



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

Alteraciones temporales en la bioenergética, el equilibrio redox, la biogénesis y la dinámica mitocondriales en el desarrollo de la enfermedad renal crónica inducida por nefrectomía 5/6

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Doctor en Ciencias

PRESENTA:
M. C. Rodrigo Prieto Carrasco

DIRECTOR DE TESIS:
Dr. José Pedraza Chaverri
Facultad de Medicina

Ciudad de México, 2021



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.

Resumen del proyecto

El modelo de nefrectomía cinco sextos (5/6Nx) se utiliza ampliamente para estudiar los mecanismos implicados en la progresión de la enfermedad renal crónica (CKD), una patología renal que ha aumentado de forma espectacular en los últimos años. El deterioro mitocondrial es un mecanismo clave involucrado en la progresión de la CKD; sin embargo, la información sobre la bioenergética mitocondrial y alteraciones redox a lo largo de un curso temporal en el modelo 5/6Nx es todavía limitada y en algunos casos contradictoria. Por lo tanto, realizamos por primera vez un estudio temporal de las alteraciones mitocondriales mediante respirometría de alta resolución en el modelo 5/6Nx. Nuestros resultados muestran una disminución en la fosforilación oxidativa mitocondrial en los primeros tiempos, así como un deterioro permanente en la producción de adenosín trifosfato (ATP) en la respiración ligada al complejo I (CI), un estado oxidativo permanente en las mitocondrias y el desacoplamiento de estos orgánulos. Estas alteraciones están relacionadas con la disminución temprana de las actividades del CI y de la ATP sintasa y con la disminución adicional de la actividad del complejo III (CIII). Por tanto, los resultados sugieren que el deterioro de la bioenergética mitocondrial es un evento temprano en el daño renal, cuya persistencia en el tiempo agrava el desarrollo de CKD en el modelo 5/6Nx.

Como mencionamos el deterioro mitocondrial es un mecanismo crítico que favorece la progresión de la CKD. Sin embargo, la información sobre la bioenergética mitocondrial y alteraciones redox, así como en la biogénesis y dinámica mitocondriales, a lo largo de un curso temporal en el modelo 5/6Nx es todavía limitada y en algunos casos contradictoria. En este trabajo, determinamos los cambios en la biogénesis mitocondrial y los marcadores de dinámica en la masa renal remanente de los días 2 a 28 después de 5/6Nx. Nuestros resultados muestran una reducción progresiva en la biogénesis mitocondrial. Además, la reducción de las proteínas de la biogénesis mitocondrial se correlaciona fuertemente con el aumento de los marcadores de daño renal. Además, encontramos un cambio lento y gradual en la dinámica mitocondrial de la fusión a la fisión, favoreciendo la fragmentación mitocondrial en etapas posteriores después de 5/6Nx. Juntos, nuestros resultados sugieren que 5/6Nx induce la reducción progresiva de la masa mitocondrial a lo largo del tiempo a través de la disminución de los factores de biogénesis mitocondrial y un cambio lento de la fisión mitocondrial a la fusión; ambos mecanismos favorecen la progresión de la CKD en la masa renal remanente.

Abstract

The five-sixths (5/6Nx) nephrectomy model is widely used to study the mechanisms involved in the progression of chronic kidney disease (CKD), a kidney disease that has increased dramatically in recent years. Mitochondrial impairment is a key mechanism involved in the progression of CKD; however, the information on mitochondrial bioenergetics and redox alterations throughout a time course in the 5/6Nx model is still limited and in some cases contradictory. Therefore, we performed for the first time a temporary study of mitochondrial alterations using high-resolution respirometry in the 5/6Nx model. Our results show a decrease in mitochondrial oxidative phosphorylation in the early stages, as well as a permanent deterioration in the production of adenosine triphosphate (ATP) in respiration linked to complex I (CI), a permanent oxidative state in the mitochondria and uncoupling of these organelles. These alterations are related to an early decrease in IC and ATP synthase activities and to a further decrease in complex III (CIII) activity. Therefore, the results suggest that the deterioration of mitochondrial bioenergetics is an early event in kidney damage, the persistence of which over time aggravates the development of CKD in the 5/6Nx model.

As we mentioned, mitochondrial deterioration is a critical mechanism that favors the progression of CKD. However, information on mitochondrial bioenergetics and redox alterations, as well as on mitochondrial biogenesis and dynamics, throughout a time course in the 5/6Nx model is still limited and in some cases contradictory. In this work, we determined the changes in mitochondrial biogenesis and dynamics markers in the remaining renal mass from days 2 to 28 after 5/6Nx. Our results show a progressive reduction in mitochondrial biogenesis. Furthermore, the reduction in proteins of mitochondrial biogenesis is strongly correlated with the increase in markers of kidney damage. Furthermore, we found a slow and gradual change in mitochondrial dynamics from fusion to fission, favoring mitochondrial fragmentation in later stages after 5/6Nx. Together, our results suggest that 5/6Nx induces progressive reduction in mitochondrial mass over time through decreased mitochondrial biogenesis factors and a slow shift from mitochondrial fission to fusion; both mechanisms favor the progression of CKD in the remaining renal mass.

Agradecimientos

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca para realizar mis estudios de doctorado y por el apoyo económico (proyecto A1-S-7495), al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con números de proyectos IN202219 e IN200922 y al programa de Apoyo a la Investigación y Posgrado (PAIP) 5000-9105 de la Facultad de Química por la ayuda recibida para la elaboración de este trabajo.

Esta investigación fue financiada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) México, subvención número 281967, por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), subvención número IN202219 de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (PAIP), concesión número 5000-9105, y por Fondos de Gasto Directo Autorizado a la Subdirección de Investigación Básica del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.

Este estudio se realizó en cumplimiento parcial de los requisitos para el doctorado de Rodrigo Prieto-Carrasco, estudiante de doctorado del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) quien recibió la beca 541409/294353 del CONACYT, México.

Índice de abreviaturas y acrónimos

5/6Nx	Nefrectomía cinco sextos
ADP	Adenosina-5-difosfato
ADP/O	Adenosina difosfato (ADP)/oxígeno
AKI	Las siglas en inglés de daño renal agudo
ATP	Adenosina-5-trifosfato
BSA	Las siglas en inglés de albúmina sérica bovina
BUN	Las siglas en inglés de nitrógeno uréico en sangre
CaCl ₂	Cloruro de calcio
CCCP	Las siglas en inglés de m-clorocarbonilcianuro fenilhidrazona
CI	Complejo I del sistema de transporte de electrones
CICUAL	Comité Institucional de Uso y Cuidado Animal
CII	Complejo II del sistema de transporte de electrones
CIII	Complejo III del sistema de transporte de electrones
CIV	Complejo IV del sistema de transporte de electrones
CKD	Las siglas en inglés de insuficiencia renal crónica
COXI	Citocromo c oxidasa subunidad I
COXIV	Citocromo c oxidasa subunidad IV
CPT1	Carnitina palmitoiltransferasa 1
CT	Las siglas en inglés de túbulos colectores
CuCl ₂	Cloruro de cobre
DCPIP	Sal de sodio de hidrato de 2,6-diclorofenol
DRP1	Proteína 1 relacionada a la dinamina
DT	Las siglas en inglés de túbulo distal
DTNB	Las siglas en inglés de ácido 5,50-ditio-bis- (2-nitrobenzoico)
DUB	Decilubiquinona
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EGTA	Ácido etilenglicol-bis(β-aminoetiléter)-N,N,N',N-tetraacético
ER	Las siglas en inglés de retículo endoplásmico
ETS	Las siglas en inglés de sistema de transporte de electrones
FA	Las siglas en inglés de ácido fólico
FF	Fracción de filtración
FIS1	Proteína de fisión 1
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GFR	Las siglas en inglés de tasa de filtración glomerular
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GRP-75	Proteína 75 regulada por glucosa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación disulfuro u oxidado
H&E	Tinción de hematoxilina y eosina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfónico
HIF	Las siglas en inglés de factor inducible por la hipoxia

HRP	Las siglas en inglés de peroxidasa de "rábano picante"
IgG	Inmunoglobulina G
KCN	Cianuro de potasio
KDOQI	Las siglas en inglés de la Iniciativa para la Calidad de los Resultados de la Enfermedad Renal
KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potasio
KIM-1	Molécula de daño renal 1
LC3B-I/II	Proteínas asociadas a microtúbulos 1A/1B de cadena ligera 3B I y II
MAMs	Las siglas en inglés de membranas-ER asociadas a mitocondrias
MAP	Las siglas en inglés de presión arterial media
MCAD	Acetildeshidrogenasa de cadena media
MCU	Las siglas en inglés de complejo del uniportador mitocondrial de Ca ²⁺
MDA	Marcador de lipoperoxidación malondialdehído
MFN 1 y 2	Las siglas en inglés de mitofusinas 1 Yy 2
MgCl ₂	Cloruro de manganeso (II)
MIM	Las siglas en inglés de membrana interna mitocondrial
MnSOD	Superóxido dismutasa de manganeso
MOM	Las siglas en inglés de membrana externa mitocondrial
mRNA	Las siglas en inglés de ácido ribonucleico mensajero
mtDNA	Acido desoxirribonucleico mitocondrial
mtRNA	Ácido ribonucleico mitocondrial
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sodio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sodio dibásico
Na ₃ VO ₄	Ortovanadato de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido hidrógeno
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato
NaF	Fluoruro sódico
NaH ₂ PO ₄	Fosfato de sodio monobásico
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
NBT	Nitroazul de tetrazolio
NBThído	Nitroazul tetrazolio
NDUFB8	NADH deshidrogenasa-ubiquinona 1 subcomplejo beta subunidad 8
NF-kB	Las siglas en inglés de factor nuclear kappa B
NGAL	Las siglas en inglés de lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos
NLRP3	Las siglas en inglés de dominio pirina de la familia NLR que contiene 3
Nox	Las siglas en inglés de NADPH oxidasa
NRF1	Las siglas en inglés de factor respiratorio nuclear 1
NRF2	Las siglas en inglés de factor respiratorio nuclear 2
OPA1	Las siglas en inglés de proteína de atrofia óptica 1
OXPPOS	Las siglas en inglés de fosforilación oxidativa

PBS	Solución salina amortiguada con fosfatos
PGC-1 α	Las siglas en inglés de coactivador gamma del receptor activado por proliferador de peroxisoma 1-alfa
PGK-1	Las siglas en inglés de fosfoglicerato quinasa 1
PINK1	Las siglas en inglés de cinasa putativa inducida por PTEN 1
PKC	Las siglas en inglés de proteína cinasa C
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PPAR α	Las siglas en inglés de receptor alfa activado por proliferador de peroxisoma
PT	Las siglas en inglés de túbulo proximal
PVDF	Las siglas en inglés de fluoruro de polivinilideno
RAAS	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
RBF	Las siglas en inglés de flujo sanguíneo renal
RCI	Las siglas en inglés de índice de control respiratorio
RIPA	Amortiguador de radioinmunoprecipitación
ROS	Las siglas en inglés de especies reactivas del oxígeno
ROX	Respiración residual
RPF	Las siglas en inglés de flujo plasmático renal
RVR	Las siglas en inglés de resistencia vascular renal
S3	Estado 3 respiratorio
S4	Estado 4 respiratorio
S4o	Estado 4 respiratorio inducido por oligomicina
SDS	Dodecilsulfato sódico
SEM	Error estándar medio de la media
snGFR	Las siglas en inglés de tasa de filtración glomerular de nefrona única
SOD	Las siglas en inglés de superóxido dismutasa
TAL	Las siglas en inglés de segmento grueso ascendente del asa de Henle
TBS	Tris buffer salino
TDL	Las siglas en inglés de segmento delgado descendente del asa de Henle
TFAM	Las siglas en inglés de factor de transcripción mitocondrial A
TGF- β 1	Las siglas en inglés de molécula profibrótica del factor de crecimiento transformante beta 1
TMPD	Tetrametil-p-fenilendiamina
VDAC	Las siglas en inglés de canal selectivo de aniones dependientes de voltaje
XO	Xantina oxidasa
α -SMA	Las siglas en inglés de actina alfa del músculo liso
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial

Tabla de contenido

Resumen del proyecto	1
Abstract.....	2
Agradecimientos.....	3
Índice de abreviaturas y acrónimos	4
Tabla de contenido	7
1. Introducción	9
1.1 El riñón y su estructura.....	9
1.2 La mitocondria en el riñón	10
2. Antecedentes.....	13
2.1. La insuficiencia renal aguda (AKI) y la enfermedad renal crónica (CKD)	13
2.2. Las mitocondrias y su papel en la enfermedad renal	14
2.2.1. Alteraciones en la bioenergética mitocondrial en la AKI y la CKD	14
2.2.2. Las especies reactivas del oxígeno (ROS) mitocondriales y el estrés oxidante	16
2.2.3. Dinámica mitocondrial y recambio en el daño renal	17
2.3. El modelo de daño renal por nefrectomía 5/6.....	18
3. Justificación	20
4. Hipótesis.....	21
5. Objetivos.....	21
5.1. Objetivo general.....	21
5.2. Objetivos particulares	21
6. Materiales y métodos	22
6.1 Reactivos	22
6.2 Modelo experimental	22
6.3 Marcadores de daño renal y parámetros hemodinámicos	23
6.4 Estudios histológicos y de microscopía electrónica de transmisión	24
6.5 Evaluación de histología y microscopía electrónica	25
6.6 Aislamiento de mitocondrias.....	25
6.7 Consumo de O ₂ y β-oxidación mitocondriales.....	26
6.8 Potencial de membrana mitocondrial (ΔΨ _m).....	26
6.9 Actividad de los complejos mitocondriales.....	27
6.9.1 Actividad del complejo I (CI)	27
6.9.2 Actividad del complejo II (CII)	27

