orina recolectadas en bolsas junto a la cama en donde la orina queda asentada durante horas a temperatura ambiente o en muestras provenientes de estudios clínicos almacenadas por varias semanas o meses antes de la medición de Hsp72.

Este estudio se diseñó para conocer si la inducción de Hsp72, después de la LRA, es específica al tejido de corteza renal, en el que, se encuentran los segmentos S2 y S3 del túbulo proximal y para establecer la estabilidad de Hsp72 en las muestras de orina que son sometidas a ciclos de congelación/descongelación o bien, las que son almacenadas a temperatura ambiente o congeladas por periodos de tiempo prolongados.

3. HIPÓTESIS

La inducción de Hsp72, después de una LRA, es específica del tejido de la corteza renal en el que se encuentran los segmentos S2 y S3 del túbulo proximal.

La proteína Hsp72 es lo suficientemente estable en muestras de orina almacenadas bajo diferentes condiciones, lo que, le permite ser un buen biomarcador para diagnosticar la lesión renal aguda.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVOS GENERALES

Determinar si la inducción de Hsp72 es específica de la corteza renal en un episodio de LRA.

Determinar la estabilidad temporal de Hsp72 en muestras de orina almacenadas a temperatura ambiente y en congelación por largos periodos de tiempo y en ciclos de congelación/descongelación.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- ✓ Establecer si la inducción de Hsp72 es específica de la corteza renal después de un episodio de I/R.

- ✓ Monitorear la estabilidad de Hsp72 en muestras de orina de ratas con daño por I/R y sometidas a diferentes ciclos de congelación/descongelación, almacenadas a temperatura ambiente o mantenidas por periodos prolongados de congelación.

- ✓ Monitorear la estabilidad de Hsp72 en muestras de orina de pacientes diagnosticados con LRA y que fueron sometidas a diferentes ciclos de congelación/descongelación o almacenadas a temperatura ambiente.

5. METODOLOGÍA

Todos los experimentos y procedimientos que involucraron animales se llevaron de acuerdo con las recomendaciones en la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de animales de experimentación del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, y del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”. Todas las cirugías fueron realizadas bajo la anestesia de pentobarbital sódico y se hicieron esfuerzos para minimizar el sufrimiento.

Las muestras de humanos fueron obtenidas de acuerdo con las directrices y regulaciones nacionales e internacionales, y fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

5.1. Modelo animal de daño renal por I/R

Se utilizaron 40 ratas Wistar macho de un peso entre 300 a 330 g y fueron divididas en dos grupos: cirugía falsa o sham (n=21) y el que se sometió a isquemia renal bilateral de 45 minutos (n=19). Las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (30 mg/kg) vía intraperitoneal y se colocaron en una almohadilla térmica para mantener la temperatura corporal en 37 °C. Posteriormente se realizó una incisión sobre la línea media abdominal y ambos pedículos renales fueron expuestos. La isquemia renal bilateral se indujo al interrumpir el flujo sanguíneo en ambos riñones mediante la colocación de un clip en cada arteria renal durante 45 min. La isquemia se verificó

visualmente por el cambio de color en el riñón. Se permitió la reperfusión al remover los clips y se confirmó por el regreso de sangre oxigenada al riñón. Se suturó la incisión del abdomen con suturas de 3-0. Las ratas sometidas a cirugía falsa (Sham), se manipularon de la misma forma que las que fueron sometidas a I/R, pero sin la colocación de los clips. Posterior a la cirugía, todos los animales fueron colocados en jaulas metabólicas para la recolección de orina de 24 h. Todos los animales se mantuvieron en ciclos de día-noche de 12:12 h con acceso libre a agua y comida.

5.2. Parámetros funcionales

Después de 24 h de reperfusión, al menos 12 ratas por grupo fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (30 mg/kg). Las muestras de sangre se recolectaron al final del estudio. La concentración de creatinina en suero y orina se determinó por medio del ensayo comercial QuantiChromcreatinine (DICT-500, Hayward, CA), basado en la reacción con ácido pícrico y se cuantificó a 510 nm en el espectrofotómetro; junto con la determinación de la creatinina en la orina, se calculó la depuración de creatinina utilizando la ecuación: $C = (U \cdot V) / S$, en donde U es la creatinina en la orina, V representa el volumen urinario en el tiempo de recolección, y S corresponde a la creatinina sérica. La excreción de proteínas en la orina se determinó por el método de turbidimetría con ácido tricloroacético, cuantificado a 420 nm, en las orinas recolectadas durante 24 h.⁸⁹

5.3. Extracción de tejidos

Una vez recolectadas las muestras para los estudios funcionales, las ratas se sometieron a una laparotomía para exponer y remover: intestino, pulmón, hígado, corazón, cerebro, corteza y médula renal. La corteza y médula renal fueron separadas por microdissección. Todos los tejidos fueron congelados a -80 °C hasta su uso.

5.4. Almacenamiento y manejo de orinas

Las muestras de orinas recolectadas provenientes del grupo control (n=11) y del grupo con isquemia (n=8) fueron divididas en 6 alícuotas (cada una de 200 µL) por cada rata para posteriores análisis usando varios periodos de almacenamiento a temperatura ambiente y con ciclos de congelamiento/descongelamiento, como se describe a continuación:

Estabilidad de Hsp72 a temperatura ambiente: 5 alícuotas de cada rata fueron mantenidas a temperatura ambiente por tres días y los niveles de Hsp72 fueron medidos después de 0, 3, 24, 48 y 72 h.

Estabilidad de Hsp72 durante ciclos de congelamiento/descongelamiento: Una alícuota de orina de cada rata control (n=11) y cada rata con isquemia (n=8) se almacenó a -80 °C por cinco días. Cada 24 h, las alícuotas se descongelaron para la determinación de Hsp72 y después se congelaron de nuevo, hasta completar cinco ciclos.

Estabilidad de Hsp72 en muestras almacenadas a -80 °C por 11 meses: Para este ensayo, se incluyeron otros dos grupos de ratas: control (n = 7) e I/R (n = 7). La orina de cada rata se almacenó en 12 alícuotas a -80 °C. Cada mes, una alícuota se descongeló para la cuantificación de los niveles de Hsp72 urinaria. Posterior a la medición, la alícuota fue eliminada.

5.5. Efecto de la temperatura ambiente y ciclos de congelamiento/descongelamiento en muestras de orina de pacientes diagnosticados con LRA

Muestras de orina de seis voluntarios sanos y diez pacientes con LRA, provenientes de la UCI, fueron analizadas. La LRA se definió como un incremento del 30% o más en la creatinina sérica basal de acuerdo con el criterio AKIN.⁴⁹ Las orinas se dividieron en diferentes alícuotas, las cuales se mantuvieron a temperatura ambiente durante 72 h o sometidas a cinco ciclos de congelamiento/descongelamiento.

5.6. Extracción de proteínas y Western Blot

Los diferentes tejidos se homogenizaron en amortiguador de lisis (50 mM HEPES, pH 7.4, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1%, IGEPAL e inhibidor de proteasas), las muestras fueron centrifugadas a 13 000 rpm por 15 min a 4 °C y se obtuvieron las proteínas totales. La concentración de proteínas fue determinada por el método de

Lowry⁹⁰ usando el estuche comercial para proteína Bio-Rad. Diez miligramos de proteína, 1 μ L de plasma o 15 μ L de orina fueron mezclados con amortiguador de carga (6% SDS, 15% glicerol, 150 mM Tris, azul de bromofenol al 3% y β -mercaptoetanol 2% pH 7.6). Las proteínas fueron desnaturalizadas a 95 °C por 5 minutos y fueron corridas en un gel SDS-PAGE al 8.5%.

Las proteínas se transfirieron a membranas de difloruro de polivinilo (PVDF, AmrshamPharmaciaBiotech, Piscataway, NJ, USA), previamente equilibrados con amortiguador de transferencia 1X (190 mM glicina, 2 mM Tris base, SDS 0.1%, 200 mL Metanol) en un trans-blot (SD Cell, BioRad) durante 60 minutos a 9 V y se bloquearon por 90 minutos a temperatura ambiente en TBS-T y agente bloqueante (BioRad) al 5%.

Después del bloqueo, las membranas se incubaron toda la noche a 4 °C con el anticuerpo monoclonal anti-Hsp72 (1:5000 para tejidos y 1:10 000 para plasma, Enzo LifeSciences, Farmingdale, NY) o con el anticuerpo anti-actina (1:5000, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX). Al siguiente día, las membranas se lavaron tres veces cada 10 minutos con TBS-T. Posteriormente, se incubaron con un anticuerpo secundario: IgG goat-antimouse conjugado a peroxidasa (1:5000 para tejidos y 1:20 000 para plasma, Santa Cruz) o IgG donkey-anti-goat conjugado a peroxidasa (1:5000, Santa Cruz) durante 90 minutos a temperatura ambiente y las membranas nuevamente fueron lavadas (6 veces).

Las proteínas se detectaron utilizando el estuche comercial de quimio-luminiscencia (Millipore, Billerica, MA) mediante radiografía de las bandas, las cuales se escanearon para el análisis densitométrico.

5.7. Detección de Hsp72 mediante ELISA

La concentración urinaria de Hsp72 se analizó con el ensayo comercial de ELISA (Enzo LifeSciences). Las muestras fueron colocadas dentro de pozos que contienen anticuerpos para Hsp72 en su superficie, los cuales capturan a las proteínas Hsp72 presentes en la muestra. Posteriormente, se agregó un segundo anticuerpo anti-Hsp72. Se llevaron a cabo tres lavados y se adicionó un anticuerpo acoplado a una peroxidasa de rábano, que es capaz de unirse al anticuerpo anti-Hsp72. Por último, se adicionó el sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, la reacción se detuvo y la densidad óptica se midió a 450 nm. La densidad óptica de las muestras se interpolaron usando una curva estándar y las concentraciones se calcularon.

5.8. Muestras de orina de pacientes diagnosticados con LRA

Se analizó la presencia de Hsp72 en muestras de orina de pacientes diagnosticados con LRA y voluntarios sanos mediante Western blot y se sometieron a las mismas condiciones de almacenamiento de temperatura (temperatura ambiente y a -80°C). La determinación de la concentración de Hsp72 se realizó a través de ELISA.

5.9. Análisis estadístico

Los datos se presentan como el promedio +/- el error estándar. Los resultados de diferentes periodos de tiempo fueron analizados con una prueba *t* de “student” pareada y la diferencia entre el grupo control y el grupo sometido a isquemia con una prueba de *t* de “student”. Para las muestras almacenadas por 11 meses, los resultados se analizaron con una correlación de Spearman y la correlación de intraclass. La diferencia estadística fue definida como significativa cuando el valor de *p* fue <0.05.

6. RESULTADOS

El daño renal inducido por un episodio de I/R se demostró por el descenso significativo en la depuración de creatinina (Fig. 4A) y el incremento de proteinuria (Fig. 4B) en los animales sometidos a una isquemia de 45 minutos después de 24 horas de la cirugía.