6.9.3 Actividad del complejo III (CIII)	28
6.9.4 Actividad del complejo IV (CIV)	28
6.10 Actividad de la ATP sintasa	28
6.11 Producción de H ₂ O ₂ mitocondrial	29
6.12 Actividad de las enzimas antioxidantes	29
6.12.1 Superóxido dismutasa (SOD)	29
6.12.2 Glutación reductasa (GR)	30
6.12.3 Glutación peroxidasa (Gpx)	30
6.13 Extracción de proteína y Western Blot	30
6.14 Análisis estadístico	31
7. Resultados	32
Primera parte	32
7.1. Pérdida de función renal inducida por nefrectomía 5/6	32
7.2 5/6Nx induce una disminución permanente de la capacidad de fosforilación oxidativa (OXPHOS) en la respiración ligada a CI y un desacoplamiento progresivo en la β-oxidación mitocondrial	35
7.3 La disminución de la capacidad de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) inducida por 5/6Nx está relacionada con la despolarización mitocondrial por la disminución de la actividad de CI y CIII	39
7.4 El desacoplamiento mitocondrial inducido por 5/6Nx está relacionado con un estado pro-oxidativo en las mitocondrias	41
7.5 Alteraciones temporales inducidas por 5/6Nx en la ultraestructura mitocondrial	42
Segunda parte	44
7.6 Daño en el riñón	44
7.7 5/6Nx induce la disminución progresiva de la biogénesis mitocondrial relacionada con el daño tubular y la fibrosis	47
7.8 5/6Nx induce el aumento de la fisión mitocondrial y la reducción de la fusión mitocondrial	49
7.9 5/6Nx induce alteraciones temporales en la autofagia en el riñón remanente	51
8. Discusión	53
9. Conclusiones	63
10. Referencias	64
11. Índice de figuras	88

1. Introducción

1.1 El riñón y su estructura

Los riñones son dos órganos pares que se encuentran situados detrás del peritoneo a ambos lados de la columna vertebral, implicados en el mantenimiento de la homeostasis corporal mediante la conservación del equilibrio osmótico y la eliminación de desechos metabólicos, entre otros múltiples procesos. Dichos órganos reciben cerca del 25% del gasto cardiaco a través de la arteria renal [1], la cual se ramifica en un sistema de arteriolas que regulan la entrada del flujo sanguíneo a las unidades funcionales del riñón: las nefronas [2]. Una persona adulta posee entre 1.5 a 2 millones de nefronas, el 80% de las cuales se conocen como corticales y poseen estructuras denominadas "asas de Henle" cortas, las cuales penetran una distancia corta dentro de la médula. El otro 20% de las nefronas reciben el nombre de yuxtamedulares y poseen asas de Henle largas, que penetran profundamente en la médula [3].

Cada nefrona está compuesta de un corpúsculo renal encargado del proceso de filtración y una serie de segmentos tubulares adjuntos. El corpúsculo renal está conformado por un entramado capilar, conocido como glomérulo, y una esfera que lo encierra, la cápsula de Bowman. Por otro lado, la parte tubular comprende el túbulo proximal (PT), el segmento delgado descendente del asa de Henle (TDL), el segmento grueso ascendente del asa de Henle (TAL), el túbulo distal (DT) y los túbulos colectores (CT) [2,4]. El glomérulo tiene como principal función la filtración del plasma sanguíneo para producir el ultrafiltrado, a través de tres membranas que forman la barrera de filtración glomerular [2]. La primera, el endotelio fenestrado, está conformado por células que forman poros con un diámetro aproximado de 70 a 100 nm, y su función es evitar el cruce de las células sanguíneas y moléculas cargadas negativamente [5]. La segunda, la membrana basal glomerular, repele moléculas cargadas negativamente [4]. Finalmente, las ranuras de filtración de los podocitos poseen prolongaciones del citoplasma conocidas como pedículos, los cuales se entrelazan entre sí y se enrollan alrededor de los capilares glomerulares, donde forman ranuras de filtración de 25 a 60 nm [6].

El fluido que entra al lumen de la nefrona a partir de la filtración glomerular posee una composición muy similar a la del plasma. Sin embargo, dentro de los segmentos tubulares se modifica la composición del filtrado a partir de los procesos de reabsorción y secreción. La reabsorción hace referencia al movimiento de solutos del lumen tubular de vuelta al plasma, esta se inicia en el PT, el cual representa el segmento más largo de la nefrona y constituye la mayor parte de la corteza renal [5]. En él se efectúa la mayoría de la reabsorción de solutos como sodio, cloro, glucosa, aminoácidos, péptidos y bicarbonato. El PT está constituido por dos partes,

la “inicial contorneada” que está unida directamente al corpúsculo renal en la corteza y realiza la mayor parte de la reabsorción, y la “parte recta”, que desciende en dirección a la medula [4].

Desde el PT, el líquido desciende hacia el asa de Henle. En este punto el fluido que entra en el asa de Henle es isotónico con respecto al plasma, sin embargo, durante su paso por este segmento, se produce el alto gradiente osmótico que permite al agua ser removida a medida que atraviesa la médula renal mediante el mecanismo conocido como flujo a contracorriente. Por su parte, la porción ascendente del asa de Henle es un continuo con el DT, por lo cual algunos autores lo consideran como parte del mismo [4]. El DT es inicialmente impermeable al agua y posee un transporte activo considerable [2]. El siguiente segmento del DT es conocido como "contorneado", este segmento participa en la reabsorción activa de calcio, ya que tiene la mayor actividad de la Ca^{2+} -ATPasa en la nefrona [7]. Finalmente, la región conectora del DT desemboca en el túbulo colector cortical, donde se lleva a cabo el control hormonal de la reabsorción de agua por medio de la hormona antidiurética [2].

1.2 La mitocondria en el riñón

En los riñones, los procesos de transporte activo son la fuerza motriz que hace posible la reabsorción de los distintos solutos, por lo que este órgano posee una demanda energética alta, utilizando alrededor del 7% del oxígeno total consumido por el cuerpo [8]. La mayor contribución al consumo de oxígeno renal está dada por el transporte activo de sodio, el cual depende de la actividad mitocondrial [9]. Debido a los diferentes requerimientos energéticos a lo largo de la nefrona, cada segmento tubular tiene una abundancia mitocondrial diferente [8,10,11], teniendo una mayor densidad mitocondrial aquellos segmentos con mayor tasa de reabsorción, como el PT contorneado y la TAL [10].

Por otro lado, la actividad del sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) mitocondrial también depende del tipo y disponibilidad de sustratos [12]. Si bien en el riñón la demanda energética es predominantemente sostenida por la β -oxidación de ácidos grasos [13], existe una preferencia de cada segmento de la nefrona por ciertos sustratos. En el caso del PT, la OXPHOS es mantenida predominantemente por la β -oxidación de ácidos grasos de cadena media y larga, seguidos por los cuerpos cetónicos, el ácido láctico e intermediarios del ciclo del ácido cítrico como el malato [14,15], siendo el aporte glucolítico de adenosina-5-trifosfato (ATP) casi inexistente en este segmento [8]. Por su parte, el TDL posee una densidad mitocondrial pobre y un aporte de la OXPHOS limitado, siendo los sustratos preferidos el piruvato y la glucosa [8]. Mientras que, en la parte medular, la glicólisis

anaerobia tiene una mayor contribución [8]. Al contrario, en la TAL y el DT, el alto consumo de oxígeno genera un enriquecimiento mitocondrial, en donde se oxidan ácidos grasos, cuerpos cetónicos, glucosa, lactato, glutamato y glutamina, pero no malato, succinato o citrato [11]. Finalmente, en el caso de los conductos CT, los experimentos de privación de sustratos revelan que estos son capaces de mantener el contenido de ATP intracelular incluso después de 30 minutos de privación [16], sugiriendo que poseen una alta actividad glicolítica, así como reservas endógenas de sustratos.

Estudios de microscopía confocal multifotónica han demostrado que el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) también cambia a lo largo de la nefrona. En estos estudios en ratones anestesiados, se reveló un mayor $\Delta\Psi_m$ en el PT, seguido por la TAL [17,18]. Además, en estados patológicos como la hipoxia, el $\Delta\Psi_m$ rápidamente colapsa en el PT, pero no en el DT [18]; lo cual es consistente con la pobre capacidad de PT para obtener energía de la glucólisis [8]. La función renal depende en gran parte del equilibrio entre los procesos que regulan la dinámica y recambio mitocondrial (fisión, fusión, biogénesis y mitofagia) [8,19], por lo que las patologías mitocondriales son un factor muy importante en el desarrollo de diversas enfermedades renales [20–22].

El riñón se considera como el segundo órgano con mayor capacidad de gluconeogénesis solo después del hígado [23]. En condiciones fisiológicas, la contribución del riñón a la glucosa en sangre es del 25%, sin embargo, esta puede llegar hasta cerca del 45% después de ayuno prolongado [24]. Esto se ha asociado principalmente a la capacidad del riñón sintetizar glucosa a partir de precursores no carbohidratos como los ácidos carboxílicos y los aminoácidos [25]. En condiciones normales estos sustratos representan el 90% de la gluconeogénesis en el riñón: lactato, glutamina, glicerol y alanina. Sin embargo, estas contribuciones pueden llegar a variar durante periodos de ayuno [24,25]. Para el análisis de la gluconeogénesis renal, dicho órgano puede considerarse dividido en dos compartimientos separados, la corteza donde produce y libera glucosa principalmente por el PT, y la médula en la que la gluconeogénesis es mínima y se utilizan altas cantidades glucosa [26]. El PT, en especial el segmento S3 del mismo, reabsorbe glucosa y sintetiza la mayor cantidad de glucosa, pero no es capaz de metabolizarla, dada la falta de actividad y abundancia de enzimas glucolíticas como la hexocinasa en este segmento [26]. En contraste, en las regiones medulares de la nefrona como el asa de Henle, la glucosa en el fluido tubular es mínima, así como la gluconeogénesis, sin embargo, estas regiones usan glucosa proporcionada por el PT y entregada por el flujo sanguíneo [24,26]. Por otro lado, la mitocondria renal tiene un papel fundamental en la gluconeogénesis en los segmentos corticales, esto a partir del aporte de ATP necesario para esta vía biosintética [24–26]. De

hecho, la abundancia mitocondrial en estos segmentos correlaciona con la expresión y actividad de las enzimas gluconeogénicas como la fosfoenolpiruvato carboxicinasas, así el consumo de lactato, glutamina y alanina en los mismos [23,26]. Así mismo, el suministro de piruvato a partir de aminoácidos como la glutamina y el glutamato, depende de las transaminasas mitocondriales y del correcto flujo en el ciclo de Krebs [23,26]. Aún más, dicha producción es sensible a inhibidores del sistema de transporte de electrones (ETS) como la antimicina A [24–26], confirmando el papel fundamental de la mitocondria en la regulación de esta vía metabólica.

Adicionalmente, las mitocondrias se consideran como un eje central en la regulación redox celular en el riñón, dado que dicho orgánulo es uno de los principales sitios de producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en la célula [21,27]. En las mitocondrias, la producción de ROS, incluso en condiciones no patológicas, depende directamente de la actividad de las deshidrogenasas del ETS, de la β -oxidación y del ciclo de Krebs [28,29]. Por lo que, múltiples sitios de producción de ROS han sido identificados hasta ahora, cuyas contribuciones dependen de la disponibilidad de sustratos y el balance energético, entre otros factores [12,28]. De igual manera, la mitocondria y las ROS producidas por dicho orgánulo también pueden regular la activación del inflamasoma dominio pirina de la familia NLR que contiene 3 (NLRP3) y el desencadenamiento de la muerte celular por apoptosis [30]. La activación mitocondrial del inflamasoma NLRP3 lleva a la activación de la señalización mediada por el factor nuclear kappa B (NF- κ B) en células proinflamatorias como los macrófagos, monocitos y neutrófilos [30], contribuyendo así a los procesos inflamatorios, regenerativos y/o fibróticos en el riñón [31,32]. Aunado a esto, la mitocondria junto con la aldosterona, median la transición epitelio-mesenquima en las células tubulares [33], regulando la respuesta al daño renal.

Por otro lado, 98%–99% de la carga filtrada por la nefrona de Ca^{2+} es reabsorbida por los túbulos renales a partir del transporte activo secundario dependiente de la producción de ATP mitocondrial [34]. Dicho orgánulo no solamente sostiene la absorción del Ca^{2+} en los segmentos tubulares, sino que junto con el retículo endoplásmico (ER) es considerado como uno de los sitios principales de regulación de la concentración intracelular de Ca^{2+} [35,36]. En condiciones de reposo, la concentración mitocondrial de Ca^{2+} es de aproximadamente 100-200 nM. Sin embargo, bajo estimulación, las mitocondrias pueden acumular de 10 a 20 veces más Ca^{2+} que el compartimento citosólico [36]. La membrana externa mitocondrial (MOM) es altamente permeable al Ca^{2+} gracias a los altos niveles del canal selectivo de aniones dependientes de voltaje (VDAC). Mientras que la entrada de Ca^{2+} a través de la membrana interna mitocondrial (MIM) está regulada principalmente por el complejo del uniportador mitocondrial de Ca^{2+} (MCU) y está regulada por el $\Delta\Psi_m$

[35,36]. Por último, las mitocondrias interactúan física y funcionalmente con una gran cantidad de orgánulos, siendo la interacción con el ER de particular interés para la regulación celular [37]. La comunicación entre estos orgánulos es a través de las membranas-ER asociadas a mitocondrias (MAMs), las cuales tienen un papel fundamental en las funciones celulares como la señalización de Ca^{2+} , el transporte de lípidos, el metabolismo energético y la muerte celular [37,38]. Por tal motivo, cualquier alteración en los segmentos renales hay una estrecha correlación entre las funciones mitocondriales y del ER [39].

2. Antecedentes

2.1. La insuficiencia renal aguda (AKI) y la enfermedad renal crónica (CKD)

El término insuficiencia renal aguda (AKI) se utiliza para englobar un conjunto de patologías que se caracterizan por un deterioro repentino de las funciones renales en un intervalo de tiempo relativamente corto, generando un aumento en la creatinina en sangre, así como la desregulación en la homeostasis ácido-base y osmótica del riñón [40,41]. A nivel mundial, se ha observado un aumento creciente en el número de casos de AKI durante las últimas dos décadas [42], estimándose que anualmente 13 millones de personas experimentan episodios de AKI [43]. Esto genera un escenario alarmante, puesto que la AKI se asocia con altas tasas de mortalidad en pacientes con complicaciones cardiovasculares [44]. Si bien existen diversas causas de la AKI, las más comunes son: procesos isquémicos o de oclusión, así como el consumo de ciertos fármacos y la exposición a contaminantes ambientales [45–48].

Por otro lado, la enfermedad renal crónica (CKD) se da como resultado de una serie de insultos agudos y continuos, que generan la pérdida inicial de nefronas. En un intento por compensar dicha pérdida, el riñón desencadena cambios hemodinámicos, vasculares e inflamatorios, que conducen a una mayor pérdida de nefronas, generando así daños a largo plazo y la pérdida progresiva de la función renal [49,50]. De acuerdo con la Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (KDOQI) de la Fundación Nacional Americana del Riñón, que toma como principal parámetro de referencia a la tasa de filtración glomerular (GFR), la CKD en humanos puede definirse como: una GFR menor a $60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ por 3 meses o más, junto con anomalías funcionales y estructurales en el riñón, que puede o no manifestarse por el incremento en los marcadores clínicos de daño renal [51]. La naturaleza progresiva de la enfermedad llevó a la KDOQI a clasificarla en 5 estadios tomando como parámetro la caída en la GFR, donde menos de $15 \text{ mL/min/1.73m}^2$ se considera como estadio 5 o enfermedad renal en etapa terminal, punto en el cual el paciente precisa de diálisis o trasplante para sobrevivir.

En las últimas décadas, el número de pacientes con CKD ha aumentado dramáticamente, pasando a la lista de las principales causas de mortalidad a nivel mundial, del puesto 27 en 1990 al puesto 18 en 2014 [52,53]. En México, la CKD representa la octava causa de defunción en varones y la sexta en mujeres de entre 20 a 59 años. La situación en nuestro país es alarmante debido a que presenta el mayor incremento en el número de pacientes por millón de habitantes de América Latina [54,55] y las mayores tasas de mortalidad en pacientes [56,57]. En estudios realizados en poblaciones americanas se ha identificado a la hipertensión, la diabetes mellitus, la hiperlipidemia, la proteinuria, la obesidad, el tabaquismo y el uso indiscriminado de medicamentos como los principales factores de riesgo para desarrollar CKD [49,51,58].

Así mismo, se ha demostrado tanto en modelos animales como en pacientes, que un episodio fuerte de AKI o una serie de ellos puede resultar en el desarrollo de CKD [5,50,51]. Dado que ambas enfermedades están consideradas como problemas crecientes de salud pública en todo el mundo [59–61] y al hecho de que los enfoques clínicos muchas veces son insuficientes para prevenir el avance de estas enfermedades [49,51,62], se ha propuesto la idea de que para desarrollar mejores terapias se debe partir de una visión más integrativa de los procesos involucrados en la génesis de la AKI y su progresión hacia la CKD [40,63].

2.2. Las mitocondrias y su papel en la enfermedad renal

Los riñones tienen una alta demanda energética y un alto consumo de oxígeno asociado a la OXPHOS [8,26]. Además de ser las principales productoras de ATP en el riñón, las mitocondrias modulan funciones celulares relacionadas a la homeostasis de calcio, apoptosis y señalización celular [21,64–66] y se les considera como uno de los principales sitios de generación de ROS [28], las cuales en exceso contribuyen al desarrollo y progresión de diversas enfermedades. Dado que la homeostasis mitocondrial es esencial para el mantenimiento de la función renal [66], en los últimos años ha tomado fuerza la idea de que la disfunción mitocondrial juega un papel fundamental en la génesis y el desarrollo de enfermedades renales [22,66–68].

2.2.1. Alteraciones en la bioenergética mitocondrial en la AKI y la CKD

Se ha demostrado en los modelos *in vivo* de AKI inducidos por cisplatino, isquemia/reperfusión [17], gentamicina [17] y maleato [69], que los segmentos tubulares ricos en mitocondrias como el PT y TAL son los más propensos a sufrir daño. Además, en estos modelos existe una correlación entre el daño tubular y alteraciones mitocondriales tales como: la disminución en el $\Delta\Psi_m$, la caída en los

niveles de ATP y un desplazamiento de la dinámica mitocondrial hacia la fisión [17,69]. Aunado a esto, las alteraciones en la bioenergética mitocondrial se han relacionado con defectos tubulares en pacientes con patologías renales, como el síndrome de Fanconi, el síndrome de Bartter y la enfermedad renal quística, entre otros [20,70].

En el caso de la CKD, esta se desarrolla como resultado de un conjunto de mecanismos patológicos, que incluyen variaciones hemodinámicas, hipertrofia, inflamación, fibrosis y estrés oxidante [50]. Por lo que la pérdida continua de nefronas desencadena una hipertrofia compensatoria y el aumento en la síntesis de biomacromoléculas en el riñón [50]. Así mismo, la GFR por nefrona (snGFR) aumenta, favoreciendo mayores tasas de reabsorción de solutos y por tanto mayor consumo de energía por nefrona [71,72]. El aumento en la reabsorción de solutos y la hipertrofia compensatoria generan una demanda excesiva de ATP en los segmentos tubulares, lo cual se ha postulado que induce estrés en las mitocondrias [50,73–75]. En la literatura existe un consenso de que las mitocondrias en la progresión hacia la CKD no son capaces de responder efectivamente a este aumento en la demanda de ATP [73,76,77], como lo demuestra la acumulación de fosfato inorgánico, los bajos niveles de ATP, el aumento en el consumo de oxígeno y la disminución del transporte de sodio en el riñón. Dichos cambios se han descrito ampliamente en pacientes con CKD [78–80] y son particularmente mayores en los segmentos altamente dependientes del ATP mitocondrial, como el PT [81–84].

En el caso de los modelos de CKD por nefrectomía, en estudios realizados a 8, 12 y 13 semanas después de la cirugía, se observaron menores niveles de ATP en la corteza renal, un menor $\Delta\Psi_m$, alteraciones en el ETS y específicamente una menor actividad de los complejos mitocondriales I (CI) y III (CIII) y la pérdida de la definición de las crestas mitocondriales en el PT [32,85,86]. Lo que sugiere que en estadios avanzados hay una acumulación de mitocondrias disfuncionales y con producción ineficiente de ATP [32,74,85–88]. En comparación, a 9 meses de evolución en la CKD inducida por isquemia/reperfusión, se observó la acumulación de mitocondrias pequeñas, con crestas anormales y signos de degradación proteolítica [89,90]. Aunado a esto, evidencias recientes sugieren que el ciclo de Krebs renal también se encuentra disfuncional en la CKD. En las biopsias renales de pacientes con CKD se ha descrito una reducción en los niveles de ácido ribonucleico mensajero (mRNA) de las proteínas del ciclo de Krebs y algunos de los metabolitos de esta vía en orina [80].

En conjunto, estos datos sugieren que las alteraciones en la bioenergética mitocondrial son un mecanismo común involucrado en la progresión hacia la CKD. Sin embargo, nuestro conocimiento sobre las alteraciones en la bioenergética

mitocondrial renal y su participación en la progresión hacia la CKD es limitado, dado que la información existente en la literatura es escasa. Aunado a esto, los datos acerca de las mediciones bioenergéticas y del consumo de oxígeno mitocondrial realizadas por oximetría de baja resolución en algunos casos son contradictorios [91–93] y los trabajos existentes se han realizado en un solo tiempo [73,74,93]. Por lo que, hasta la fecha, no existe una descripción temporal de los cambios que ocurren en las mitocondrias a lo largo de la progresión hacia la CKD.

2.2.2. Las especies reactivas del oxígeno (ROS) mitocondriales y el estrés oxidante

Los niveles excesivos de ROS mitocondriales conducen al estrés oxidante, definido como un desequilibrio entre la producción de ROS y el sistema antioxidante [94]. El cual se ha asociado ampliamente con cambios en la bioenergética mitocondrial [73,91,95] y con la alteración en los procesos que regulan la dinámica y recambio mitocondriales [96,97]. De hecho, el estrés oxidante se ha relacionado con la génesis y la progresión de diversas patologías renales incluidas la AKI y la CKD [98–100]. En el caso de la IRE, en diversos modelos animales se ha descrito que el aumento del estrés oxidante precede a la pérdida del $\Delta\Psi_m$ y al aumento en los marcadores de daño renal clínicos [20,101-104]. Por su parte en los estudios de progresión hacia la CKD, la participación del estrés oxidante, y en especial el mitocondrial, está menos estudiada. En el caso de los modelos de nefrectomía, a las 24 h posteriores a la cirugía, se describió un aumento en la producción mitocondrial de ROS y un aumento en los niveles de los marcadores de estrés oxidante en la mitocondria [73]. Por su parte, en estadios más avanzados, posteriores a los 28 días, se ha reportado que los niveles de ROS mitocondriales y los marcadores de estrés permanecen altos, así como una disminución en los niveles de glutatión reducido (GSH) y una actividad reducida de la superóxido dismutasa (SOD) mitocondrial [32,85,86,88,105]. Tomados en conjunto, estos datos sugieren un estado pro-oxidante permanente en las mitocondrias a lo largo de la progresión hacia la CKD, sin embargo, esta hipótesis no ha sido mediante estudios temporales.

Recientemente se propuso que, en condiciones patológicas, las mitocondrias integran un mecanismo de retroalimentación positiva de producción de ROS con la nicotinamida adenina dinucleotido fosfato (NADPH) oxidasa (Nox) en el riñón, la cual presenta subunidades membranales tanto en la membrana citoplásmica como mitocondrial [87,106,107]. En modelos murinos las ROS mitocondriales son capaces de activar a la proteína cinasa C (PKC), lo que conduce a la fosforilación de la subunidad p47phox de la Nox y por tanto a la activación de esta enzima [108,109]. Por su parte, el aumento excesivo en la producción de ROS por la Nox puede inducir la disfunción del ETS mitocondrial, principalmente en el CI, favoreciendo así el aumento en la producción de ROS mitocondriales [107,109].

Este mecanismo es particularmente importante ya que la sobreactivación de la Nox ha sido ampliamente reportada en diversos modelos de CKD y se ha relacionado fuertemente con el daño tubular, la glomerulosclerosis, el aumento en las citocinas proinflamatorias y los factores profibróticos [110-112], así como la sobreactivación del sistema renina-angiotensina II [113-115].

Adicionalmente, se sabe que las ROS mitocondriales son capaces de promover diversos procesos relacionados con la progresión de la CKD. Tal es el caso del factor inducible por la hipoxia (HIF), el cual puede ser estabilizado por las ROS tanto en normoxia como en hipoxia [82,116]. Aunado a esto, se sabe que HIF activa procesos como la inflamación, la apoptosis y posteriormente la fibrosis, relacionados a la pérdida progresiva de la función renal [117]. Así mismo, las ROS mitocondriales también pueden activar al inflammasoma NLRP3, el cual aumenta la respuesta inflamatoria activando la señalización mediada por NF- κ B, contribuyendo aún más al proceso fibrótico [31,32]. De igual manera, las ROS mitocondriales junto con la aldosterona favorecen la transición epitelio-mesénquima en las células tubulares [118], promoviendo así el proceso fibrótico.