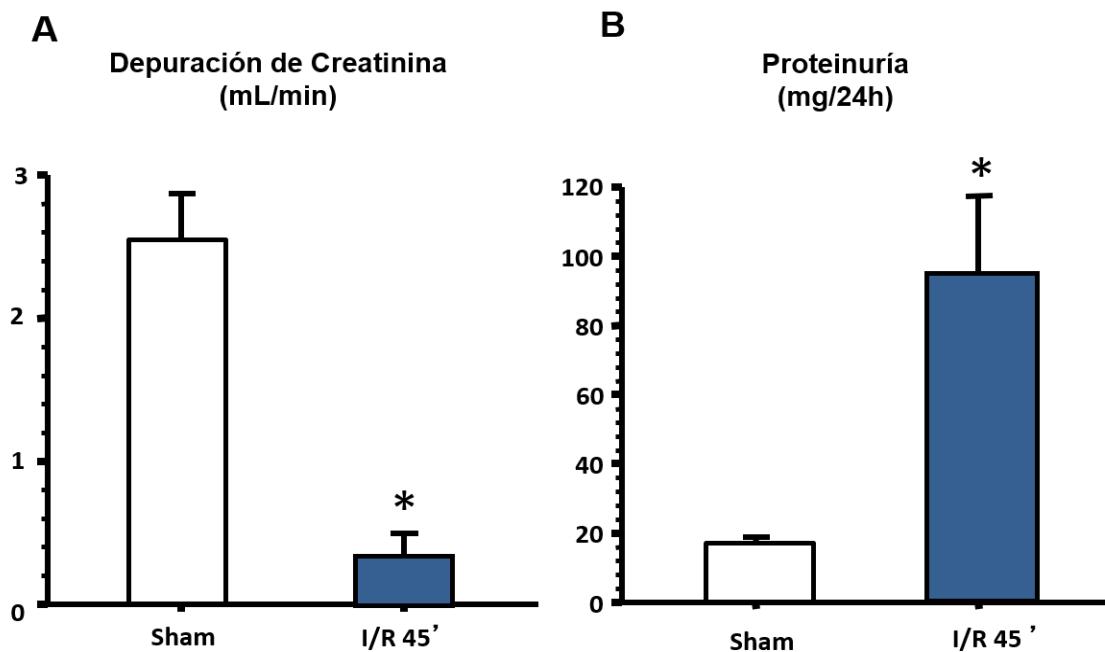


Figura 4. Daño renal inducido por I/R. A) Función renal evaluada por la depuración de creatinina y B) excreción de proteínas urinarias. Las barras blancas representan el grupo sham (n=14) y las barras azules al grupo de I/R (n=12). Promedio \pm ES. *p<0.05 vs grupo sham.

Una vez que ocurre el daño por isquemia renal, las estructuras de la nefrona más afectadas son el segmento S2 y S3 del túbulo proximal, localizado en la corteza renal. Para determinar si el daño por I/R también induce la expresión de Hsp72 en la médula renal o en otros tejidos, los niveles de Hsp72 fueron determinados en la corteza renal y

médula renal, así como, en el cerebro, hígado, intestino, pulmón y corazón. En la Figura 5 aparecen las fotografías del análisis por Western blot para Hsp72 y para actina para los grupos controles y sometidos I/R como se detalla en la figura y debajo de los mismos se encuentra la relación del valor medio entre Hsp72 y la actina, obtenida mediante el análisis densitométrico. La expresión de Hsp72 en la corteza renal aumentó de manera significativa poco más de tres veces en los animales que sufrieron un periodo de I/R en comparación con el grupo control (Fig. 5A). En contraste, los niveles de Hsp72 permanecieron sin alteración en la médula renal de las ratas del grupo I/R (Fig. 5C). De manera similar, la expresión de Hsp72 no se modificó en el cerebro, pulmón, intestino, corazón e hígado de ratas del grupo I/R (Fig. 5B, D, E, F, G). Tampoco encontramos que los niveles de Hsp72 en plasma fueran modificados en los animales con isquemia en comparación con el grupo control (Fig. 5H).

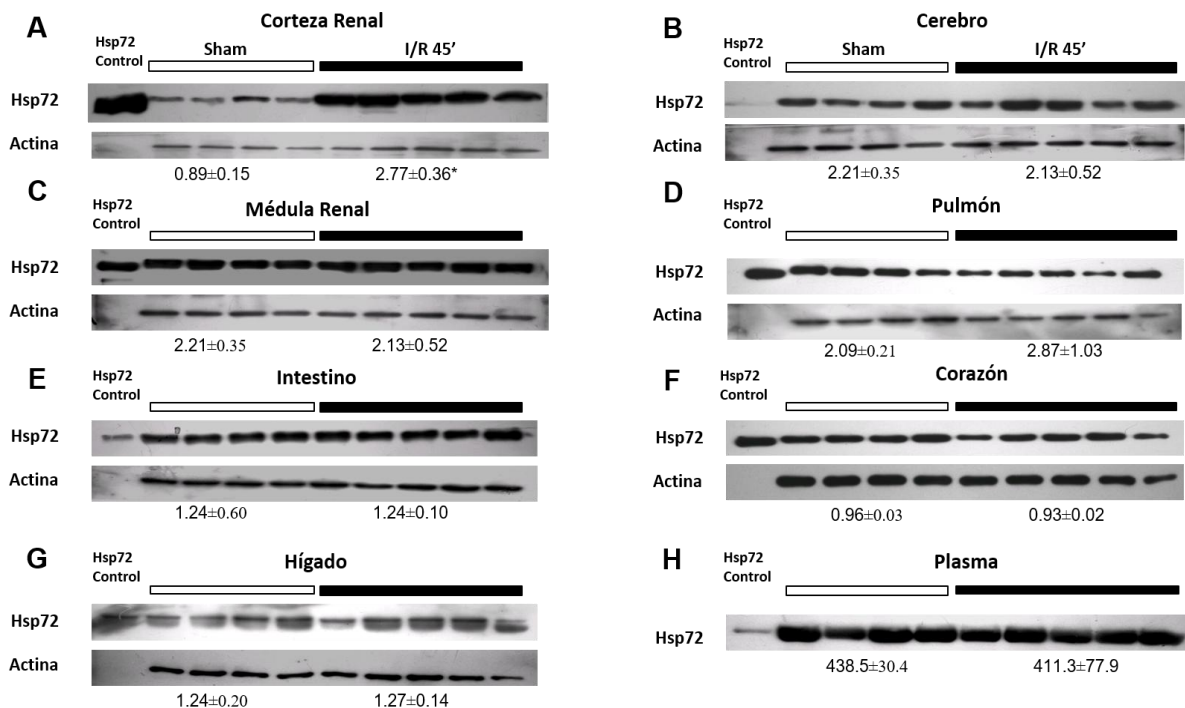


Figura 5. Expresión de Hsp72 en otros tejidos. A) Corteza renal B) Cerebro C) Médula renal D) Pulmón E) Intestino E) Corazón G) Hígado H) Plasma. De ratas del grupo sham (n=4) y ratas con isquemia de 45 min y reperusión de 24 h (n=5). En cada WB, una proteína Hsp72 recombinante fue incluida como control positivo. Promedio ± ES. *p<0.05 vs grupo sham.

A continuación, se determinó la estabilidad de Hsp72 en muestras de orina bajo diferentes condiciones de almacenamiento. Primero, se evaluó la estabilidad de Hsp72 en muestras de orina mantenidas a temperatura ambiente por tres días. El comportamiento de la concentración de Hsp72 en la orina de ratas control y de animales isquémicos dejadas a temperatura ambiente por 0, 3, 24, 48 y 72 horas se muestra en la Figura 6. El daño renal inducido por I/R fue asociado por un incremento significativo en los niveles urinarios de Hsp72 desde las 0 h (2.96 ng/mL contra 0.16 ng/mL en ratas control) y permaneció elevada y estable durante las primeras 48 horas a temperatura ambiente. Los niveles de Hsp72 tienden a incrementarse, pero no alcanzó la diferencia estadística cuando el valor de 72 h se comparó con el valor obtenido a las 0 horas. Se piensa que este efecto puede ser el resultado del crecimiento bacteriano observado en las muestras mantenidas a temperatura ambiente por 72 horas. Por consiguiente, los coeficientes de variación fueron 0.39, 0.32 y 0.46 para 24, 48 y 72 horas, respectivamente en el grupo de I/R. Así, las muestras de orina colectadas a temperatura ambiente y colocadas de 0 a 48 horas son adecuadas para analizar la concentración de Hsp72.

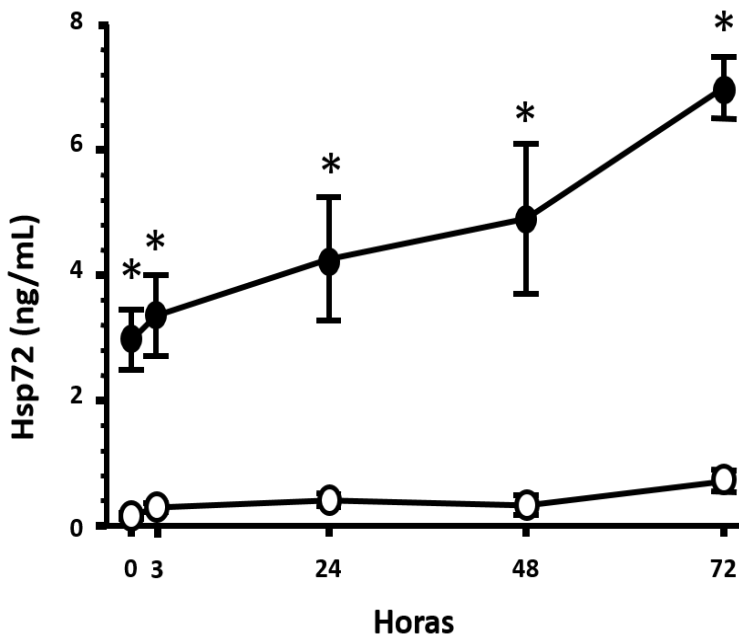


Figura 6. Estabilidad de Hsp72 a temperatura ambiente por tres días. Círculos blancos representan el grupo sham (n=11) y los círculos negros representan las ratas del grupo con I/R (n=8). Promedio \pm ES. *p<0.05 vs grupo sham.

Después, se estudió el efecto de ciclos de congelamiento/descongelamiento en la estabilidad de Hsp72. Para este propósito, la misma muestra de orina fue expuesta a cinco ciclos de congelación/descongelación cada 24 horas durante cinco días. Como se muestra en la Figura 7, los niveles de Hsp72 fueron más elevados en el grupo de I/R y permanecieron constantes, incluso después del quinto ciclo de congelamiento/descongelamiento. Los coeficientes de variación fueron 0.19, 0.17, 0.24 y 0.25 para el segundo, tercero, cuarto y quinto ciclo de congelamiento/descongelamiento en orinas del grupo de I/R, respectivamente.

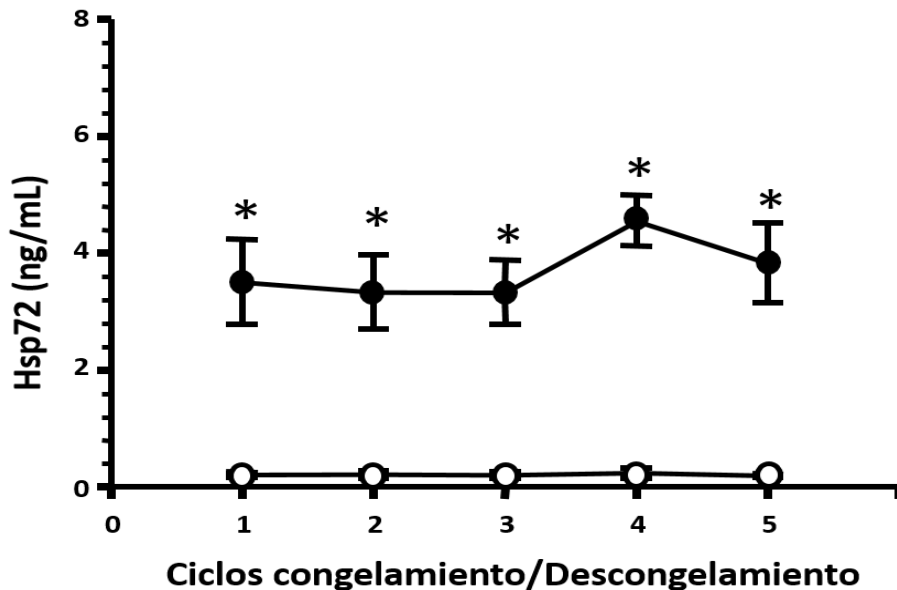


Figura 7. Estabilidad de Hsp72 durante cinco ciclos de congelamiento/descongelamiento. Círculos blancos representan el grupo sham (n=11) y los círculos negros representan las ratas del grupo con I/R (n=8). Promedio \pm ES. *p<0.05 vs grupo sham.