2.2.3. Dinámica mitocondrial y recambio en el daño renal

La mitocondria es un orgánulo altamente dinámico, el cual se encuentra constantemente involucrado en procesos de fisión (fragmentación) o fusión (unión). Así como en procesos de degradación de sus componentes dañados (mitofagia) y de síntesis de nuevos componentes (biogénesis). En conjunto, estos procesos determinan su morfología, tamaño y distribución a lo largo de la célula [119,120]. La fusión mitocondrial está regulada por las proteínas implicadas en la fusión de la MOM, mitofusinas 1 (MFN1) y 2 (MFN2), y por la proteína que participa en la fusión de la MIM, la proteína de atrofia óptica 1 (OPA1) [19]. Por otro lado, el proceso de fisión está regulado por la proteína 1 relacionada a la dinamina (DRP1) y por cuatro proteínas adaptadoras: la proteína de fisión 1 (FIS1), el factor de fisión mitocondrial y los factores de alargamiento mitocondrial 1 y 2 [19,121].

Por otro lado, la bioenergética mitocondrial está estrechamente coordinada con la dinámica, favoreciendo la fisión o la fusión dependiendo de la demanda de energía [107,108]. Así mismo, las ROS mitocondriales pueden regular la morfología y la dinámica mitocondrial, favoreciendo el estrés oxidante en términos generales y la fragmentación de las mitocondrias y su posterior degradación [122]. Por lo tanto, existe una estrecha relación entre los procesos bioenergéticos, redox y dinámicos en las mitocondrias [123].

Por otro lado, el proceso de degradación selectiva de las mitocondrias por autofagia se conoce como mitofagia. Este proceso está regulado por la cinasa putativa

inducida por PTEN 1 (PINK1), cuyo aumento en la MOM es causada por la despolarización de las mitocondrias [124]. La proteína Pink1 activa a la E3-ubiquitina ligasa Parkin, que ubiquitina a las proteínas de la MOM permitiendo el reclutamiento de maquinaria de autofagia [122]. La importancia de este proceso radica en eliminar a las mitocondrias dañadas, evitando así la acumulación nociva de mitocondrias dañadas y por tanto el aumento del estrés oxidante [125].

En el caso del riñón, en los modelos de AKI por cisplatino y maleato, se ha descrito un desplazamiento de la dinámica mitocondrial hacia la fisión [19]. Así mismo, se ha descrito la acumulación de proteínas de autofagia y de mitofagia en ratas con nefrectomía a los 28 días posteriores a la cirugía [74]. Esto en conjunto con estudios de microscopía electrónica que revelan la acumulación de cuerpos autofágicos, podría indicar una mitofagia defectuosa en el daño renal [74,126]. Sin embargo, existen discrepancias en los cambios temporales en las proteínas de dinámica [73,74,88,92,127] y biogénesis mitocondriales [74,88] en la AKI y su transición hacia la CKD, mientras que los datos existentes sobre la mitofagia son insuficientes [74]. Por lo tanto, mayores estudios de estos mecanismos permitirían profundizar más acerca de su papel en las alteraciones de la función mitocondrial en la enfermedad renal, esto con el objetivo de desarrollar terapias que permitan prevenir el avance de la CKD.

2.3. El modelo de daño renal por nefrectomía 5/6

La nefrectomía cinco sextos (5/6Nx) es un modelo experimental ampliamente utilizado para estudiar los mecanismos implicados en la progresión de la CKD, porque debido a que la ablación renal desencadena un deterioro progresivo que emula la CKD clínica [12,13]. En este modelo, poco después de la cirugía (1 día), los cambios adaptativos en la masa remanente como el estado hipermetabólico, los cambios hemodinámicos y la hipertrofia desencadenan el deterioro de la bioenergética mitocondrial [5,13], caracterizada por una reducción en la capacidad de OXPHOS y desacoplamiento mitocondrial [14]. Además, la alteración de la bioenergética mitocondrial observada desde el día 1 persiste hasta el día 28 [15]. Tal efecto favorece la disminución de la β -oxidación mitocondrial y la producción de ATP, favoreciendo el estrés oxidativo permanente en la mitocondria, desencadenando el desarrollo de CKD en el modelo 5/6Nx [15]. Este deterioro mitocondrial se relacionó por primera vez con una reducción en la actividad de los complejos del ETS [14, 15]. Sin embargo, los otros procesos que regulan la dinámica y el recambio mitocondrial (fisión, fusión, biogénesis y mitofagia) [16] también podrían estar involucrados, conforme progresa la enfermedad. Sin embargo, hasta el momento no existen estudios temporales del cambio en la biogénesis, dinámica y mitofagia mitocondrial que permitan determinar la

participación de este proceso en el deterioro mitocondrial en el modelo 5/6Nx. Por lo tanto, su participación en la progresión del daño renal en este modelo no está caracterizada a lo largo de la progresión de la 5/6Nx.

3. Justificación

La relevancia de este proyecto se basa en que actualmente, los mecanismos moleculares, en especial los relacionados con las mitocondrias, por los cuales se induce la progresión hacia la CKD siguen siendo poco conocidos. Debido a que la función renal depende ampliamente de la homeostasis mitocondrial, estudios que nos permitan comprender el papel de las alteraciones mitocondriales dentro las enfermedades renales podrían ser de gran relevancia dado que la información existente en la literatura es escasa, fragmentaria, en algunos casos contradictoria, y que hasta el momento no se han realizado estudios temporales de las alteraciones mitocondriales.

Este estudio nos permitirá entender no sólo el papel de la disfunción mitocondrial en la nefrectomía 5/6, sino también su avance temporal y su participación en el establecimiento de la CKD. Para poder responder estas preguntas se evaluarán cambios en la función (alteraciones en la bioenergética, estado redox, biogénesis, dinámica y mitofagia) y en la ultraestructura mitocondrial durante la progresión a CKD.

Entender estos mecanismos mitocondriales abrirá la posibilidad de plantear estrategias que permitan prevenir o retrasar su avance, aminorando así el impacto de esta enfermedad en la salud pública.

4. Hipótesis

El desarrollo de la CKD inducida por 5/6Nx estará asociada a la pérdida progresiva de la homeostasis bioenergética y estado redox mitocondrial, favoreciendo además alteraciones en la ultraestructura, biogénesis y dinámica de este orgánulo. Dichas alteraciones persistirán en el curso temporal, lo cual favorecerá el desarrollo de la CKD en este modelo.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Primera parte del proyecto:

Determinar si en la CKD inducida por 5/6Nx existen alteraciones en la bioenergética, ultraestructura y estado redox mitocondrial.

Segunda parte del proyecto:

Determinar la participación de los procesos que regulan la dinámica y el recambio mitocondrial (biogénesis, fisión, fusión y autofagia) en el deterioro mitocondrial en el modelo 5/6Nx.

5.2. Objetivos particulares

- Caracterizar las alteraciones en el consumo de oxígeno mitocondrial, la capacidad de la OXPHOS y los cambios en el $\Delta\Psi_m$ en los distintos estados respiratorios.
- Identificar los cambios en la actividad de los complejos mitocondriales.
- Evaluar el estado redox mitocondrial y la actividad de las enzimas antioxidantes.
- Analizar los cambios en la ultraestructura y morfología mitocondrial.
- Evaluar la biogénesis, dinámica y autofagia mitocondriales.

6. Materiales y métodos

6.1 Reactivos

Amplex Red, antimicina A, sal sódica de Adenosina-5-difosfato (ADP), L-arginina, albúmina sérica bovina (BSA), BSA libre de ácidos grasos, cianuro de carbonilo m-clorofenilhidrazona (CCCP), citocromo c de corazón equino, D-(+)-glucosa, D-manitol, decilubiquinona (DUB), sal de sodio de hidrato de 2,6-diclorofenol (DCPIP), ácido 5,50-ditio-bis-(2-nitrobenzoico) (DTNB), ácido etilenglicol-bis(β -aminoetiléter)-N,N,N',N-tetraacético (EGTA), glutatión reducido (GSH), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oligomicina, GR, hexoquinasa, ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico (HEPES), peroxidasa de rábano picante (HRP), K-lactobionato, L-carnitina, palmitoil-L-carnitina, cloruro de manganeso (II) ($MgCl_2$) tetrahidrato, NADPH, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato ($NADP^+$), nicotinamida adenina dinucleótido hidrógeno (NADH), nitroazul tetrazolio (NBThído), cianuro de potasio (KCN), rotenona, safranina O, hematoxilina, eosina, succinato de sodio dibásico, glutamato de sodio, L-ascorbato de sodio, malato de sodio, piruvato de sodio, dodecilsulfato sódico (SDS), sacarosa, tampón de cacodilato de taurina, tetraóxido de osmio, acetato de uranilo, citrato de plomo y tetrametil-p-fenilendiamina (TMPD) de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos). El cloruro de calcio ($CaCl_2$), el bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$), ácido etilendiaminotetracético (EDTA), el fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) y el fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4) se adquirieron de JT Baker (Xalostoc, Edo. Mex., México). El polifruetosano (Inutest®) se adquirió de Fresenius-Kabi (Linz, Austria). El ácido tricloroacético, el ácido sulfúrico y la antrona se adquirieron de Merck (Naucalpan, Edo. Mex., México). El pentobarbital sódico (Sedalphorte®, Ciudad de México, México), utilizado como sedante, de Salud y Bienestar Animal S.A. de C.V. (Ciudad de México, México). Los reactivos para medir la creatinina plasmática y nitrógeno ureico en sangre (BUN) se adquirieron de Spinreact (Girona, España).

6.2 Modelo experimental

El protocolo experimental fue aprobado por el Comité Institucional de Uso y Cuidado Animal (CICUAL) del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" (INC/CICUAL/014/2018) fecha de aprobación: 22/11/2018) y se realizó de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana para el uso y cuidado de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y para disposición de residuos biológicos (NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002) y La Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio 8a. Edición. Se separaron aleatoriamente ratas Wistar macho con un peso corporal inicial entre 250 y 300 g en dos grupos: (1) ratas operadas simuladamente (Sham) y (2) grupo de nefrectomía 5/6 (5/6Nx). Bajo anestesia con pentobarbital sódico (60 mg/kg), se realizó ablación renal mediante la extirpación del riñón derecho e infarto selectivo de aproximadamente dos tercios del riñón izquierdo mediante ligadura de dos o tres

ramas de la arteria renal. El análisis se realizó los días 2, 4, 7, 14 y 28 después de la cirugía 5/6Nx o simulada, con n=4 por grupo para cada punto de tiempo. Los animales se alojaron a temperatura controlada (22-24°C) con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h/12 h y se mantuvieron con agua y alimento *ad libitum*. Al final de cada punto de tiempo, en estos animales se realizó la eutanasia con pentobarbital sódico (120 mg/kg) y se extirpó la masa renal remanente para un análisis adicional. Se extrajo sangre de la aorta abdominal, se separó el plasma y se almacenó a 4°C para determinar el BUN y la creatinina plasmática como marcadores de la función renal. Se asignaron grupos adicionales de ratas Sham y 5/6Nx para realizar estudios hemodinámicos renales los días 7, 14 y 28 (n= 8/ grupo).

6.3 Marcadores de daño renal y parámetros hemodinámicos

La determinación de los marcadores de daño renal de BUN y creatinina en plasma se realizó mediante el uso de estuches comerciales (Spinreact, Girona, España). Brevemente, el ensayo de la creatinina se basó en la reacción de la creatinina con el picrato en medio alcalino, la cual forma un complejo rojizo cuya intensidad puede ser seguida a 495 nm y es proporcional a la concentración de creatinina en la muestra. Por su parte la determinación de BUN se basó en la disminución de la absorbancia a 340 nm del NADH por acción coordinada de la enzima glutamato deshidrogenasa y la ureasa, la cual es proporcional a la concentración de la urea total en la muestra [73].

Con el objetivo de determinar las alteraciones hemodinámicas, las ratas se anestesiaron vía intraperitoneal con pentobarbital sódico (60 mg/kg) y se colocaron en una mesa homeotérmica (37°C). Una vez comprobada la ausencia de reflejos se cateterizaron la tráquea, ambas venas yugulares, ambas arterias femorales y la vejiga con catéteres de polietileno PE-240, PE-50 y PE-90, respectivamente. Para el mantenimiento del equilibrio de hidratación, las ratas se mantuvieron bajo una infusión de BSA isotónica (6 g/dL) durante la cirugía, seguida de una infusión fisiológica de solución salina isotónica (0.9%) a 2.2 mL/h [73].

La presión arterial media (MAP) se monitoreó por medio de un transductor de presión (Modelo MLT844, AD Instruments, Colorado Springs, CO, EUA) colocado en la arteria femoral y los datos se registraron por el sistema de adquisición de datos Power Lab (Advanced Instruments Inc., Needham Heights, MA, EUA). El riñón izquierdo se expuso y se colocó en una capsula de lucita. Para impedir la deshidratación de la superficie del riñón, este se cubrió con un algodón empapado con solución salina. La medición del flujo sanguíneo renal (RBF) se realizó con una sonda de flujo ultrasónico con tránsito de 2 mm (TS420, Transonic System, NY, NY, USA) colocada alrededor de la arteria renal izquierda, la cual se cubrió con gel de

acoplamiento de ultrasonidos Realizocon para registrar. La resistencia vascular renal (RVR) se calculó con la fórmula $RVR = MAP/RBF$. Se tomó una muestra de sangre en microcapilares y se centrifugó en una centrífuga para micro hematocrito (MICRO-MB, Thermo IEC, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA) y se leyó con un lector de microcapilares (Damon IEC Division, Needham Heights, MA, USA).

Para evaluar la GFR las ratas se infundieron con polifructosán al 5% en solución salina isotónica a una velocidad de 2.2 mL/h. La infusión se dejó un período de 60 minutos para alcanzar el equilibrio y se obtuvieron muestras de plasma y orina, posteriormente, se recolectó la orina por un período de 30 minutos y se obtuvieron nuevamente muestras de plasma. El contenido de polifructosán se midió espectrofotométricamente a 450 nm en plasma y orina, para el cálculo de la GFR [73]. El flujo plasmático renal (RPF) se calculó con la fórmula $RPF = RBF \cdot (1 - \text{hematocrito})$; mientras que la fracción de filtración (FF) se definió como $FF = GFR/RPF$.

6.4 Estudios histológicos y de microscopia electrónica de trasmisión

Para los estudios histológicos, los riñones se retiraron inmediatamente y se seccionaron después de la eutanasia. Una porción del tejido se fijó inmediatamente por inmersión en una solución de formaldehído al 10% disuelta en solución salina amortiguada con fosfatos (PBS), a pH 7.4. Después de 1 día de fijación, las secciones de riñón se deshidrataron con soluciones de concentración progresiva de alcohol y se incrustaron en parafina. Se obtuvieron secciones de 5 μm de ancho, las cuales se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) o tricrómica de Masson, respectivamente, para su evaluación histológica.

Para los estudios ultraestructurales de microscopia electrónica se fijaron pequeños fragmentos de tejido renal con glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilato 0.15 M. Posteriormente se fijaron con tetraóxido de osmio al 1%, se deshidrataron con concentraciones crecientes de alcohol etílico y se infiltraron en resina EPON™ (London Resin Company, London, Reino Unido). Las secciones ultrafinas se colocaron secciones de 70 a 90 nm en rejillas de cobre y se contrastaron con sales de acetato de uranilo y citrato de plomo. Posteriormente se observaron con un microscopio electrónico (Tecnai Spirit BioTwin, FEI, Hillsboro, OR, EUA), para la captura de las micrografías correspondientes.

Para los estudios de inmunomicroscopía electrónica, fragmentos pequeños de la corteza renal se fijaron por inmersión de 2 h a 4°C en paraformaldehído al 4% en amortiguador Sörensen pH 7.4 y se embebieron en resina hidrosoluble LR-White.

Secciones delgadas de 70-90 nm se montaron en rejillas de níquel y se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente con el anticuerpo respectivo. Después de un lavado exhaustivo, se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas con inmunoglobulina G (IgG) de cabra anti-conejo conjugado a partículas de oro de 5 nm. Las rejillas se contrastaron con sales de uranio y se analizaron con el mismo microscopio electrónico mencionado anteriormente.

6.5 Evaluación de histología y microscopía electrónica

Inmediatamente después del sacrificio del animal, se fijaron láminas delgadas de tejido de masa renal remanente mediante inmersión en una solución mixta de paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 1,5% pH=7.2. Se deshidrató un portaobjetos de tejido delgado (1 mm de ancho) y se incrustó en paran, se seccionó a 5 μ m, se tiñó con hematoxilina y eosina (H&E) y tricómico de Masson para cada vez. Para medir el daño renal, cada diapositiva se fotografió utilizando un sistema de cámara que produjo una imagen del área renal completa, correspondiente a un área del 100%. Luego, las áreas focales de daño tubular y fibrosis intersticial se delimitaron y midieron con el analizador de software (Qwin, Leica, Wetzlar, Alemania). Finalmente, se determinó el porcentaje de la superficie de la lesión renal. Para la evaluación de microscopía electrónica ultraestructural, se fijaron pequeños fragmentos de tejido de la masa renal remanente con glutaraldehído al 2,5% en tampón cacodilato 0,15 M, se fijaron posteriormente con tetróxido de osmio al 1%, se deshidrataron con alcohol etílico en concentraciones ascendentes y se infiltraron en resina epoxi. Las secciones ultrafinas se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo, y posteriormente se observaron con un microscopio electrónico (Tecnai Spirit BioTwin, FEI, Hillsboro, OR, EE. UU.).

6.6 Aislamiento de mitocondrias

El aislamiento de las mitocondrias del tejido renal se realizó a partir de un protocolo de centrifugación diferencial con gradientes de Percoll previamente descrito [73]. Brevemente, de manera inmediata después del sacrificio, el riñón decapsulado se enfrió inmediatamente por inmersión en solución de medio de aislamiento "A" (D-manitol 225 mM, sacarosa 75 mM, EDTA 1 mM, HEPES 5 mM, BSA al 0,1% pH = 7.4) a 4°C. El tejido se lavó para eliminar la sangre y se cortó un tercio del riñón en pequeños trozos, los cuales se suspendieron en 2 mL de medio de aislamiento "A" en un homogeneizador de vidrio Potter-Elvehjem. Dichos fragmentos se homogeneizaron por 4 pulso con un mortero de TeflonVR acoplado a un taladro.

El homogeneizado se centrifugó durante 5 minutos a 2,500 x g a 4°C y el sobrenadante se volvió a centrifugar 10 minutos a 12,000 x g a 4°C. El botón resultante se resuspendió en una solución de 12% de Percoll con medio de

aislamiento "A". Dicha solución se colocó cuidadosamente sobre una cama de 1.5 mL de Percoll al 24% en medio de aislamiento "A", generándose 2 fases. Las muestras se centrifugaron a 15,000 x g durante 15 min a 4°C. Finalmente la fracción enriquecida en mitocondrias que corresponde a la parte inferior del tubo se resuspendió en medio de aislamiento sin BSA (medio "B") y se centrifugó de nuevo a 12,000 x g durante 5 min como lavado. El botón resultante se resuspendió en 180 µL de medio de aislamiento B. La proteína total se cuantificó por el método de Lowry.

6.7 Consumo de O₂ y β-oxidación mitocondriales

La evaluación del consumo mitocondrial de O₂ se realizó utilizando un equipo de respirometría de alta resolución (Oxygraph O2k, OROBOROS, Innsbruck, Austria) a 37 °C. Brevemente, 200 µg de mitocondrias recién aisladas se adicionaron a una celda con un volumen total de 2 mL de medio de respiración MiR05: EGTA 0.5 mM, MgCl₂ 3 mM, lactobionato de potasio 60 mM, taurina 20 mM, fosfato monobásico de potasio (KH₂PO₄) 10 mM, HEPES 20 mM, sacarosa 110 mM y BSA libre de ácidos grasos 1 g/L.

El transporte de electrones se inició mediante la adición de los sustratos ligados al complejo I (CI) [piruvato 5 mM, malato 2 mM y glutamato 10 mM] o por la adición del sustrato ligado al complejo II (CII) [succinato 10 mM más inhibidor del CI, rotenona 0.5 µM]. La respiración asociada al CI más el CII (CI + CII) se determinó mediante la adición de los sustratos ligados al CI y al CII, pero sin la presencia de rotenona. La respiración en el estado 3 respiratorio (S3) se estimuló a partir de la adición de ADP 2.5 mM. Mientras que para el estado 4 respiratorio inducido por oligomicina (S4o), se adicionó oligomicina 2.5 µM. Por su parte, para la determinación de los parámetros respiratorios asociados a la β-oxidación mitocondrial, se utilizaron los sustratos aptos para el riñón: L-carnitina 2 mM, palmitoil-L-carnitina 2 µM más malato 2 mM [128].

Todos los parámetros anteriormente mencionados se corrigieron por respiración residual (ROX), obtenida tras la adición de rotenona 0.5 µM más antimicina A 2.5 µM (inhibidor del CIII). El índice de control respiratorio (RCI) se definió a partir de la relación S3/S4o y la respiración asociada a la OXPHOS (P) se definió como S3-S4o. Todos los valores se normalizaron sobre el contenido total de proteína determinado por el método de Lowry [129].

6.8 Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

Los cambios en el $\Delta\Psi_m$ en los diferentes estados respiratorios se determinaron utilizando un fluorómetro de O2k (OROBOROS, Innsbruck, Austria) a partir de los cambios en la fluorescencia del colorante catiónico Safranina O (2 a 5 µM) en medio

MiR05 [28]. Para estimular la respiración CI, CII o CI + CII, se agregaron los sustratos respectivos (sección 6.6). El $\Delta\Psi_m$ mitocondrial en S3 se obtuvo mediante la adición de ADP saturado 2.5 mM y en S4o por la adición de oligomicina 2.5 μM . Para disipar completamente el $\Delta\Psi_m$ y corregir por las interacciones no específicas de la safranina, se añadió CCCP 5 μM . Se emplearon curvas de calibración de safranina para garantizar la linealidad del ensayo. Los resultados se expresaron como los cambios en la concentración medible de safranina O ($\Delta\mu\text{M}$ de S) en S3 o S4o con respecto al desacoplamiento de CCCP y los resultados se normalizaron por miligramo de proteína utilizados ($\Delta\mu\text{M}$ de S/mg de proteína).

6.9 Actividad de los complejos mitocondriales

Las actividades de los complejos mitocondriales se determinaron utilizando el protocolo antes descrito [73]. Brevemente: la actividad de CI y del CII se determinaron a partir de la desaparición de la absorbancia del decilubiquinol a 600 nm. Mientras que la actividad del CIII se evaluó por el aumento en la absorbancia del citocromo c a 550 nm. Finalmente, la actividad del complejo IV (CIV) se evaluó por el consumo de oxígeno en presencia de TMPD más ascorbato. La actividad de cada complejo se determinó en experimentos por separado. Las técnicas se describen a continuación:

6.9.1 Actividad del complejo I (CI)

La medición se realizó utilizando placas de 96 pozos. Las mediciones de absorbancia se realizaron utilizando un lector de microplacas Synergy-Biotek (Biotek Instruments, Winooski, VT, EUA). En cada pozo se colocó la mezcla de reacción, la cual contenía: BSA 3.5 mg/mL, DCPIP 67 μM , antimicina A 1 μM , NADH 0.2 mM, KCN 0.2 mM PBS 30 mM (pH 7.4), en un volumen total de 300 μL y se adicionaron 5 μg de proteína mitocondrial. Para cada muestra se realizó un duplicado al cual se le adicionó rotenona 13 μM como inhibidor. Ambos pozos se incuban simultáneamente 5 min a 37°C. A continuación, se adicionaron 6 μL de DUB 3.12 mM en cada pozo para dar inicio a la reacción, la placa se agitó por 5 s y se realizó una cinética con lecturas cada 20 s por 3 min. La actividad total de la enzima se calculó como la actividad sin inhibidor menos la actividad enzimática con inhibidor presente.

6.9.2 Actividad del complejo II (CII)

La técnica se realizó en placas de 96 pozos, utilizando un lector de microplacas Synergy-Biotek (Biotek Instruments). En cada pozo se colocó la mezcla de reacción la cual contenía: BSA 5 mg/mL, DCPIP 67 μM , antimicina A 1 μM , succinato 15 mM, KCN 0.2 mM, PBS 30 mM (pH 7.4), en un volumen total de 300 μL y se adicionaron 5 μg de proteína mitocondrial. Para cada muestra se efectuó un duplicado al cual

se le adicionó malonato 10 mM como inhibidor, ambos pozos se incubaron simultáneamente durante 5 min a 37°C. La reacción se inició por adición de 6 μ L DUB 3.12 mM, la placa se agitó por 5 s y se realizó una cinética de 3 min con lecturas cada 20 s. La actividad de la enzima total se calculó como la actividad sin inhibidor menos la actividad con inhibidor.

6.9.3 Actividad del complejo III (CIII)

La técnica se realizó en placas de 96 pozos, utilizando un lector de microplacas Synergy-Biotek (Biotek Instruments). En cada pozo se colocó la mezcla de reacción la cual contenía: BSA a 0.4 mg/mL, Tween 220 μ M, rotenona 1 μ M, KCN 0.4 mM, MgCl₂ 0.6 mM, EDTA 0.1 mM, citocromo C oxidado 17 μ M, PBS 30 mM (pH 7.4), en un volumen total de 300 μ L y se adicionaron 2.5 μ g de muestra mitocondrial. A cada muestra se le realizó un duplicado al cuál se le adicionó antimicina A 30 μ M como inhibidor, ambos pozos se incuban simultáneamente 8 min a 37°C. Se adicionaron 5 μ L DUB reducida 3.12 mM para iniciar la reacción, la placa se agitó por 5 s y se realizó una cinética de 3 min cada 15 s. La actividad total de la enzima se calculó como la actividad sin inhibidor menos la actividad enzimática con inhibidor presente.

6.9.4 Actividad del complejo IV (CIV)

La actividad del CIV se determinó en medio de respiración MiR05 suplementado con rotenona 0.5 μ M más antimicina A 2.5 μ M. La evaluación del consumo mitocondrial de O₂ se realizó utilizando un equipo de respirometría de alta resolución (Oxygraph O2k, OROBOROS) a 37°C. Para iniciar la reacción se estimuló el consumo de oxígeno mediante la adición de TMPD 0.5 mM más ascorbato 2 mM, posteriormente se adicionó NaN₃ como inhibidor específico. La actividad total de la enzima se calculó como el consumo de oxígeno sin inhibidor menos el consumo de oxígeno con presencia del inhibidor.