También se analizó la estabilidad de Hsp72 en almacenamiento por periodos prolongados de tiempo (a -80 °C). Como se muestra en la Figura 8, los niveles urinarios de Hsp72 en el grupo de I/R son reproducibles en muestras congeladas en los primeros nueve meses y fueron, como era de esperarse, significativamente más altos que el grupo control. La uniformidad de los niveles urinarios de Hsp72 durante los primeros

nueve meses fue confirmada por la correlación de Spearman evaluada en cada mes y comparada con los niveles urinarios de Hsp72 desde el primer mes. Las correlaciones de Spearman fueron: 0.89, 0.89, 0.86, 0.96, 0.93, 0.93, 0.93, 0.89, 0.32 y 0.31 para 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11 meses, respectivamente. Además, se realizó un análisis de confianza usando el coeficiente de correlación intraclase. Encontramos una excelente correlación dentro de los primeros nueve meses. Así, la correlación intraclase para mediciones individuales fue de 0.944 ($p < 0.001$) y la correlación intraclase para el promedio de las mediciones fue de 0.992 ($p < 0.001$). Cuando todos los meses fueron analizados, el coeficiente de la correlación intraclase para el promedio de las mediciones permaneció significativo (0.961, $p < 0.001$), pero la correlación intraclase para las mediciones individuales fue menor (0.689, $p < 0.001$). Estos resultados muestran que los niveles urinarios de Hsp72 mantenidas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ son estables durante los primeros nueve meses de su almacenamiento.

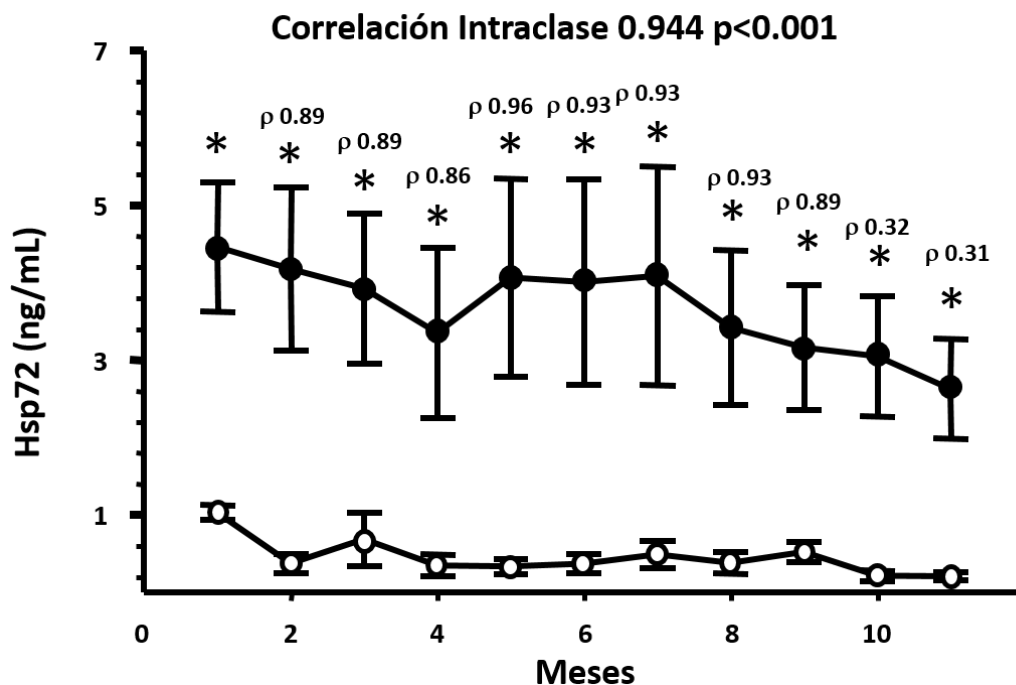


Figura 8. Estabilidad de Hsp72 en muestras almacenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 11 meses. Círculos blancos representan el grupo sham ($n=7$) y los círculos negros representan las ratas del grupo con I/R ($n=7$). Promedio \pm ES. * $p < 0.05$ vs grupo sham.

6.1. Efecto de la temperatura ambiente y de ciclos de congelamiento/descongelamiento en muestras de orina de pacientes diagnosticados con LRA

La tabla 1 muestra las características basales de los pacientes con LRA. Diez pacientes diagnosticados con LRA y seis voluntarios sanos fueron incluidos. La principal causa de LRA fue shock séptico. El promedio basal de la creatinina sérica fue de 0.83 ± 0.12 mg/dL y se elevó a 4.2 ± 0.88 mg/dL, cuando los pacientes fueron diagnosticados con LRA. La mayoría de los pacientes fueron clasificados como AKIN 3 al usar el criterio AKIN.

Tabla 1. Características basales de los pacientes con LRA

Número de paciente	Género	Edad (años)	Creatinina Sérica basal (mg/dL)	Creatinina sérica en admisión (mg/dL)	Diagnóstico	Clasificación AKIN
1	Femenino	77	0.76	3.1	Sepsis	AKIN 3
2	Femenino	40	0.5	3.2	Sepsis	AKIN 3
3	Femenino	51	0.87	3.1	Sepsis	AKIN 3
4	Femenino	46	0.62	1.5	Sepsis	AKIN 3
5	Femenino	71	0.69	9.9	Nefritis	AKIN 3
6	Femenino	75	0.7	5.2	Nefritis	AKIN 3
7	Masculino	32	0.55	1.5	Sepsis	AKIN 2
8	Masculino	77	1.1	5.7	Sepsis	AKIN 3
9	Masculino	58	0.5	1.6	Sepsis	AKIN 3
10	Femenino	76	1.7	7.2	Sepsis	AKIN 3

Los niveles urinarios de Hsp72 fueron analizados mediante Western blot y por ELISA en muestras de orina de pacientes diagnosticados con LRA y comparados con voluntarios sanos como se muestra en la Figura 9. El Western blot muestra (Fig. 9A) que Hsp72 es prácticamente indetectable en los voluntarios sanos, en contraste con aquellos de los pacientes con LRA, en donde se observa un notable incremento de Hsp72. Los niveles urinarios de Hsp72 no fueron afectados en muestras mantenidas durante 72 h a temperatura ambiente. Con una correlación de 0.94 ($p < 0.001$) (Fig. 9B).

Además, los cinco ciclos de congelación/descongelación no afectaron la concentración de Hsp72 en las muestras de orina de pacientes con LRA (Fig. 9C). Estos resultados son acorde con los observado en muestras de orina de ratas bajo un episodio de I/R.

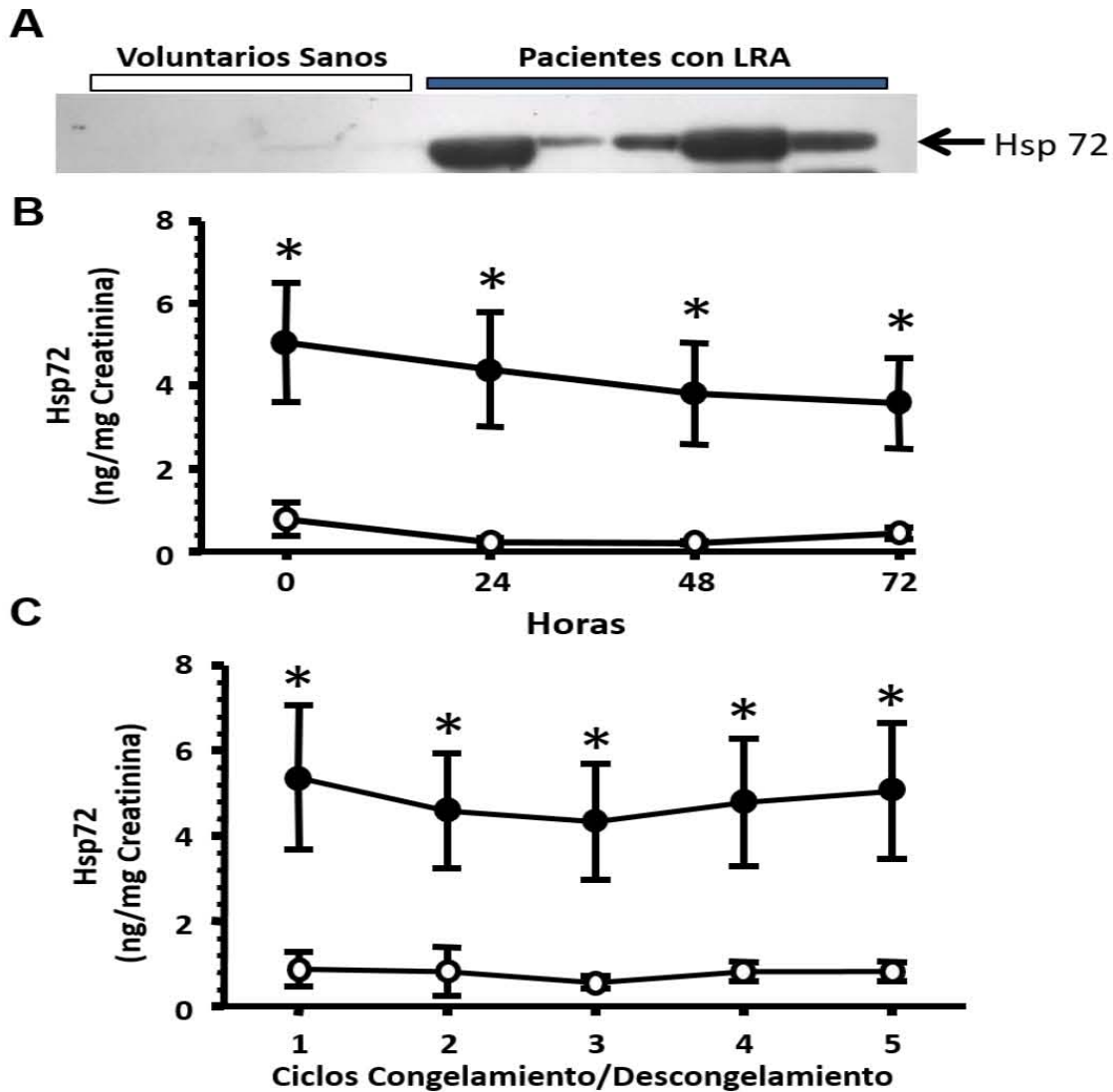


Figura 9. Efecto de la temperatura ambiente y ciclos de congelado/descongelado en muestras de orina de pacientes con LRA y voluntarios sanos. A) Western blot de Hsp72 B) Niveles urinarios de Hsp72 de muestras dejadas a temperatura ambiente C) Niveles urinarios de Hsp72 de muestras de orina de humano bajo cinco ciclos de congelamiento/descongelamiento. Círculos blancos representan voluntarios sanos (n=6) y los círculos negros representan a pacientes con LRA (n=10). Promedio \pm ES. *p<0.05 vs voluntarios sanos.

7. DISCUSIÓN

A nivel mundial, la LRA afecta entre el 7% y el 18% de los pacientes hospitalizados, con una tasa de 20% de mortalidad, mientras que, la incidencia de LRA en pacientes críticamente enfermos varía entre el 30 al 60%.^{39,40} A pesar de los recientes avances en el conocimiento de la patofisiología de la LRA, la tasa de la incidencia y la mortalidad se mantiene alta, en parte debido a la falta de una prueba diagnóstica efectiva para detectar de manera temprana la LRA; por lo tanto, la identificación de nuevos biomarcadores sensibles para el diagnóstico de LRA impactará en la eficacia de estrategias terapéuticas.^{29,30}

Un biomarcador de LRA debe poseer las siguientes características: debe producirse en el sitio de daño, su concentración debe reflejar la severidad del daño renal, debe medirse fácilmente en sangre o en orina y debe ser razonablemente estable en fluidos corporales.¹ Un avance significativo es el estudio de proteínas urinarias para identificar biomarcadores no invasivos de enfermedades renales. Recientemente, hemos demostrado que Hsp72 es un biomarcador sensible y temprano de LRA inducido por un proceso isquémico o por sustancias tóxicas y que es capaz de estratificar los diferentes grados de daño,⁸⁵ sin embargo, no se había explorado si la inducción de Hsp72 es única de la corteza renal, donde están localizados los túbulos proximal y son afectados por isquemia renal o por fármacos nefrotóxicos. En este trabajo, encontramos que la expresión de Hsp72 se incrementó de manera significativa en la corteza renal de ratas bajo un daño por I/R y que fue de 3.3 veces y este aumento no se observó en ningún otro tejido estudiado incluyendo el plasma. Esto significa que

el incremento en la concentración de Hsp72 encontrada en las muestras de orina es un reflejo del daño ocasionado en el túbulo proximal. Respaldando estos resultados, nosotros previamente encontramos que, en pacientes críticamente enfermos con dos o más fallas orgánicas, los niveles de Hsp72 sólo se incrementaron en los pacientes diagnosticados con LRA.⁸⁵ Además, recientemente mostramos que Hsp72 es suficientemente sensible y específica para predecir LRA en pacientes críticamente enfermos hasta tres días antes del diagnóstico. La sensibilidad/especificidad 1 o 2 días antes de la LRA fue 100/90%. Asimismo, la sensibilidad, especificidad y exactitud en la prueba de validación para Hsp72 fue 100%, 83.3% y 90.9%, respectivamente.⁸⁸ Estos resultados demuestran la especificidad de este biomarcador por su eficiencia en detectar la LRA.