6.10 Actividad de la ATP sintasa

La actividad de la ATP sintasa se determinó de manera indirecta a partir de la tasa de síntesis del NADPH a 340 nm, al acoplar la reacción de la ATP sintasa a la de la hexocinasa y a la de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa [130].

La técnica se realizó en placas de 96 pozos, utilizando un lector de microplacas Synergy-Biotek (Biotek Instruments). En cada pozo se colocaron: hexocinasa 4 U/mL, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) 2 U/mL, glucosa 20 mM, NADP⁺ 1.4 mM, los sustratos ligados al CI o al CII (sección 6.6), PBS 40 mM (pH = 7.4), en un volumen total de 300 μ L y se adicionaron 30 μ g de mitocondrias frescas. La reacción se inició con 200 mM de ADP y se siguió por 3 min cada 30 s. Se utilizó

oligomicina 10 μM como inhibidor específico, la cual se preincubó por 3 min y se siguió la cinética con oligomicina por 3 min cada 30 s. La actividad enzimática total se calculó como la actividad sin inhibidor menos la actividad con inhibidor presente.

6.11 Producción de H_2O_2 mitocondrial

La velocidad de producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) mitocondrial se midió utilizando un fluorómetro de O2k (OROBOROS, Innsbruck, Austria) y usando Amplex Red (10 μM) como sonda. Brevemente, mitocondrias recién aisladas se resuspendieron en 2.0 mL de medio de respiración MiR05 suplementado con HRP 0.5 U/mL. Para obtener la velocidad de producción de H_2O_2 en los diferentes estados respiratorios, se emplearon adiciones secuenciales como se describió previamente (sección 6.6) y se emplearon curvas de calibración de concentraciones de H_2O_2 para asegurar la linealidad del ensayo, una vez realizada la misma la velocidad de producción de peróxido de hidrógeno corresponde a la primera derivada del cambio en la concentración de H_2O_2 en función del tiempo, determinada por el equipo [131]. La producción basal de H_2O_2 se obtuvo mediante la adición de mitocondrias, la producción alimentando al CI en el estado respiratorio 6 (S4) (S4 ligado a CI) se midió mediante la adición de sustratos ligados a CI. La producción alimentando al CI S3 (S3 ligado a CI) se determinó mediante la adición de ADP 2.5 mM. Para determinar la producción alimentando al CI más CII en S3 (S3 ligado a CI+CII) se añadió succinato de sodio 10 mM. Finalmente, se añadió oligomicina 2,5 μM para determinar la producción en S4o (S4o ligado a CI+CII).

6.12 Actividad de las enzimas antioxidantes

Las actividades de las enzimas antioxidantes en las muestras correspondientes se realizaron de acuerdo a la siguiente metodología:

6.12.1 Superóxido dismutasa (SOD)

La actividad de la superóxido dismutasa (SOD) se determinó espectrofotométricamente a 560 nm utilizando nitroazul de tetrazolio (NBT) como indicador [132]. Las mediciones realizaron en placas de 96 pozos, utilizando un lector de microplacas Synergy- Biotek (Biotek Instruments). Para esto se preparó una mezcla de reacción con: xantina 0.3 mM, de NBT 150 μM , EDTA 0.6 mM y carbonato de sodio (Na_2CO_3) 400 mM, en un volumen total de 332 μL por pozo y la cinética se inició por adición de 30 μL de xantina oxidasa (XO) (5 mg/mL en NH_4SO_2 2M). La reacción se dejó avanzar por 15 minutos y se adicionó 0.8 mM de cloruro de cobre (CuCl_2) para parar la reacción. La absorbancia se determinó a 560 nm en cada una de las muestras y en un control positivo sin muestra. Se definió una unidad (U) de la SOD como la cantidad de enzima que evita la oxidación de 1 mol de NBT por minuto (en comparación con el control positivo), los resultados se expresaron

como U/mg proteína usados.

6.12.2 Glutación reductasa (GR)

La actividad de la glutación reductasa (GR) se determinó a partir la medición de la desaparición de NADPH a 340 nM usando glutación disulfuro u oxidado (GSSG) como sustrato. Las mediciones se realizaron en placas de 96 pozos, utilizando un lector de microplacas Synergy- Biotek (Biotek Instruments, Winooski, VT, EUA). Para esto se preparó una mezcla de reacción con EDTA 1 mM, NADPH 1 mM y GSSG 1 mM, en amortiguador de fosfatos 100 mM pH 7.4. El ensayo se inició por la adición de la muestra a 313 μ L de mezcla reacción, con lecturas cada minuto durante 3 min. La unidad de GR se definió como la cantidad de enzima que oxida 1 mol de NADPH/min, los datos se expresaron como U/mg de proteína utilizados.

6.12.3 Glutación peroxidasa (Gpx)

La actividad de la glutación peroxidasa (Gpx) se determinó a partir la desaparición del NADPH en una reacción acoplada a la GR. Las mediciones se realizaron en placas de 96 pozos, utilizando un lector de microplacas Synergy-Biotek (Biotek Instruments). Para esto se preparó una mezcla de reacción con: EDTA 1 mM, NaN3 1 mM, GSH 1 mM, NADPH 0.2 mM y GR 1 U/mL en PBS 50 mM pH 7.4. La muestra se adicionó a 300 μ L de mezcla de reacción y el ensayo se inició por la adición 30 μ L de una solución 1.25 mM de H₂O₂. Las lecturas se realizaron cada 30 s por 3 minutos. Una unidad (U) de GPx se definió como la cantidad de enzima que oxida 1 mol de NADPH en un minuto, los datos se expresaron como U/mg de proteína utilizados.

6.13 Extracción de proteína y Western Blot

Para la extracción total de proteínas, las respectivas muestras se resuspendieron en amortiguador de radioinmunoprecipitación (RIPA): Tris-HCl 40 mM, cloruro de sodio (NaCl) 150 mM, EDTA 2 mM, EGTA 1 mM, fluoruro sódico (NaF) 5 mM, ortovanadato de sodio (Na₃VO₄) 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM, desoxicolato de sodio al 0.5%, SDS al 0.1% pH 7.6, complementado con el cóctel de inhibidor de proteasas. Las muestras se homogeneizaron usando un homogeneizador Potter-Elvehjem y se centrifugaron a 15,000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Se recolectaron los sobrenadantes y la proteína total se cuantificó mediante el método de Lowry.

Las cantidades de proteína correspondientes se desnaturalizaron hirviéndolas durante 10 minutos y luego se diluyeron 1:5 en amortiguador Laemmli (Tris-HCl 60 mM, SDS al 2%, glicerol al 10%, β -mercaptoetanol al 5%, azul de bromofenol al 0.01% pH 6.8) [130]. Las muestras (20 μ g) y los estándares de peso molecular se

cargaron en geles de SDS-poliacrilamida y se realizó la electroforesis. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF). La unión a proteínas no específicas se bloqueó por incubación con leche en polvo sin grasa al 5% en amortiguador tris buffer salino (TBS) (Tween 20 al 0.4%) durante 1:30 h a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se incubaron durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario apropiado y posteriormente durante 1:30 h en la oscuridad con el anticuerpo secundario fluorescente correspondiente (1:10,000). Las bandas de proteínas se detectaron por fluorescencia en un equipo Odyssey (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, EUA). Las bandas de proteínas se analizaron con el software Image Studio™ Lite LI-COR Odyssey (LI-COR Biosciences).

6.14 Análisis estadístico

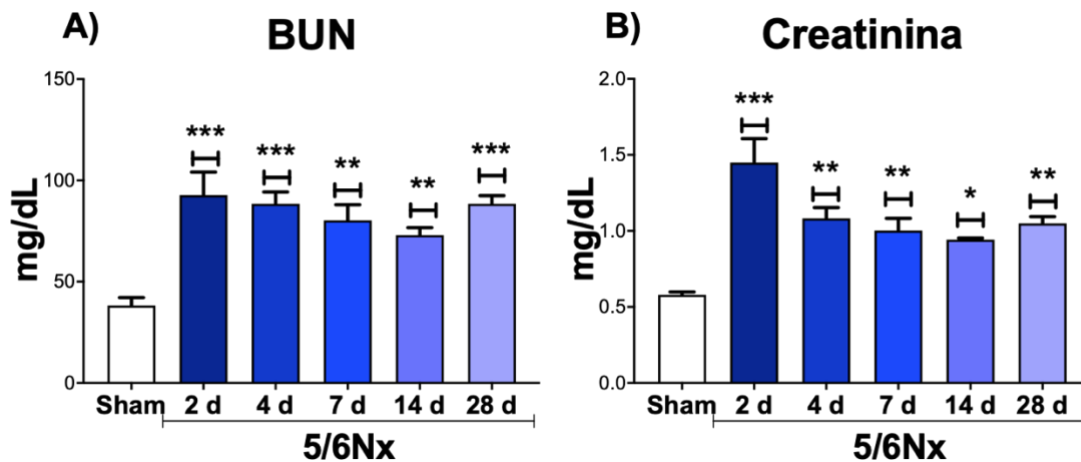
Los datos se presentan como \pm error estándar medio de la media (SEM). Se analizaron mediante un análisis de varianza unidireccional con una prueba de Dunnett posterior y se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson (r) para probar las variables de interés. Ambas pruebas se realizaron utilizando el software Graph-Pad Prism 8 (San Diego, CA, EE. UU.). El nivel de significancia se fijó en $p < 0,05$. Las pruebas estadísticas correspondientes se aclaran en cada uno de los pies de figura.

7. Resultados

Primera parte

7.1. Pérdida de función renal inducida por nefrectomía 5/6

Anteriormente informamos que 5/6Nx indujo el aumento de los marcadores de daño renal, BUN y creatinina en plasma 24 h después de la cirugía [133,18]. La Figura 1A, B muestra que ambos marcadores permanecen elevados el día 2 y muestran una recuperación parcial de la creatinina sérica de los días 4 a 28 en el grupo 5/6Nx, lo que confirma el mantenimiento del daño renal. Además, la evaluación histológica mediante tinción con hematoxilina y eosina (H&E) y tricrómico de Masson de la masa renal remanente muestra en el día 2 pequeñas áreas focales de atrofia del túbulo contorneado proximal que se manifiesta por células epiteliales aplanadas con algunas células necróticas. Algunos de estos túbulos presentaban cilindros hialinos en sus luces y estaban rodeados de edema intersticial con escasas células inflamatorias (Figura 1D). Estas áreas focales aumentan progresivamente con el tiempo en tamaño y número, como lo muestran las mediciones de morfometría automatizadas (Figura 1C-G). El día 28 postoperatorio el daño renal era extenso, la atrofia tubular epitelial se acentuaba más, así como la inflamación intersticial que mostraba más linfocitos y fibrosis leve, así como engrosamiento de la pared muscular de las arteriolas que reducían sus luces y glomérulos con aumento de celularidad mesangial y fibrosis leve (Figura 1F, G).



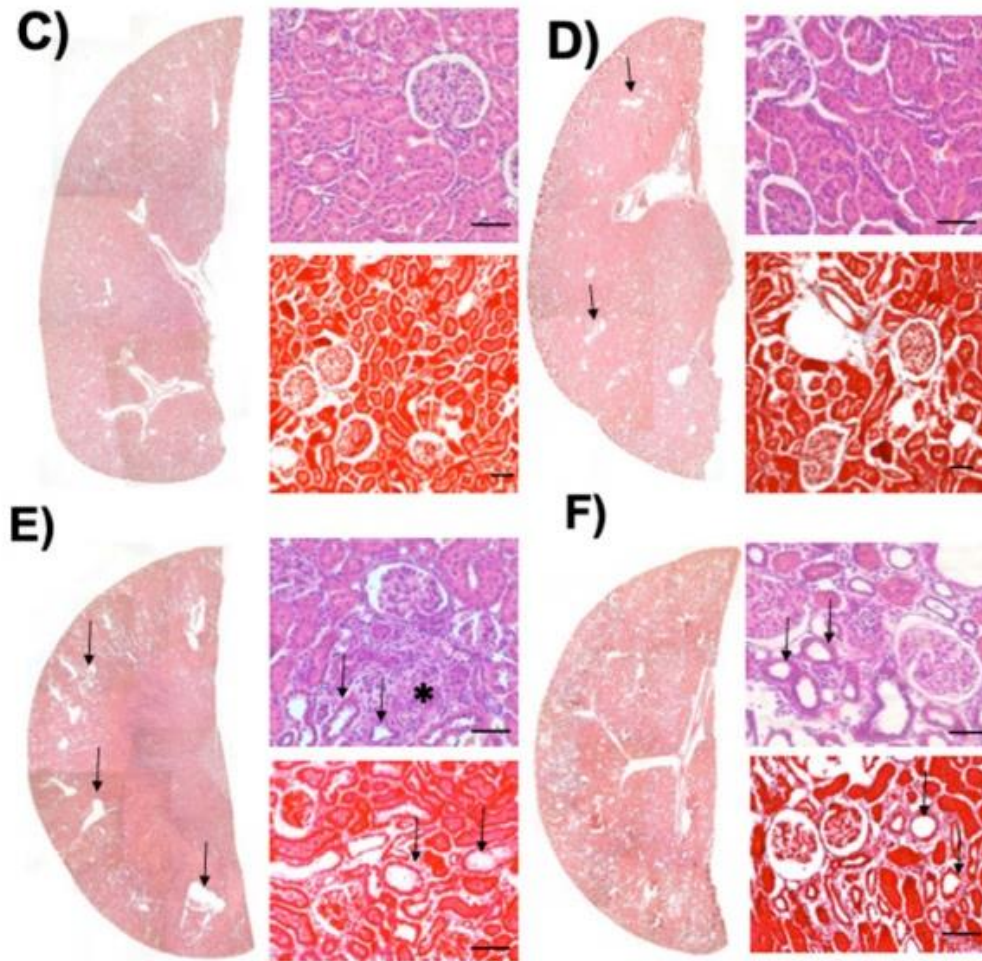


Figura 1. Marcadores de función renal de los grupos experimentales. (A) Creatinina y (B) nitrógeno ureico en sangre (BUN) en plasma. (C–F) Micrografías representativas de riñón de diferentes puntos de tiempo, bajo aumento (panel izquierdo), hematoxilina/eosina (H&E, figura superior derecha) y tinción con tricrómico de Masson (figura inferior derecha). (C) Histología renal normal de animal simulado. (D) El día 7 de la nefrectomía 5/6 (5/6Nx), hay áreas focales de atrofia tubular (flechas negras). (E) Tres semanas después de la nefrectomía, había más y más áreas de atrofia tubular (flechas negras) y un infiltrado inflamatorio intersticial leve (asterisco). (F) Después de cuatro semanas de nefrectomía, áreas extensas del riñón fueron afectadas mostrando atrofia del epitelio tubular (flechas negras), inflamación intersticial con fibrosis leve. (G) La medición automatizada de la morfometría mostró áreas progresivas de lesión renal. Los datos son la media SEM, $n = 4$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ frente a la prueba simulada de Dunnett. Barra de escala = 100.