Aunque puede haber poca variabilidad técnica en el proceso de laboratorio, el nivel de Hsp72 en una muestra individual puede variar considerablemente debido a la exposición a diferentes temperaturas o el almacenamiento durante un periodo prolongado. Este problema es crítico para asegurar que las muestras estudiadas muestran una variación mínima y para conocer con qué periodo de tiempo las muestras deben almacenarse y estudiarse en ensayos clínicos grandes sin afectar a la cuantificación de Hsp72. Por lo tanto, en este trabajo evaluamos la estabilidad de Hsp72 en muestras de orina de ratas con cirugía falsa y de ratas con I/R expuestas a varias temperaturas de almacenamiento o a ciclos repetidos de congelamiento/descongelamiento.

Nuestros datos nos muestran que congelar y descongelar las muestras cinco veces no se asoció con pérdida o degradación de Hsp72 en las muestras de orina de

las ratas control ni en las del grupo con I/R. Además, es altamente estable durante un almacenamiento a temperatura ambiente (48 h) y por un periodo prolongado de tiempo de hasta 9 meses a -80°C . Este último punto es muy importante y crítico para hacer determinaciones confiables sobre todo cuando las muestras serán almacenadas por más de un año, por ejemplo.

Estos resultados también se observaron en muestras de orina de pacientes diagnosticados con LRA mantenidas a temperatura ambiente o sometidas a los ciclos de congelamiento/descongelamiento.

En resumen, nuestros resultados indican que Hsp72 es un biomarcador específico y un indicador estable de LRA en muestras almacenadas por varios meses o almacenadas por periodos cortos de tiempo a temperatura ambiente, o cuando las muestras se exponen a diversos ciclos de congelamiento/descongelamiento.

8. CONCLUSIONES

La inducción de Hsp72 durante un episodio de LRA, sólo ocurrió en la corteza renal, por lo tanto Hsp72 es un biomarcador específico para detectar el daño renal inducido por un periodo de I/R.

Nuestros resultados indican que los niveles de Hsp72 se mantienen razonablemente estables en muestras de humanos y roedores, ya que la concentración de Hsp72, no se modificó durante las primeras 48 h a temperatura ambiente, ni por los ciclos de congelación/descongelación. Y permaneció estable en las muestras congeladas y almacenadas por 9 meses de los roedores.

Las características que se han encontrado en esta proteína la hace una excelente candidata para ser utilizada en la clínica y de esta forma permitir un diagnóstico temprano y certero, lo que sin duda impactará en el tratamiento y la evolución de LRA.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Taal MW, Chertow GM, Brenner BM, Marsden PA, Skorecki K. *The Kidney*. Vol 1. 9th Editio. Elsevier; 2012.
2. Guyton AC, Hall JE. *Textbook of MEdical Physiology*. 11th Editi.; 2006.
3. Eaton DC, Pooler JP. *Vander's Renal Physiology*.; 2009.
4. Li W, Hartwing S, Roseblum ND. Developmental Origins and Functions of Stromal Cells in the Normal and Diseased Mammalian Kidney. *Dev Dyn*. 2014;243:853-863. doi:10.1002/DVDY.24134.
5. Puelles VG, Hoy WE, Hughson MD, Diouf B, Douglas-Denton RN, Bertram JF. Glomerular number and size variability and risk for kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2011;20(1):7-15. doi:10.1097/MNH.0b013e3283410a7d.
6. Scott RP, Quaggin SE. The cell biology of renal filtration. *J Cell Biol*. 2015;209(2):199-210. doi:10.1083/jcb.201410017.
7. Dressler GR. The Cellular Basis of Kidney Development. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2006;22:509-529. doi:10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104340.
8. Stein JH, Fadem SZ. The Renal Circulation. *JAMA*. 1978;239(13):1308-1312. doi:10.1001/jama.1978.03280400048019.
9. Bonventre J V, Yang L. Science in medicine Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest*. 2011;121(11):4210-4221. doi:10.1172/JCI45161.4210.

10. Lombardi D, Becherucci F, Romagnani P. How much can the tubule regenerate and who does it ? An open question. *Nephrollogy Dial.* 2016;(July 2015):1243-1250. doi:10.1093/ndt/gfv262.
11. Tao Li PK, Burdmann EA, Mehta RL. Acute kidney injury: global health alert. *J Nephropathol.* 2013;2(2):90-97. doi:10.12860/JNP.2013.15.
12. Liaño F, Felipe C, Tenorio MT, et al. Long-term outcome of acute tubular necrosis: a contribution to its natural history. *Kidney Int.* 2007;71(7):679-686. doi:10.1038/sj.ki.5002086.
13. Bucaloiu ID, Kirchner HL, Norfolk ER, Hartle JE, Perkins RM. Increased risk of death and de novo chronic kidney disease following reversible acute kidney injury. *Kidney Int.* 2012;81(5):477-485. doi:10.1038/ki.2011.405.
14. Thadhani R, Pascual M, Bonventre J V. Acute renal failure. *N Engl J Med.* 1986;23 Suppl:1448-1460.
15. Basile DP, Anderson MD, Sutton TA. Pathophysiology of Acute Kidney Injury. *Compr Physiol.* 2014;2(2):1303-1353. doi:10.1002/cphy.c110041.Pathophysiology.
16. Bonventre J V. Pathophysiology of AKI : Injury and Normal and Abnormal Repair. *Contribributions to Nephrol.* 2010;165:9-17.
17. Lameire N, Biesen W Van, Vanholder R. Acute renal failure. *Lancet.* 2005;365:417-430.
18. Cooper JE, Wiseman AC. Acute kidney injury in kidney transplantation. *Dial*

- Transplant.* 2013;22(6):698-703. doi:10.1097/MNH.0b013e328365b388.
19. Kurata H, Takaoka M, Kubo Y, et al. Protective effect of nitric oxide on ischemia/reperfusion-induced renal injury and endothelin-1 overproduction. *Eur J Pharmacol.* 2005;517(3):232-239. doi:10.1016/j.ejphar.2005.05.026.
 20. Kwon O, Hong S-M, Ramesh G. Diminished NO generation by injured endothelium and loss of macula densa nNOS may contribute to sustained acute kidney injury after ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009;296(1):F25-F33. doi:10.1152/ajprenal.90531.2008.
 21. Basile DP. The endothelial cell in ischemic acute kidney injury: implications for acute and chronic function. *Kidney Int.* 2007;72(2):151-156. doi:10.1038/sj.ki.5002312.
 22. Awad AS, Rouse M, Huang L, et al. Compartmentalization of neutrophils in the kidney and lung following acute ischemic kidney injury. *Kidney Int.* 2009;75(7):689-698. doi:10.1038/ki.2008.648.
 23. Jang HR, Rabb H. The innate immune response in ischemic acute kidney injury. *Clin Immunol.* 2009;130(1):41-50. doi:10.1016/j.clim.2008.08.016.
 24. Bonventre J V., Brezis M, Siegel N, Rosen S, Portilla D, Ventakatachalam M. Acute Renal Failure. I. Relative importance of proximal vs distal tubular injury. *Am J Physiol.* 1998;(61):623-631.
 25. Leemans JC, Stokman G, Claessen N, et al. Renal-associated TLR2 mediates ischemia/reperfusion injury in the kidney. *J Clin Invest.*

- 2005;115(10):2894-2903. doi:10.1172/JCI22832.
26. **Pulskens WP, Teske GJ, Butter LM, et al. Toll-like receptor-4 coordinates the innate immune response of the kidney to renal ischemia/reperfusion injury. *PLoS One*. 2008;3(10):1-9. doi:10.1371/journal.pone.0003596.**
 27. **Humphreys BD, Valerius MT, Kobayashi A, et al. Intrinsic Epithelial Cells Repair the Kidney after Injury. *Cell Stem Cell*. 2008;2(3):284-291. doi:10.1016/j.stem.2008.01.014.**
 28. **Barrera-chimal J, Pérez-villalva R, Ortega JA, et al. Mild ischemic Injury Leads to Long-Term Alterations in the Kidney : Amelioration by Spironolactone Administration. *Int J Biol Sci*. 2015;11(4):892-900. doi:10.7150/ijbs.11729.**
 29. **Rodríguez-Romo R, Benítez K, Barrera-Chimal J, et al. AT1 receptor antagonism before ischemia prevents the transition of acute kidney injury to chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2015:1-11. doi:10.1038/ki.2015.320.**
 30. **Barrera-Chimal J, Pérez-Villalva R, Rodríguez-Romo R, et al. Spironolactone prevents chronic kidney disease caused by ischemic acute kidney injury. *Kidney Int*. 2012:93-103. doi:10.1038/ki.2012.352.**
 31. **Yang L, Besschetnova TY, Brooks CR, Shah J V, Bonventre J V. Epithelial cell cycle arrest in G2/M mediates kidney fibrosis after injury. *Nat Med*. 2010;16(5):535-543. doi:10.1038/nm.2144.**
 32. **Ferenbach DA, Bonventre J V. Mechanisms of maladaptive repair after AKI**

- leading to accelerated kidney ageing and CKD. *Nat Publ Gr.* 2015:1-13.
doi:10.1038/nrneph.2015.3.
33. Chawla LS, Kimmel PL. Acute kidney injury and chronic kidney disease : an integrated clinical syndrome. *Kidney Int.* 2012;82(5):516-524.
doi:10.1038/ki.2012.208.
34. Hill C, Jain A, Takemoto H, et al. Targeted proximal tubule injury triggers interstitial fibrosis and glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 2012;82(2):172-183.
doi:10.1530/ERC-14-0411.Persistent.
35. Basu RK, Hubchak S, Hayashida T, Runyan CE, Schumacker PT, Schnaper HW. Interdependence of HIF-1 α and TGF- β /Smad3 signaling in normoxic and hypoxic renal epithelial cell collagen expression. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2011;300:F898-F905. doi:10.1152/ajprenal.00335.2010.
36. Coca SG, Singanamala S, Parikh CR. Chronic kidney disease after acute kidney injury: A systematic review and meta-analysis. *Kidney Int.* 2012;81(5):442-448. doi:10.1038/ki.2011.379.Chronic.
37. Ali T, Khan I, Simpson W, et al. Incidence and outcomes in acute kidney injury: a comprehensive population-based study. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(4):1292-1298. doi:10.1681/ASN.2006070756.
38. Hsu C-Y, McCulloch CE, Fan D, Ordoñez JD, Chertow GM, Go AS. Community-based incidence of acute renal failure. *Kidney Int.* 2007;72(2):208-212. doi:10.1038/sj.ki.5002297.

39. Lafrance JP, Miller DR. Acute kidney injury associates with increased long-term mortality. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(2):345-352.
doi:10.1681/ASN.2009060636.
40. Schetz M, Darmon M. Measuring acute kidney injury around the world: are we using the right thermometer (and adequately)? *Intensive Care Med*. 2015;41(10):1857-1859. doi:10.1007/s00134-015-3972-1.
41. Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, et al. [Acute renal failure in critically ill patients]. *JAMA*. 2005;294(7):813-818. doi:10.4045/tidsskr.10.34549.
42. Murugan R, Kellum JA. Acute kidney injury: what's the prognosis? *Nat Rev Nephrol*. 2011;7(4):209-217. doi:10.1038/nrneph.2011.13.
43. Harris DG, Mccrone MP, Koo G, et al. Epidemiology and outcomes of acute kidney injury in critically ill. *J Crit Care*. 2014. doi:10.1016/j.jcrc.2014.07.028.
44. Waikar SS, Liu KD, Chertow GM. Diagnosis, epidemiology and outcomes of acute kidney injury. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3(3):844-861.
doi:10.2215/CJN.05191107.
45. Rewa O, Bagshaw SM. Acute kidney injury-epidemiology, outcomes and economics. *Nat Rev Nephrol*. 2014;10(4):193-207.
doi:10.1038/nrneph.2013.282.
46. Chertow GM, Burdick E, Honour M, Bonventre J V, Bates DW. Acute Kidney Injury, Mortality, Length of Stay, and Costs in Hospitalized Patients. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16:3365-3370. doi:10.1681/ASN.2004090740.