Para confirmar el desarrollo de CKD, evaluamos la GFR y los parámetros

hemodinámicos en el día 7. La MAP aumenta (Figura 2A), mientras que la GFR (Figura 2B), el RBF, (Figura 2C) y el RPF (Figura 2D) disminuyen en el grupo de 5/6Nx en el día 7 que permanece hasta el día 28. Curiosamente, la FF aumenta ligeramente el día 7 con respecto al grupo Sham (Figura 2E) probablemente como resultado de la vasoconstricción renal también observada en ese momento (Figura 2F). Sin embargo, le sigue la reducción de FF en los días 14 a 28 (Figura 2E). Asimismo, hay un aumento de la RVR (Figura 2F) en los días 7 a 28 en el grupo de 5/6Nx. Juntos, estos datos confirman que la 5/6Nx reduce significativamente la función renal en el riñón remanente, lo que finalmente conducirá al desarrollo de CKD en este modelo [134,135].

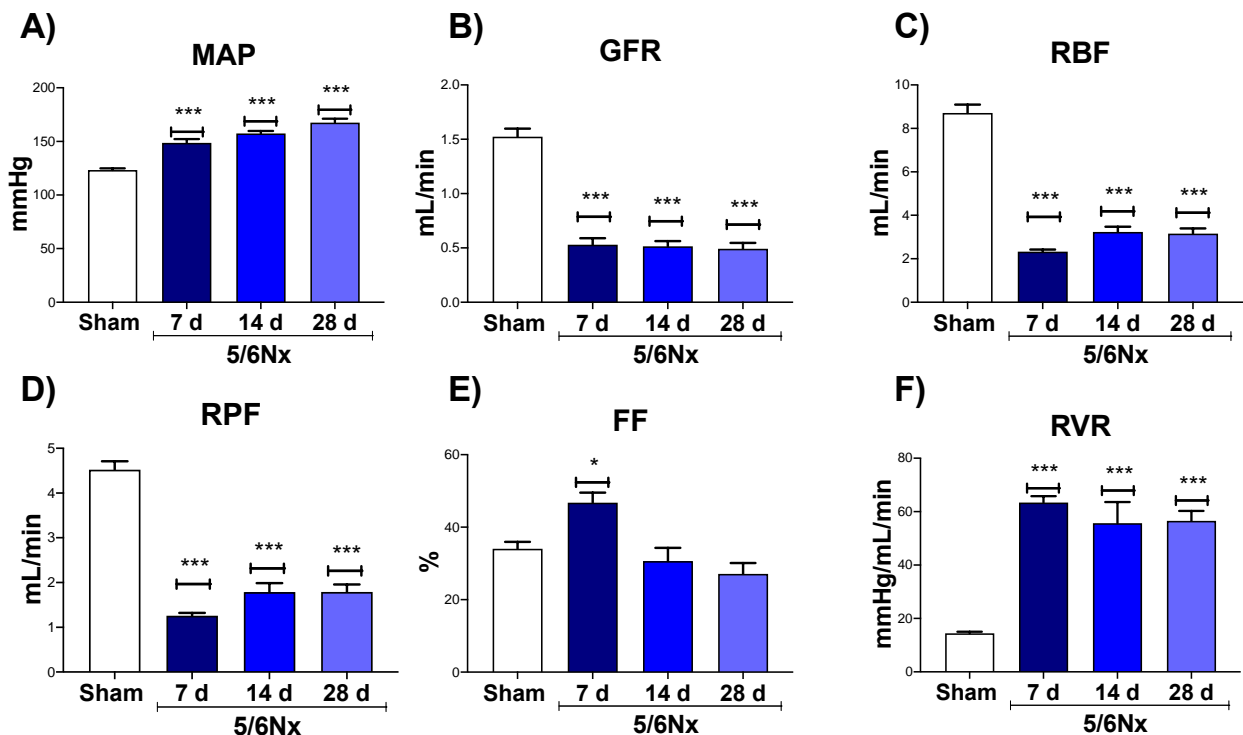
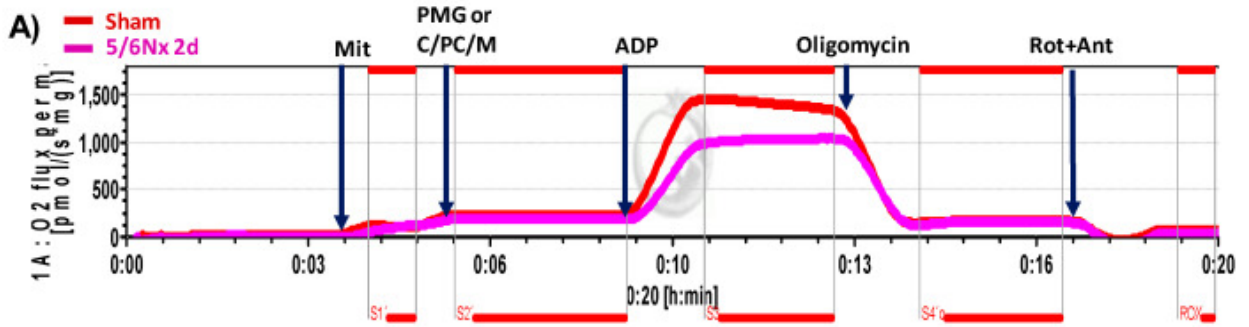


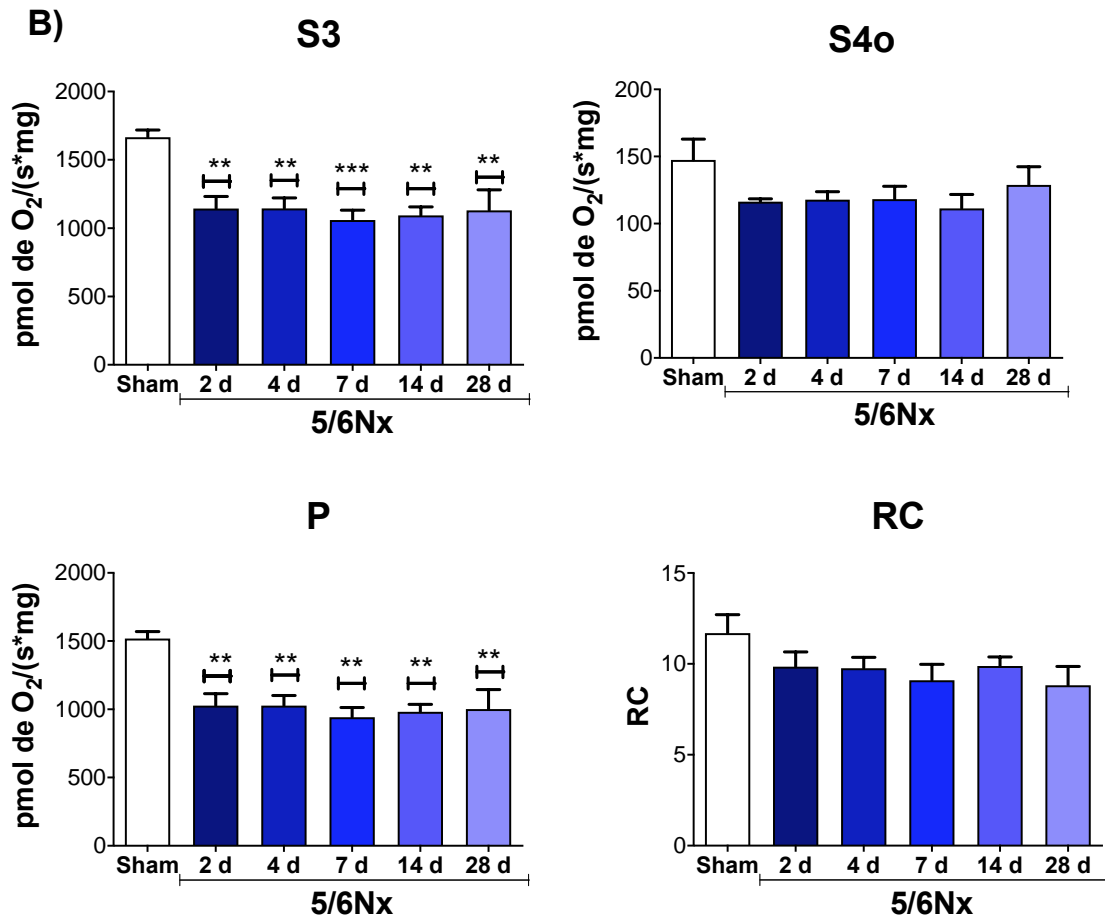
Figura 2. Daño renal crónico inducido por nefrectomía 5/6 (5/6Nx). Evaluación temporal de los parámetros hemodinámicos: (A) presión arterial media (MAP), (B) tasa de filtración glomerular (GFR), (C) flujo sanguíneo renal (RBF), (D) flujo plasmático renal (RPF), (E) filtración fracción (FF), (F) resistencia vascular renal (RVR). Los datos son la media SEM, n = 4–8. * p < 0,05, *** p < 0,001 frente a Sham, prueba de Dunnett. d = días después de la cirugía de nefrectomía, Sham = grupo de control de operación simulada.

7.2 5/6Nx induce una disminución permanente de la capacidad de fosforilación oxidativa (OXPHOS) en la respiración ligada a CI y un desacoplamiento progresivo en la β -oxidación mitocondrial

Anteriormente demostramos, mediante respirometría de baja resolución, que después de 24 h de cirugía 5/6Nx, el riñón remanente presenta una reducción en el estado 3 (S3) de respiración y adenosina difosfato (ADP)/oxígeno (ADP/O), que conduce a una reducción del control respiratorio (RC) en la respiración ligada al complejo I (CI) [133]. Sin embargo, la respirometría de baja resolución no pudo detectar cambios en el grupo nefrectomizado en momentos posteriores [135], a pesar del hecho de que numerosos estudios muestran que después de 4, 8, 12 y 13 semanas, las ratas 5/6Nx tienen menor contenido de ATP y menor $\Delta\Psi_m$ en comparación con ratas Sham, así como pérdida de definición de crestas e hinchazón mitocondrial [136-139], lo que sugiere que las alteraciones respiratorias mitocondriales todavía están presentes durante la progresión de la enfermedad. Por lo tanto, utilizamos un protocolo de respirometría de alta resolución para evaluar los parámetros respiratorios en la respiración ligada a CI en mitocondrias aisladas del riñón remanente (Figura 3A). El grupo 5/6Nx mostró una reducción permanente en S3 y en los valores de capacidad asociada de OXPHOS (P) en todos los puntos de tiempo evaluados (Figura 3B), lo que implica una reducción en la producción de ATP mitocondrial por sustratos ligados a CI con respecto a Sham. No se observaron cambios en la respiración S4o y en los valores de RC en sustratos unidos a CI (Figura 3B). La falta de cambio en S4o en la respiración ligada a CI implica que la fuga de respiración, procesos mitocondriales que consumen $\Delta\Psi_m$ sin contribuir a la producción de ATP [140], no se ven afectados significativamente en el intervalo de tiempo evaluado, lo que explica el mantenimiento del acoplamiento mitocondrial en la respiración ligada a CI (Figura 3B).