47. Méndez-Duran A, Méndez-Bueno JF, Tapia-Yáñez T, Muñoz Montes A, Aguilar-Sánchez L. Epidemiología de la insuficiencia renal crónica en México. *Diálisis y Traspl.* 2010;31(1):7-11.
48. Ricci Z, Cruz DN, Ronco C. Classification and staging of acute kidney injury : beyond the RIFLE and AKIN criteria. *Nat Publ Gr.* 2011;7(4):201-208. doi:10.1038/nrneph.2011.14.
49. Mehta RL, Chertow GM. Acute Renal Failure Definitions and Classification: Time for Change? *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(8):2178-2187. doi:10.1097/01.ASN.0000079042.13465.1A.
50. Waikar SS, Bonventre J V. Creatinine kinetics and the definition of acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20:672-679. doi:10.1681/ASN.2008070669.
51. Kellum JA, Lameire N. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. *Kidney Int.* 2012;2(1).
52. Atkinson A.J. J, Colburn WA, DeGruttola VG, et al. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69(3):89-95. doi:10.1067/mcp.2001.113989.
53. Zürbig P, Dihazi H, Metzger J, Thongboonkerd V, Vlahou A. Urine proteomics in kidney and urogenital diseases: Moving towards clinical applications. *Proteomics - Clin Appl.* 2011;5(5-6):256-268. doi:10.1002/prca.201000133.

54. Prunotto M, Ghiggeri G, Bruschi M, et al. Renal fibrosis and proteomics: Current knowledge and still key open questions for proteomic investigation. *J Proteomics*. 2011;74(10):1855-1870. doi:10.1016/j.jprot.2011.05.031.
55. Pepe MS, Etzioni R, Feng Z, et al. Phases of Biomarker Development for Early Detection of Cancer. *Cancer*. 2001;93(14):1054-1061.
56. Waikar SS, Sabbiseti VS, Bonventre J V. Normalization of urinary biomarkers to creatinine during changes in glomerular filtration rate. *Kidney Int*. 2010;78(5):486-494. doi:10.1038/ki.2010.165.
57. Penders J, Delanghe JR. Alpha 1-microglobulin: Clinical laboratory aspects and applications. *Clin Chim Acta*. 2004;346(2):107-118. doi:10.1016/j.cccn.2004.03.037.
58. Takagi K, Kin K, Itoh Y, Kawai T. Human alpha1-Microglobulin levels in various body fluids. *J Clin Pathol*. 1980;33(January):786-791.
59. Miyata T, Jadoul M, Kurokawa K, Van C, De Strihout Y. beta2-Microglobulin in Renal Disease. *J Am Soc Nephrol*. 1998;9:1723-1735.
60. Davey PG, Gosling P. beta2-Microglobulin Instability in Pathological Urine. *Clin Chem*. 1982;28(6):1330-1333.
61. Gautier J-C, Riefke B, Walter J, et al. Evaluation of Novel Biomarkers of Nephrotoxicity in Two Strains of Rat Treated with Cisplatin. *Toxicol Pathol*. 2010;38:943-956. doi:10.1177/0192623310379139.
62. Walshe CM, Odejayi F, Ng S, Marsh B. Urinary glutathione S-transferase as

an early marker for renal dysfunction in patients admitted to intensive care with sepsis. *Crit Care Resusc.* 2009;11(3):204-209.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Retrieve&list_uids=19737123&dopt=abstractplus%5Cnpapers://347a0d64-8b48-4dcf-b0a7-00f094a7599b/Paper/p748.

63. Washburn KK, Zappitelli M, Arikan AA, et al. Urinary interleukin-18 is an acute kidney injury biomarker in critically ill children. *Nephrol Dial Transplant.* 2008;23(2):566-572. doi:10.1093/ndt/gfm638.
64. Siew ED, Ikizler TA, Gebretsadik T, et al. Elevated urinary IL-18 levels at the time of ICU admission predict adverse clinical outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2010;5(8):1497-1505. doi:10.2215/CJN.09061209.
65. Vaidya VS, Ramirez V, Ichimura T, Bobadilla N a, Bonventre J V. Urinary kidney injury molecule-1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury. *Am J Physiol Physiol.* 2006;290(2):F517--F529. doi:10.1152/ajprenal.00291.2005.
66. Bailly V, Zhang Z, Meier W, Cate R, Sanicola M, Bonventre J V. Shedding of kidney injury molecule-1, a putative adhesion protein involved in renal regeneration. *J Biol Chem.* 2002;277(42):39739-39748. doi:10.1074/jbc.M200562200.
67. Ichimura T, Hung CC, Yang SA, Stevens JL, Bonventre J V. Kidney injury molecule-1: a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004;286:F552-F563.

doi:10.1152/ajprenal.00285.2002.

68. Yamamoto T, Noiri E, Ono Y, Doi K, Negishi K. Renal L-Type Fatty Acid – Binding Protein in Acute Ischemic Injury. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18:2894-2902. doi:10.1681/ASN.2007010097.
69. Portilla D, Dent C, Sugaya T, et al. Liver fatty acid-binding protein as a biomarker of acute kidney injury after cardiac surgery. *Kidney Int.* 2008;73(4):465-472. doi:10.1038/sj.ki.5002721.
70. Ferguson MA, Vaidya VS, Waikar SS, et al. Urinary liver-type fatty acid-binding protein predicts adverse outcomes in acute kidney injury. *Kidney Int.* 2010;77(8):708-714. doi:10.1038/ki.2009.422.
71. Nakamura T, Sugaya T, Koide H. URINARY LIVER-TYPE FATTY ACID Y BINDING PROTEIN IN SEPTIC SHOCK : EFFECT OF POLYMYXIN B Y IMMOBILIZED FIBER HEMOPERFUSION. *Shock.* 2009;31(5):454-459. doi:10.1097/SHK.0b013e3181891131.
72. Hamamsy M El, Hedaya M, Awad H. The efficacy and toxicity of two dosing-regimens of amikacin in neonates with sepsis. *J Clin Pharm Ther.* 2011;36:45-52. doi:10.1111/j.1365-2710.2009.01152.x.
73. Westhuyzen J, Endre ZH, Reece G, Reith DM, Saltissi D, Morgan TJ. Measurement of tubular enzymuria facilitates early detection of acute renal impairment in the intensive care unit. *Nephrol Dial Transplant.* 2003;18:543-551.

74. Barrera-chimal J, Bobadilla NA. Are recently reported biomarkers helpful for early and accurate diagnosis of acute kidney injury ? *Biomarkers*. 2012;17(15):385-393. doi:10.3109/1354750X.2012.680070.
75. Erdener D, Aksu K, Bicer Í, Doganavsargil E, Kutay FZ. Urinary N-Acetyl- b - D -Glucosaminidase (NAG) in Lupus Nephritis and Rheumatoid Arthritis. *J Clin Lab Anal*. 2005;176(March):172-176. doi:10.1002/jcla.20073.
76. Tominaga M, Fujiyama K, Hoshino T, et al. Urinary N-Acetyl-p-D-Glucosaminidase in the Patients with Hyperthyroidism. *Horm Metab Res*. 1988;21:438-440.
77. Soni SS, Cruz D, Bobek I, et al. NGAL: A biomarker of acute kidney injury and other systemic conditions. *Int Urol Nephrol*. 2010;42(1):141-150. doi:10.1007/s11255-009-9608-z.
78. Yuen PST, Jo S-K, Holly MK, Hu X, Star RA. Ischemic and nephrotoxic acute renal failure are distinguished by their broad transcriptomic responses. *Physiol Genomics*. 2006;25(3):375-386. doi:10.1152/physiolgenomics.00223.2005.
79. Supavekin S, Zhang W, Kucherlapati R, Kaskel FJ, Moore LC, Devarajan P. Differential gene expression following early renal ischemia/reperfusion. *Kidney Int*. 2003;63(5):1714-1724. doi:10.1046/j.1523-1755.2003.00928.x.
80. Ritossa F. Discovery of the heat shock response.pdf. *Cell Stress Chaperones*. 1996;1(2):97-98.

81. Katschinski DM. On Heat and Cells and Proteins. *Int Union Physiol Sci.* 2004;19:11-15. doi:10.1152/nips.01403.2002.
82. Borkan SC, Gullans SR. Molecular chaperones in the kidney. *Annu Rev Physiol.* 2002;64:503-527. doi:10.1146/annurev.physiol.64.081501.155819.
83. Fan C, Lee S, Cyr DM. Mechanisms for regulation of Hsp70 function by Hsp40. *Cell Stress Chaperones.* 2003;8(4):309-316.
84. Morano KA. New Tricks for an Old Dog The Evolving World of Hsp70. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;14:1-14. doi:10.1196/annals.1391.018.
85. Barrera-Chimal J, Pérez-Villalva R, Cortés-González C, et al. Hsp72 is an early and sensitive biomarker to detect acute kidney injury. *EMBO.* 2011;3:5-20. doi:10.1002/emmm.201000105.
86. Hernández-Pando R, Pedraza-Chaverri J, Orozco-Estévez H, et al. Histological and subcellular distribution of 65 and 70 kD heat shock proteins in experimental nephrotoxic injury. *Exp Toxicol Pathol.* 1995;47(10):501-508. doi:10.1016/S0940-2993(11)80337-4.
87. Molinas SM, Rosso M, Wayllace NZ, et al. Heat shock protein 70 induction and its urinary excretion in a model of acetaminophen nephrotoxicity. *Pediatr Nephrol.* 2010;25(7):1245-1253. doi:10.1007/s00467-010-1493-2.
88. Morales-buenrostro LE, Salas-nolasco OI, Barrera-chimal J, Casas- G, Bobadilla NA. Hsp72 Is a Novel Biomarker to Predict Acute Kidney Injury in Critically Ill Patients. *PLoS One.* 2014;9(10).

doi:10.1371/journal.pone.0109407.

89. McElderry LA, Tarbit IF, Cassells-Smith AJ. Six methods for urinary protein compared. *Clin Chem.* 1982;28(2):356-360.

90. Lowry OH, Rosebrough NJ, Lewis Farr A, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(2):265--275.

doi:10.1016/0304-3894(92)87011-4.



Heat shock protein 72 (Hsp72) specific induction and temporal stability in urine samples as a reliable biomarker of acute kidney injury (AKI)

Juan Antonio Ortega-Trejo, Rosalba Pérez-Villalva, Jonatan Barrera-Chimal, Diego L. Carrillo-Pérez, Luis E. Morales-Buenrostro, Gerardo Gamba, María Elena Flores & Norma A. Bobadilla

To cite this article: Juan Antonio Ortega-Trejo, Rosalba Pérez-Villalva, Jonatan Barrera-Chimal, Diego L. Carrillo-Pérez, Luis E. Morales-Buenrostro, Gerardo Gamba, María Elena Flores & Norma A. Bobadilla (2015): Heat shock protein 72 (Hsp72) specific induction and temporal stability in urine samples as a reliable biomarker of acute kidney injury (AKI), *Biomarkers*, DOI: [10.3109/1354750X.2015.1096305](https://doi.org/10.3109/1354750X.2015.1096305)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.3109/1354750X.2015.1096305>



Published online: 21 Oct 2015.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

RESEARCH ARTICLE

Heat shock protein 72 (Hsp72) specific induction and temporal stability in urine samples as a reliable biomarker of acute kidney injury (AKI)

Juan Antonio Ortega-Trejo^{1,2}, Rosalba Pérez-Villalva^{1,2}, Jonatan Barrera-Chimal^{1,2}, Diego L. Carrillo-Pérez², Luis E. Morales-Buenrostro²#, Gerardo Gamba^{1,2}, María Elena Flores¹, and Norma A. Bobadilla^{1,2}#

¹Molecular Physiology Unit, Instituto De Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma De México, Mexico City, Mexico and

²Department of Nephrology, Instituto Nacional De Ciencias Médicas Y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico

Abstract

We demonstrated that urinary heat shock protein of 72 kDa (Hsp72) is a sensitive biomarker for the early detection of acute kidney injury (AKI). However, whether Hsp72 induction during an AKI episode is kidney-specific is unknown, as well as, the degree of Hsp72 stability in urine samples. In rats that underwent bilateral renal ischemia and reperfusion (I/R), Hsp72 levels were evaluated in several tissues and in collected urines under different storage and temperature conditions, as well as in variable numbers of freeze-thaw cycles. The effect of room temperature and five freeze-thaw cycles on urinary Hsp72 levels was also evaluated in urine samples from AKI patients. We found that Hsp72 increased exclusively in the renal cortex of I/R group, emphasizing its performance as an AKI biomarker. Urinary-Hsp72 remained constant at room temperature (48 h), during 9 months of storage and was not affected by five freeze/thaw cycles.

Keywords

Ischemia/reperfusion, renal cortex, renal dysfunction, tubular injury

History

Received 9 February 2015

Revised 19 June 2015

Accepted 11 September 2015

Published online 16 October 2015

Introduction

The principal causes of acute kidney injury (AKI) are nephrotoxic and ischemic/reperfusion (I/R) injuries (Bonventre, 2010; El & Vaidya, 2011). The prevalence of AKI has risen during recent years. The mortality due to AKI remains elevated, in part due to the lack of early and sensitive biomarkers and the absence of an effective therapy (Go et al., 2010; Liano & Pascual, 1996; Okusa et al., 2009; Waikar et al., 2006). More worrying is the evidence that show that AKI is associated with the development of chronic kidney disease (Barrera-Chimal et al., 2013; Block & Schoolwerth, 2007; Ishani et al., 2009; Kronenberg, 2009; Lafrance et al., 2010; Mosier et al., 2010; Murugan & Kellum, 2011; Rifkin et al., 2012; Venkatachalam et al., 2010). For years, AKI has been diagnosed by an increase in serum creatinine (SCr) and/or a reduction in urine output according to the AKIN and RIFLE classification (Joannidis et al., 2009; Mehta & Chertow, 2003; Nakamura et al., 2012). The elevation of SCr, however, occurs up to 48 h after the renal injury has occurred, thus retarding AKI diagnosis and therapy. Therefore, the AKIN and RIFLE classifications are not adequate for early diagnosis of AKI (Waikar & Bonventre, 2009).

Recently, certain molecules whose concentration is modified in the urine of AKI patients have been proposed as biomarkers of AKI. These molecules include, e.g. NGAL, Kim-1, interleukin-18, NAG, cystatin C, MCP-1, L-FABP and heat shock protein 72 (Hsp72) (Barrera-Chimal & Bobadilla, 2012). One promising biomarker is Hsp72. Previous studies have shown that Hsp72 is up-regulated in kidney tubules after ischemic or nephrotoxic injuries (Fekete et al., 2006; Goering et al., 2000; Morita et al., 1995; Schober et al., 1997). Given that after an AKI episode, segment S3 of the proximal tubule suffers cell death by necrosis and apoptosis as well as detachment from the basal epithelial membrane, we reasoned that Hsp72 could be detected in the urine after renal ischemia and, thus, may perform as an AKI biomarker. In support of this hypothesis, we have recently shown that Hsp72 was effective in the early detection of the development of AKI and sufficiently sensitive to stratify different degrees of renal injury. Moreover, it was also successful in monitoring the effectiveness of a renoprotective therapy in rats subjected to renal bilateral ischemia. Our findings have also been confirmed in patients diagnosed with AKI during their stay in an intensive care unit (ICU) (Barrera-Chimal et al., 2011).

There is little information, however, about the specificity of Hsp72 detection in urine as an AKI marker because it is unknown whether renal ischemia may induce Hsp72 in other tissues and whether, due to the renal injury, Hsp72 in the bloodstream could reach the urine. In addition, the stability of Hsp72 in urine samples has not been properly assessed. These non-invasive biomarkers are frequently analyzed in urine samples collected at the bedside from drainage bags in which

#Luis E. Morales-Buenrostro and Norma A. Bobadilla are responsible for statistical design/analysis. E-mail: luis_buenrostro@yahoo.com (L. E. Morales-Buenrostro); nab@biomedicas.unam.mx, norma.bobadillas@incmnsz.mx (N. A. Bobadilla).

Address for correspondence: Norma A. Bobadilla, PhD, Unidad de Fisiología Molecular, Vasco de Quiroga, No. 15 Tlalpan 14080, México City, Mexico. Tel: 5255-5485-2676. Fax: 5255-5655-0382. E-mail: nab@biomedicas.unam.mx; norma.bobadillas@incmnsz.mx

urine has been settled for hours at room temperature or in samples from clinical studies stored for several weeks or months before the Hsp72 measurement. This study examines whether Hsp72 reflects the injury induced by ischemia solely in the kidney and the effect of temporary storage of urine samples at room temperature, longer-term storage at -80°C and repeated freeze-thaw cycles on urinary Hsp72 levels in both rats underwent I/R and in patients diagnosed with AKI.

Materials and methods

All experiments involving animals were conducted in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health. The protocol was approved by the Committee on Ethics of Animal Experiments of Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM and Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran. All surgeries were performed under sodium pentobarbital anesthesia, and all efforts were made to minimize suffering. In addition, human samples were obtained in accordance with the national and international guidelines and regulations, and approved by the Ethics Committee, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran, México (No. 166).

Kidney I/R injury model

Forty male Wistar rats weighing 300–330 g were divided into two groups: sham-operated ($n=21$) and subjected to bilateral renal ischemia ($n=19$). All rats were anesthetized by an intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (30 mg/kg) and placed over a heating pad to maintain the body temperature at 37°C . A laparotomy was performed, and both renal pedicles were exposed. Non-traumatic clamps were then placed over the renal pedicles during 45 min (I/R). The ischemia was visually verified by the change of color in the kidney. Reperfusion was allowed by the removal of the clamps and was confirmed by the return of oxygenated blood to the kidney. After reperfusion, the incision was closed in two layers with 3–0 sutures. Control rats underwent sham surgery consisting of laparotomy and dissection of the renal pedicles. After the surgery, all animals were placed in metabolic cages for 24 h urine collection. All animals were maintained on a 12:12 h day–night cycle and with free access to water and food.

Functional analysis

After 24 h of reperfusion, at least 12 rats per group were anesthetized with sodium pentobarbital (30 mg/kg) and placed on a homeothermic table. Blood samples were collected at the end of the study. The serum and urinary creatinine concentrations were measured using a Quantichrom creatinine assay kit (DICT-500, Hayward, CA). Urinary protein excretion was measured using the TCA turbidimetric method (McElderry et al., 1982).

Tissue removal from subjects

After the samples for functional studies were completed, the rats underwent a laparotomy to expose and remove the intestine, lungs, liver, heart, brain, renal cortex and medulla. The renal cortex and medulla were separated by microdissection. All tissues were frozen (-80°C) until use.

Urine storing and handling

The collected urine samples from control ($n=11$) and ischemic ($n=8$) groups were divided into six aliquots (200 μL each) per rat for further analysis using various periods of storage at room temperature and freeze-thaw cycles, as described below:

Hsp72 stability at room temperature: Five aliquots from each rat were kept at room temperature for 3 d, and Hsp72 levels were assessed after 0, 3, 24, 48 and 72 h.

Hsp72 stability during freeze/thaw cycles: One aliquot of the urine of each sham rat ($n=11$) and I/R rat ($n=8$) were stored at -80°C for 5 d. Every 24 h, the aliquots were thawed for Hsp72 determination and thereafter frozen again until five cycles had been completed.

Hsp72 stability in samples stored at -80°C for 11 months: For this issue, other two group of rats: control ($n=7$) and I/R ($n=7$) were included, and the urine of each rat was stored in 12 aliquots at -80°C . Every month, one aliquot was thawed for the quantification of Hsp72 urinary levels and discarded.

Effect of room temperature and freeze/thaw cycles in urine samples from patients diagnosed with AKI

Urine samples from six healthy volunteers and 10 patients with AKI from the ICU were tested. AKI was defined as a 30% or greater increase in SCr from baseline according to the AKIN criteria (Mehta et al., 2007). The urines were either maintained at room temperature during 72 h or kept to five freeze/thaw cycles.

Hsp72 Western blot

The different tissues were homogenized in lysis buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% IGEPAL and complete protease inhibitor), the samples were centrifuged at 13 000 rpm for 15 min at 4°C and the total proteins were obtained. The protein concentration was determined by the Lowry method (Lowry et al., 1951) using the Bio-Rad protein assay. Ten milligrams of protein or 1 μL of plasma or 15 μL of urine were mixed with loading buffer (6% SDS, 15% glycerol, 150 mM Tris, Bromophenol blue 3% and β -mercaptoethanol 2% pH 7.6), heated to 95°C for 5 min and loaded onto an 8.5% SDS-PAGE. Proteins were electroblotted to a PVDF membrane for 60 min at 9 V and blocked for 90 min at RT in blocking grade blotting 5% (Bio-Rad, Hercules, CA). After blocking, the membranes were incubated with the antibody against Hsp72 (1:5000 for tissues and 1:10 000 for plasma, Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY) or anti-actin (1:5000, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX) overnight at 4°C . The next day, the membranes were washed three times for 10 min in TBS-tween. Thereafter, the membranes were incubated with the secondary antibody: IgG goat-anti-mouse HRP (1:5000 for tissues and 1:20 000 for plasma, Santa Cruz) or IgG donkey-anti goat HRP (1:5000 Santa Cruz). The proteins were detected using a commercial chemiluminescence kit (Millipore, Billerica, MA).

Hsp72 detection by ELISA

The urinary Hsp72 concentration was analyzed with a commercially available ELISA assay (Enzo Life Sciences).

The samples were placed into wells containing Hsp72 antibody bound to its surface; this antibody captures the Hsp72 present in the sample. Next, the wells were exposed to another Hsp72 antibody. Lastly, a secondary antibody coupled to HRP was added. Afterwards, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate was added to the well, the reaction halted and the optical density measured at 450 nm. The optical density of the samples was plotted against a standard curve and the concentration calculated.

Statistical analysis

The results were presented as the mean \pm SE. The significance of the differences among different periods of time was tested with a paired *t*-test and the difference between groups with a *t*-test. For urine samples stored for 11 months, a Spearman correlation and intraclass correlation coefficient were analyzed. Statistical significance was defined as $p < 0.05$.

Results

The renal injury induced by 45 min of I/R was demonstrated by a significant decrease in creatinine clearance (Figure 1a) and an increase in urinary protein excretion (Figure 1b) after 24 h of renal ischemia.

After a renal ischemic insult, the structure of the nephron that is most affected is segment S3 of the proximal tubule, located in the renal cortex. To determine whether the renal I/R injury also induces Hsp72 in renal medulla or in other tissues, Hsp72 levels were assessed in the renal cortex and medulla as well as in brain, liver, intestine, lung and heart. Figure 2 shows the images of the Western blot analysis for four rats from control and five rats from I/R group and, below them, the ratio of the mean value for between Hsp72 and actin obtained from the densitometric analysis. As we have previously reported (Barrera-Chimal et al., 2011), Hsp72 levels increased significantly in the renal cortex of I/R rats by 3.3-fold (Figure 2a). In contrast, Hsp72 levels remained unaltered in the renal medulla from the ischemic group (Figure 2c). Similarly, Hsp72 expression was not modified in the brain, liver, intestine, lung and heart from rats underwent renal I/R (Figure 2b, d–g). In addition, Hsp72 protein levels were not modified in the plasma from ischemic rats compared

with control rats. Therefore, Hsp72 expression is up-regulated by renal ischemia only in the renal cortex and not in any other tissue, including the renal medulla or in the plasma.

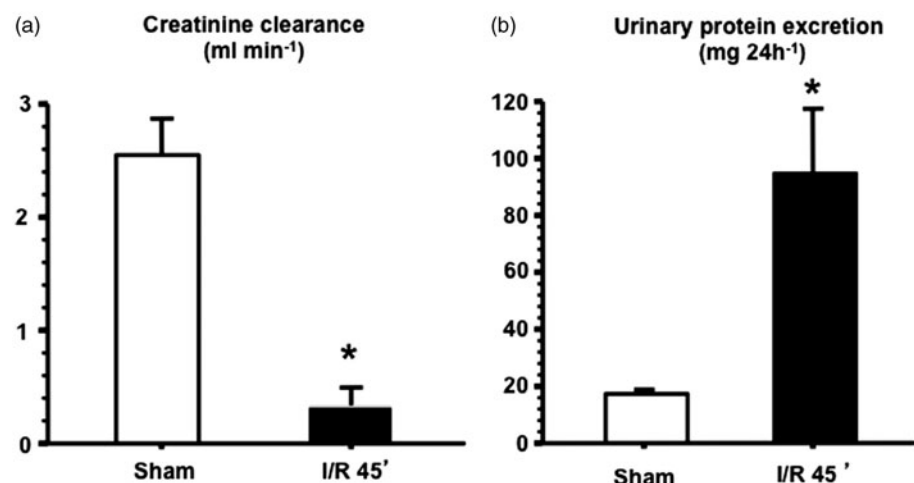
Next, we determined the stability of Hsp72 in urine samples under different conditions. First, we evaluated Hsp72 stability in urine samples kept at room temperature for 3 d. The behavior of the Hsp72 concentration in the urine from sham and ischemic animals kept at room temperature for 0, 3, 24, 48 and 72 h is shown in Figure 3. Renal injury induced by I/R was associated with a significant increase in Hsp72 urinary levels since 0 h (2.96 ng/mL versus 0.16 ng/mL in control rats) and remained elevated and stable during the first 48 h at room temperature. The Hsp72 levels then tend to increase, but the difference did not reach statistical difference when this value was compared at the 0 h point. We believe that this effect could result from the bacteria growing observed in the samples maintained at room temperature for 72 h. Accordingly; the coefficients of variation were 0.39, 0.32 and 0.46 for 24, 48 and 72 h, respectively in I/R group. Thus, urine samples collected at room temperature and settled for 0–24 h are adequate to assess the Hsp72 concentration.

Next, we studied the effect of freeze/thaw cycles on the stability of Hsp72. For this purpose, the same urine sample was exposed to freeze/thaw cycles every 24 h over 5 d. As shown in Figure 4, the Hsp72 levels were higher in the I/R group and remained constant even after the fifth freeze/thaw cycle. The coefficients of variation were 0.19, 0.17, 0.24 and 0.25 for the second, third, fourth and fifth freeze/thaw cycle in the urines from IR group, respectively.

We also assessed the stability of Hsp72 in long-term storage (-80°C). As shown in Figure 5, the urinary Hsp72 levels in the I/R group were reliable in stored frozen samples and they were significantly higher than the control group. The urinary Hsp72 levels remained stable during the first 9 months as was showed by the Spearman correlation evaluated in each month and compared with urinary Hsp72 levels in the first month. The Spearman correlations were: 0.89, 0.89, 0.86, 0.96, 0.93, 0.93, 0.93, 0.89, 0.32 and 0.31 for 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 and 11 months, respectively. In addition, a reliability analysis by using an intraclass correlation coefficient was performed. We noticed an excellent significant correlation within the first 9 months. Thus, intraclass correlation for single measures was 0.944 ($p < 0.001$) and intraclass

Figure 1. Renal injury induced by I/R.

(a) Renal function assessed by creatinine clearance. (b) Urinary protein excretion. White bars represent sham-operated rats ($n=14$) and black bars rats subjected to 45 min of ischemia and 24 h of reperfusion ($n=12$). The mean \pm SE is represented. * $p < 0.05$ versus sham group.



correlation for average measures was 0.992 ($p < 0.001$). When all the months were analyzed, the intraclass correlation coefficient for average measures remains significant (0.961, $p < 0.001$), but the single intraclass correlation for single measures was lower (0.689, $p < 0.001$). These results show that the urinary Hsp72 levels in urines kept at -80°C are stable during the first 9 months of their storage.

Effect of room temperature and freeze/thaw cycles in urine samples from patients diagnosed with AKI

Table 1 shows the baseline characteristics of the AKI patients. Ten patients diagnosed with AKI and six healthy volunteers were included. The major cause of AKI was associated with septic shock. The mean basal SCr was 0.83 ± 0.12 mg/dL and rose to 4.2 ± 0.88 mg/dL, when the patients were diagnosed with AKI. Most of the patients were classified as AKIN 3 by using AKIN criteria.

Urinary Hsp72 levels were assessed by Western blot and by ELISA in urine samples from AKI patients and compared with healthy volunteers as shown in Figure 6. The Western blot shows (Figure 6a) that Hsp72 was almost undetectable in urines of healthy volunteers and contrast with those from AKI patients, in which it was notoriously increased. Urinary Hsp72 levels were not affected in samples kept during 72 h, at room

temperature, the correlation was 0.944 ($p < 0.001$) (Figure 6b). Furthermore, five cycles of freeze/thaw did not affect the Hsp72 concentration in the urine from AKI patients. These findings were in accordance with those observed in urine samples from rats underwent I/R.

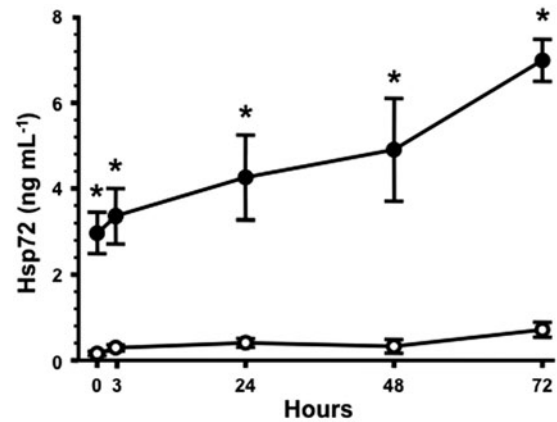


Figure 3. Hsp72 stability at room temperature over 3 d. White circles represent sham-operated rats ($n=11$) and black circles represent rats subjected to 45 min of ischemia and 24 h of reperfusion ($n=8$). The mean \pm SE is represented. * $p < 0.05$ versus sham.

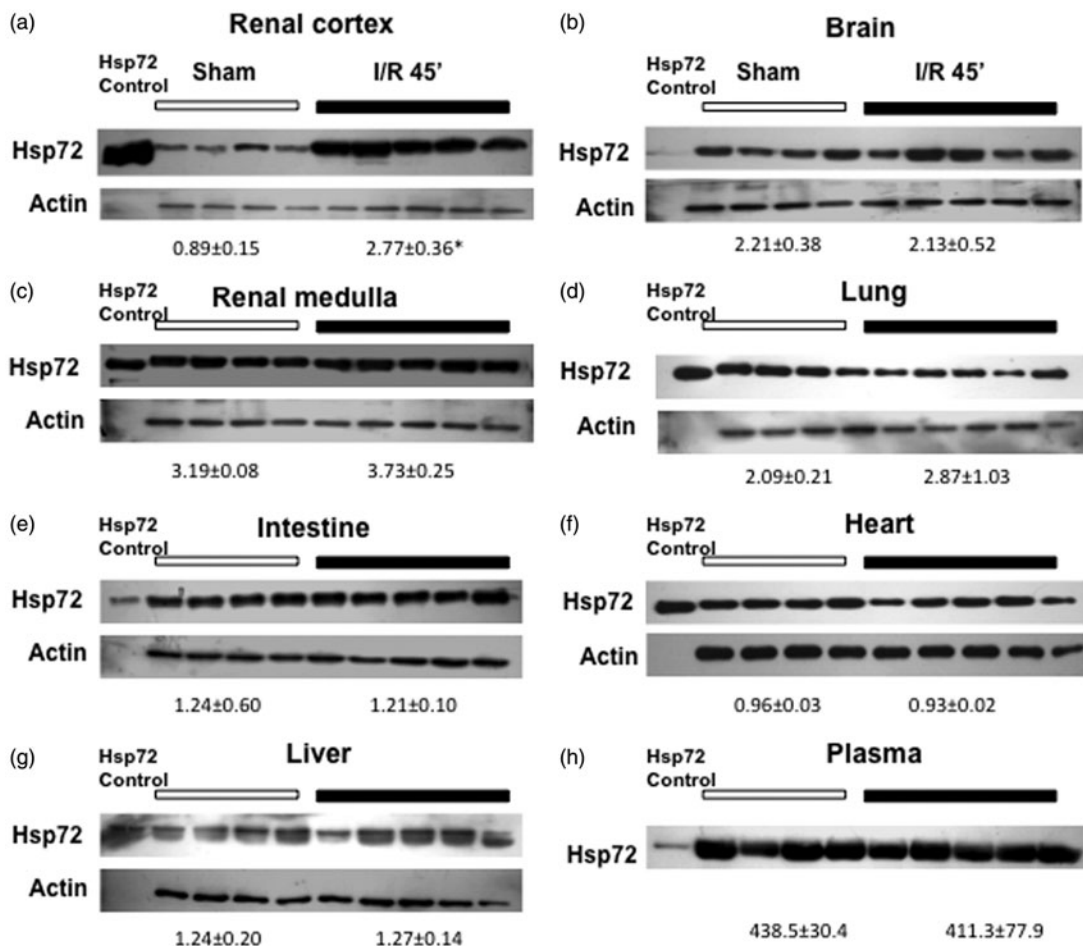


Figure 2. Hsp72 induction by I/R only occurs in the renal cortex. (a) Renal cortex, (b) Brain, (c) Renal medulla, (d) Lung, (e) Intestine, (f) Heart, (g) Liver, (h) Plasma from sham-operated rats ($n=4$) and rats subjected to 45 min of ischemia and 24 h of reperfusion ($n=5$). In each WB, Hsp72 recombinant protein was included as a positive control. The mean \pm SE is represented. * $p < 0.05$ versus sham group.

Discussion

The major causes of AKI are I/R and nephrotoxic injuries (Friedewald & Rabb, 2004). Worldwide, AKI affects between 7% and 18% of hospitalized patients, with a 20% mortality rate, whereas the incidence of AKI in critically ill patients varies between 30 and 70% (Fang et al., 2010; Lewington et al., 2013). Despite recent advances in the knowledge of AKI pathophysiology, the incidence and mortality rate remain

high, in part due to the lack of an assay for AKI early detection (Wu & Parikh, 2008); therefore, the identification of reliable biomarkers for AKI diagnosis would be expected to improve the effectiveness of therapeutic strategies.

The AKI biomarker must possess the following features: it must be produced at the site of injury, its concentration should reflect the severity of renal injury, it can be measured easily in blood or urine and it should be reasonably stable in body fluids. One meaningful approach has been the study of urinary proteins to identify non-invasive biomarkers of kidney disease. Recently, we have shown that Hsp72 is an early and sensitive biomarker of AKI induced by an ischemic process or toxic substances (Barrera-Chimal et al., 2011; Cárdenas-González et al., 2013; Sánchez-Pozos et al., 2012); however,

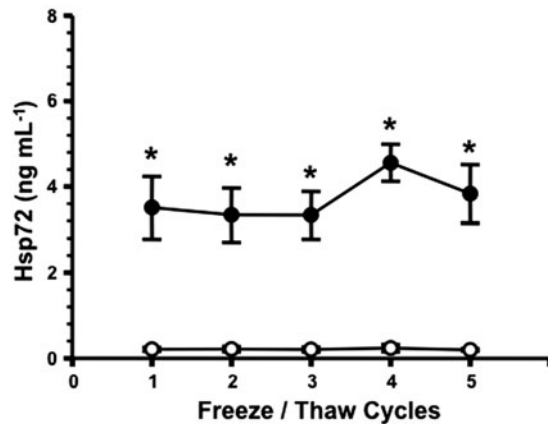


Figure 4. Hsp72 stability during five freeze/thaw cycles. White circles represent sham-operated rats ($n = 11$) and black circles represent rats subjected to 45 min of ischemia and 24 h of reperfusion ($n = 8$). The mean \pm SE is represented. $*p < 0.05$ versus sham group.

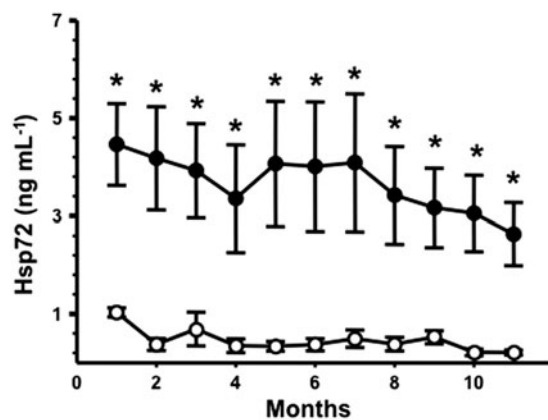


Figure 5. Hsp72 stability in samples stored at -80°C over 11 months. White circles represent sham-operated rats ($n = 7$) and black circles represent rats subjected to 45 min of ischemia and 24 h of reperfusion ($n = 7$). The mean \pm SE is represented. $*p < 0.05$ versus sham group.

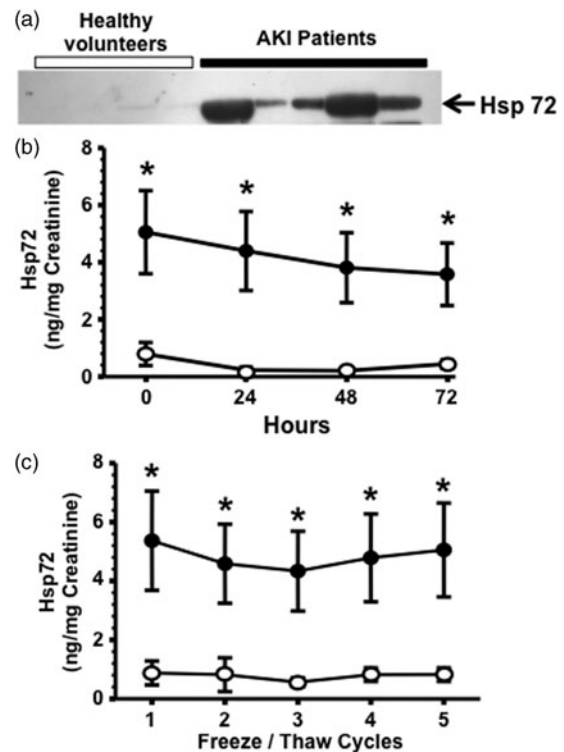


Figure 6. Effect of room temperature and freeze/thaw cycles on urinary Hsp72 levels in healthy volunteers and AKI patients. (a) Hsp72 Western blot. (b) Urinary Hsp72 levels in urine human samples kept at room temperature. (c) Urinary Hsp72 levels in urine human samples under five repeated cycles of freezing and thawing. White circles represent healthy volunteers ($n = 6$) and black circles represent AKI diagnosed patients ($n = 10$). The mean \pm SE is represented. $*p < 0.05$ versus sham group.

Table 1. Baseline characteristics of the AKI patients.

Subject number	Gender	Age (years)	Baseline SCr (mg/dL)	Admission SCr (mg/dL)	Diagnosis	AKIN classification
1	Female	77	0.8	3.1	Sepsis	AKIN 3
2	Female	40	0.5	3.2	Sepsis	AKIN 3
3	Female	51	0.9	3.1	Sepsis	AKIN 3
4	Female	46	0.6	1.5	Sepsis	AKIN 3
5	Female	71	0.7	9.9	Nephritis	AKIN 3
6	Female	75	0.7	5.2	Nephritis	AKIN 3
7	Male	32	0.6	1.5	Sepsis	AKIN 2
8	Male	77	1.1	5.7	Sepsis	AKIN 3
9	Male	58	0.5	1.6	Sepsis	AKIN 3
10	Female	76	1.7	7.2	Sepsis	AKIN 3

our previous studies did not explore whether Hsp72 induction was unique to renal cortex, where the proximal tubules are located and are affected by renal ischemia or nephrotoxic drugs. In this study, we found that Hsp72 was exclusively over-expressed in the renal cortex and was not altered in renal medulla or any other studied tissues including the plasma. Supporting this finding, we previously found in critically ill patients with two or more organ failure that urinary Hsp72 level only increased in the patients diagnosed with AKI (Barrera-Chimal et al., 2011). Moreover, we recently showed that Hsp72 was enough sensitive and specific to predict AKI in critically ill patients up to 3 d before the diagnosis. The sensitivity/specificity 1 or 2 d before AKI diagnosis was 100/90%. In addition, the sensibility, specificity and accuracy in the validation test for Hsp72 were 100%, 83.3% and 90.9%, respectively (Morales-Buenrostro et al., 2014). These results demonstrate the specificity of this biomarker for the efficient detection of AKI.

Although there may be little technical variability in the laboratory process itself, the Hsp72 level in an individual sample may vary substantially due to exposure to room temperature or storage over time. This issue is critical to ensure that the studied samples show minimal variation and to know for which period of time the samples must be stored and studied in large clinical trials without affecting the quantification of Hsp72. Therefore, we evaluated Hsp72 stability in urine samples from sham-operated rats and rats subjected to I/R exposed to various storage temperatures or repeated freeze-thaw cycles. Our data show that thawing and refreezing the samples five times was not consistently associated with losses of Hsp72 in the urine samples from the control rats and the rats subjected to I/R. Furthermore, the Hsp72 concentration was highly stable during short-term storage at room temperature (48 h) and long-term storage (up to 9 months) at -80°C . These findings were also observed in urine samples from AKI patients kept at room temperature or five freeze/thaw cycles. In summary, our results indicate that urinary Hsp72 is a specific and a reproducible indicator of AKI for samples stored over several months and during short storage at room temperature or when the samples are exposed to several cycles of freezing/thawing.

Declaration of interest

NAB and JBC are inventors of Hsp72 patents. This project was supported through grants from the Mexican Council of Science and Technology (CONACyT 235855 and 181267 to NAB) and the National University of Mexico (IN223915 to NAB). We are grateful to Martha Carrasco for her technical assistance. The results presented in this paper have not been published previously.

References

Barrera-Chimal J, Bobadilla NA. (2012). Are recently reported biomarkers helpful for early and accurate diagnosis of acute kidney injury? *Biomarkers* 17:385–93.

Barrera-Chimal J, Pérez-Villalva R, Cortés-González C, et al. (2011). Hsp72 is an early and sensitive biomarker to detect acute kidney injury. *EMBO Mol Med* 3:5–20.

Barrera-Chimal J, Pérez-Villalva R, Rodríguez-Romo R, et al. (2013). Spironolactone prevents chronic kidney disease caused by ischemic acute kidney injury. *Kidney Int* 83:93–103.

Block CA, Schoolwerth AC. (2007). Acute renal failure: outcomes and risk of chronic kidney disease. *Minerva Urol Nefrol* 59:327–35.

Bonventre JV. (2010). Pathophysiology of AKI: injury and normal and abnormal repair. *Contrib Nephrol* 165:9–17.

Cárdenas-González MC, Del Razo LM, Barrera-Chimal J, et al. (2013). Proximal renal tubular injury in rats sub-chronically exposed to low fluoride concentrations. *Toxicol Appl Pharmacol* 272:888–94.

El Sabbahy M, Vaidya VS. (2011). Ischemic kidney injury and mechanisms of tissue repair. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 3:606–18.

Fang Y, Ding X, Zhong Y, et al. (2010). Acute kidney injury in a Chinese hospitalized population. *Blood Purif* 30:120–6.

Fekete A, Vannay A, Vér A, et al. (2006). Sex differences in heat shock protein 72 expression and localization in rats following renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 291:F806–11.

Friedewald JJ, Rabb H. (2004). Inflammatory cells in ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 66:486–91.

Go AS, Parikh CR, Ikizler TA, et al. (2010). The assessment, serial evaluation, and subsequent sequelae of acute kidney injury (ASSESS-AKI) study: design and methods. *BMC Nephrol* 11:22.

Goering PL, Fisher BR, Noren BT, et al. (2000). Mercury induces regional and cell-specific stress protein expression in rat kidney. *Toxicol Sci* 53:447–57.

Ishani A, Xue JL, Himmelfarb J, et al. (2009). Acute kidney injury increases risk of ESRD among elderly. *J Am Soc Nephrol* 20:223–8.

Joannidis M, Metnitz B, Bauer P, et al. (2009). Acute kidney injury in critically ill patients classified by AKIN versus RIFLE using the SAPS 3 database. *Intensive Care Med* 35:1692–702.

Kronenberg F. (2009). Emerging risk factors and markers of chronic kidney disease progression. *Nat Rev Nephrol* 5:677–89.

Lafrance JP, Djurdjev O, Levin A. (2010). Incidence and outcomes of acute kidney injury in a referred chronic kidney disease cohort. *Nephrol Dial Transplant* 25:2203–9.

Lewington AJ, Cerdá J, Mehta RL. (2013). Raising awareness of acute kidney injury: a global perspective of a silent killer. *Kidney Int* 84:457–67.

Liaño F, Pascual J. (1996). Epidemiology of acute renal failure: a prospective, multicenter, community-based study. Madrid Acute Renal Failure Study Group. *Kidney Int* 50:811–18.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–75.

McElderry LA, Tarbit IF, Cassells-Smith AJ. (1982). Six methods for urinary protein compared. *Clin Chem* 28:356–60.

Mehta RL, Chertow GM. (2003). Acute renal failure definitions and classification: time for change? *J Am Soc Nephrol* 14:2178–87.

Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, et al. (2007). Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care* 11:R31.

Morales-Buenrostro LE, Salas-Nolasco OI, Barrera-Chimal J, et al. (2014). Hsp72 is a novel biomarker to predict acute kidney injury in critically ill patients. *PLoS One* 9:e109407.

Morita K, Wakui H, Komatsuda A, et al. (1995). Induction of heat-shock proteins HSP73 and HSP90 in rat kidneys after ischemia. *Ren Fail* 17:405–19.

Mosier MJ, Pham TN, Klein MB, et al. (2010). Early acute kidney injury predicts progressive renal dysfunction and higher mortality in severely burned adults. *J Burn Care Res* 31:83–92.

Murugan R, Kellum JA. (2011). Acute kidney injury: what's the prognosis? *Nat Rev Nephrol* 7:209–17.

Nakamura M, Seki G, Iwadoh K, et al. (2012). Acute kidney injury as defined by the RIFLE criteria is a risk factor for kidney transplant graft failure. *Clin Transplant* 26:520–8.

Okusa MD, Chertow GM, Portilla D. (2009). The nexus of acute kidney injury, chronic kidney disease, and World Kidney Day 2009. *Clin J Am Soc Nephrol* 4:520–2.

Rifkin DE, Coca SG, Kalantar-Zadeh K. (2012). Does AKI truly lead to CKD? *J Am Soc Nephrol* 23:979–84.

Sánchez-Pozos K, Barrera-Chimal J, Garzón-Muvdi J, et al. (2012). Recovery from ischemic acute kidney injury by spironolactone administration. *Nephrol Dial Transplant* 27:3160–9.

Schober A, Müller E, Thureau K, Beck FX. (1997). The response of heat shock proteins 25 and 72 to ischaemia in different kidney zones. *Pflugers Arch* 434:292–9.

Venkatachalam MA, Griffin KA, Lan R, et al. (2010). Acute kidney injury: a springboard for progression in chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 298:F1078–94.

Waikar SS, Bonventre JV. (2009). Creatinine kinetics and the definition of acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 20:672–9.

Waikar SS, Curhan GC, Wald R, et al. (2006). Declining mortality in patients with acute renal failure, 1988 to 2002. *J Am Soc Nephrol* 17: 1143–50.

Wu I, Parikh CR. (2008). Screening for kidney diseases: older measures versus novel biomarkers. *Clin J Am Soc Nephrol* 3:1895–901.