Sustratos ligados a CI



Sustratos ligados a la β -oxidación

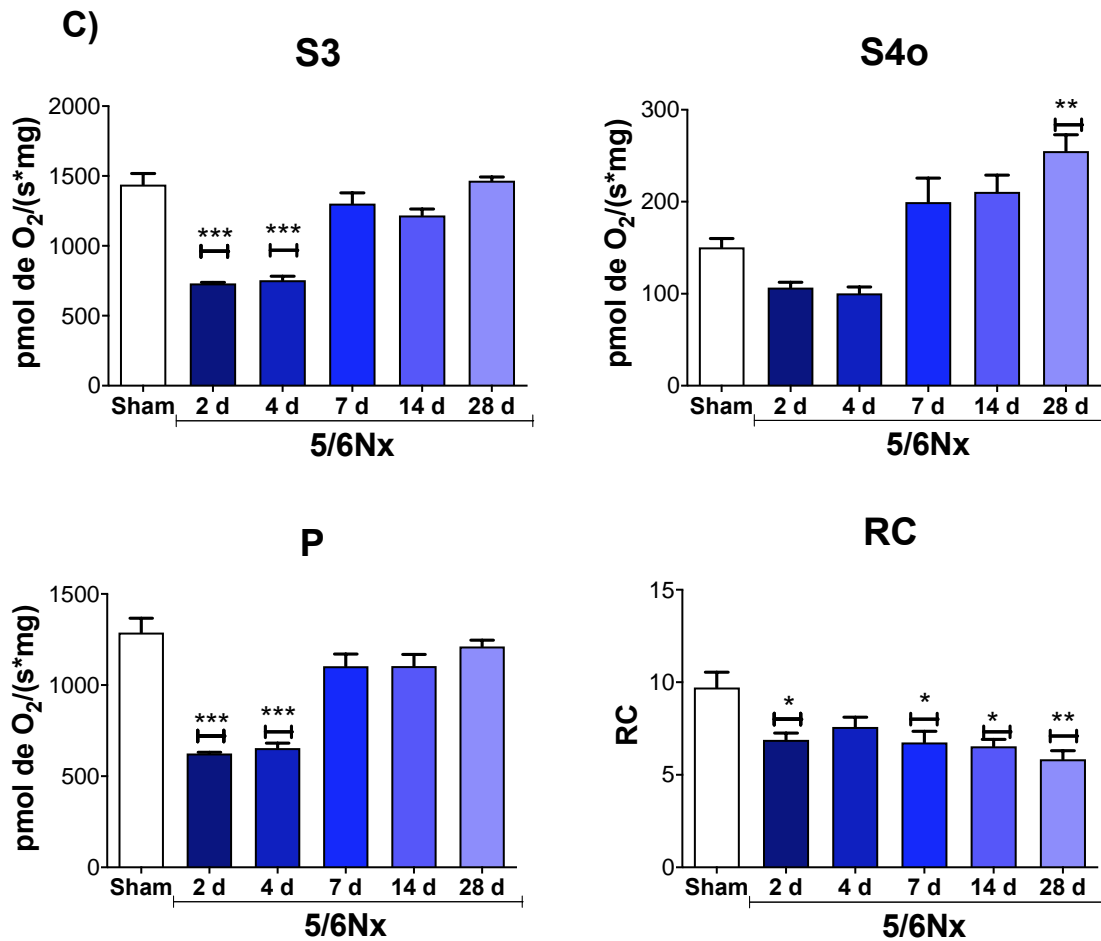


Figura 3. Parámetros respiratorios mitocondriales en la masa renal remanente. (A) Representaciones esquemáticas del protocolo utilizado para determinar los parámetros respiratorios. La línea roja corresponde a la tasa de consumo de oxígeno (O₂) del grupo Sham; mientras tanto, la línea púrpura corresponde a la tasa de consumo de O₂ del grupo de nefrectomía el día 2. Luego, se usaron piruvato 5 mM, malato 2 mM y glutamato 10 mM como sustratos ligados a CI y se utilizaron L-carnitina 2 mM más palmitoil-L-carnitina 2 M más malato 2 mM (C/PC/M) como sustratos ligados a β -oxidación. Las flechas azules representan las adiciones. ADP= difosfato de adenosina, CI= complejo I, L= fuga de la respiración, Mit= mitocondrias, Rot= rotenona, Ant= antimicina A, ROX= respiración residual no mitocondrial. (B) Parámetro respiratorio de la respiración ligada a CI: estado 3 (S3), estado 4 inducido por oligomicina (S4o), respiración asociada a fosforilación oxidativa (OXPHOS) (P) y control respiratorio (RC). Los datos son la media SEM, n = 4-6. ** p <0,01 frente a Sham, prueba de Dunnett. (C) Parámetro respiratorio de la respiración ligada a la β -oxidación: S3, S4o, P y RC. Los datos son la media SEM, n= 4-6. * p <0,05, ** p <0,01 y *** p <0,001 frente a Sham, prueba de Dunnett. d= días después de la

cirugía de nefrectomía, Sham= grupo de control de operación simulada, 5/6Nx = 5/6 nefrectomía.

Por otro lado, la producción de ATP mitocondrial en segmentos de alta demanda de energía como PT es sostenida principalmente por la oxidación de ácidos grasos, como el palmitato que representa ~25% del total de ácidos grasos en plasma [141]. Asimismo, el análisis proteómico y Western blot del riñón remanente en ratas 5/6Nx muestra una reducción en las proteínas relacionadas con la oxidación de ácidos grasos el día 28 [142] y recientemente informamos en un modelo de daño renal inducido por ácido fólico (FA), que el deterioro en la capacidad de OXPHOS y la disminución de la oxidación favorecen la transición de AKI a CKD [143]. Por lo tanto, para evaluar si el deterioro mitocondrial observado está relacionado con la disfunción de oxidación, evaluamos temporalmente los parámetros respiratorios alimentándolos con palmitato y utilizando respirometría de alta resolución. Los valores de S3 y P en la respiración ligada a la β -oxidación se reducen fuertemente los días 2 y 4 después de la cirugía y se restablece al día 7 (Figura 3C). Sin embargo, S4o también aumenta progresivamente, lo que induce la reducción de RC en todos los puntos de tiempo evaluados (Figura 3C). En conjunto, estos resultados muestran una reducción en la producción de ATP mitocondrial relacionada con la oxidación en los puntos de tiempo tempranos (días 2 y 4) en el grupo 5/6Nx y una recuperación el día 7 que ocurre a expensas de un aumento en el desacoplamiento mitocondrial, ya que las fugas respiratorias aumentan progresivamente. Finalmente, para evaluar si existe una correlación entre los cambios en los parámetros bioenergéticos en la respiración ligada al CI y las alteraciones hemodinámicas, calculamos las correlaciones de Pearson. Curiosamente, la disminución de S3 muestra una correlación positiva con el RBF y el RPF, así como una correlación negativa con el RVR, indicando que la reducción del RBF y del RPF van de la mano con la reducción en la función bioenergética mitocondrial (Figura 4A). Asimismo, P, cuyo valor indica indirectamente la síntesis de ATP mitocondrial, muestra un comportamiento muy similar al de S3, con correlación positiva con RBF y RPF y correlación negativa con RVR (Figura 4B).

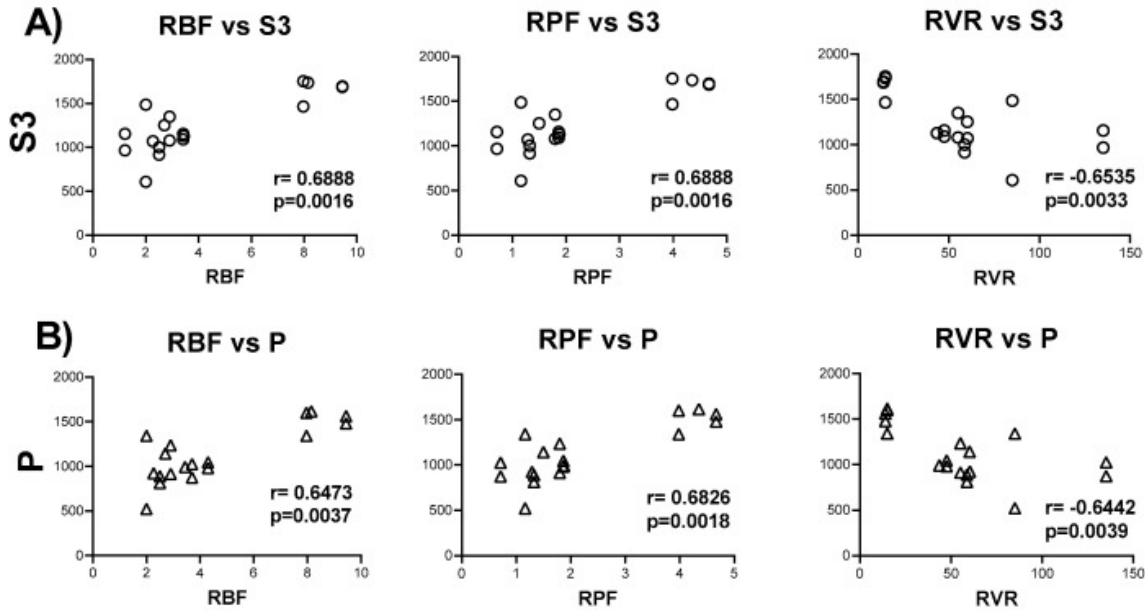


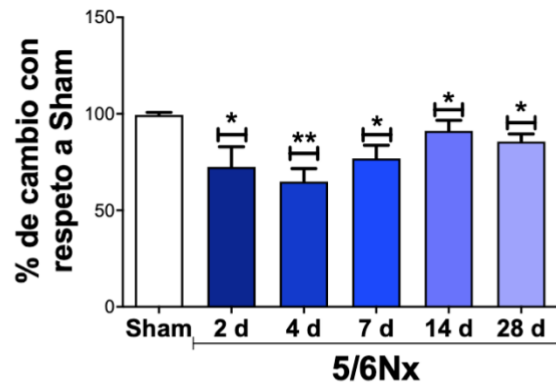
Figura 4. Correlaciones de Pearson entre cambios en parámetros energéticos y parámetros hemodinámicos. Correlación de Pearson entre la alteración en el grupo nefrectomizado en los parámetros respiratorios en la respiración compleja I (A) estado 3 (S3) y (B) fosforilación oxidativa (OXPHOS) - respiración asociada (P), y los cambios en los parámetros hemodinámicos en días 7, 14 y 28 después de la cirugía. RBF = flujo sanguíneo renal; RPF = flujo plasmático renal; RVR = resistencia vascular renal.

7.3 La disminución de la capacidad de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) inducida por 5/6Nx está relacionada con la despolarización mitocondrial por la disminución de la actividad de CI y CIII

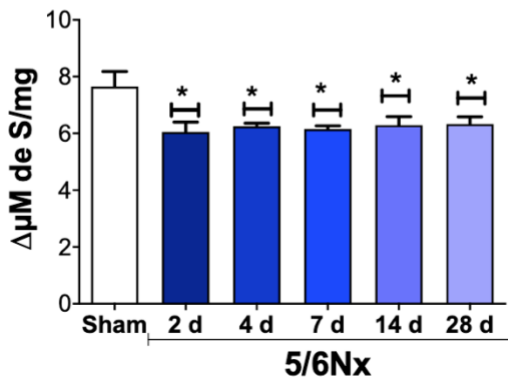
Para determinar si la reducción observada en la capacidad de OXPHOS (Figura 3B, C) está relacionada con cambios en la actividad de los componentes de OXPHOS, se evaluó la actividad de ATP sintasa. El grupo 5/6Nx muestra una reducción permanente en la actividad de la ATP sintasa (Figura 5A), junto con una reducción en $\Delta\Psi_m$ en S3 en todos los puntos de tiempo evaluados (Figura 5B), lo que concuerda con la reducción en los valores de P (Figura 3B). Además, el grupo 5/6Nx muestra una reducción permanente desde el día 2 en la actividad de CI (Figura 5C) y una disminución en la actividad del complejo III (CIII) los días 7, 14 y 28 después de la cirugía (Figura 5F). Sin embargo, no se encontraron cambios en los tiempos evaluados en las actividades del complejo II (CII, Figura 5D) y del complejo IV (CIV, Figura 5F) con respecto al grupo Sham. Esta falta de cambio en CII y CIV también se informó en el modelo de transición de AKI a CKD inducida por FA [143], y se ha relacionado con una mayor abundancia de residuos de cisteína en CI y CIII, lo que hace que estos complejos sean más susceptibles a estrés oxidativo [143,144-146].

Además, nuestros resultados son congruentes con los informes de Lash *et al.* [147], quienes observaron un ligero aumento en S3 en la respiración ligada a CII el día 10 de la nefrectomía. Juntos, estos resultados implican que, en el riñón remanente, la reducción en la producción de ATP mitocondrial se desencadena por la despolarización de $\Delta\Psi_m$, inducida por el deterioro de la actividad de CI y CIII.

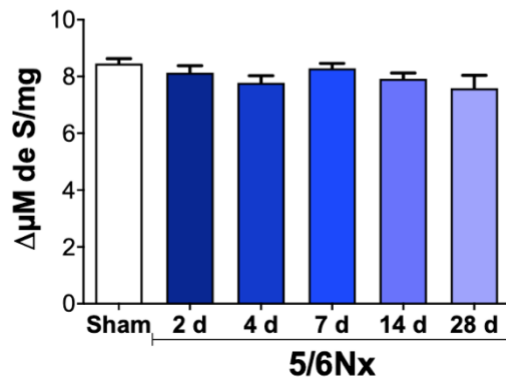
A) Actividad de ATP sintasa



B) $\Delta\Psi_m$ S3



$\Delta\Psi_m$ S4o



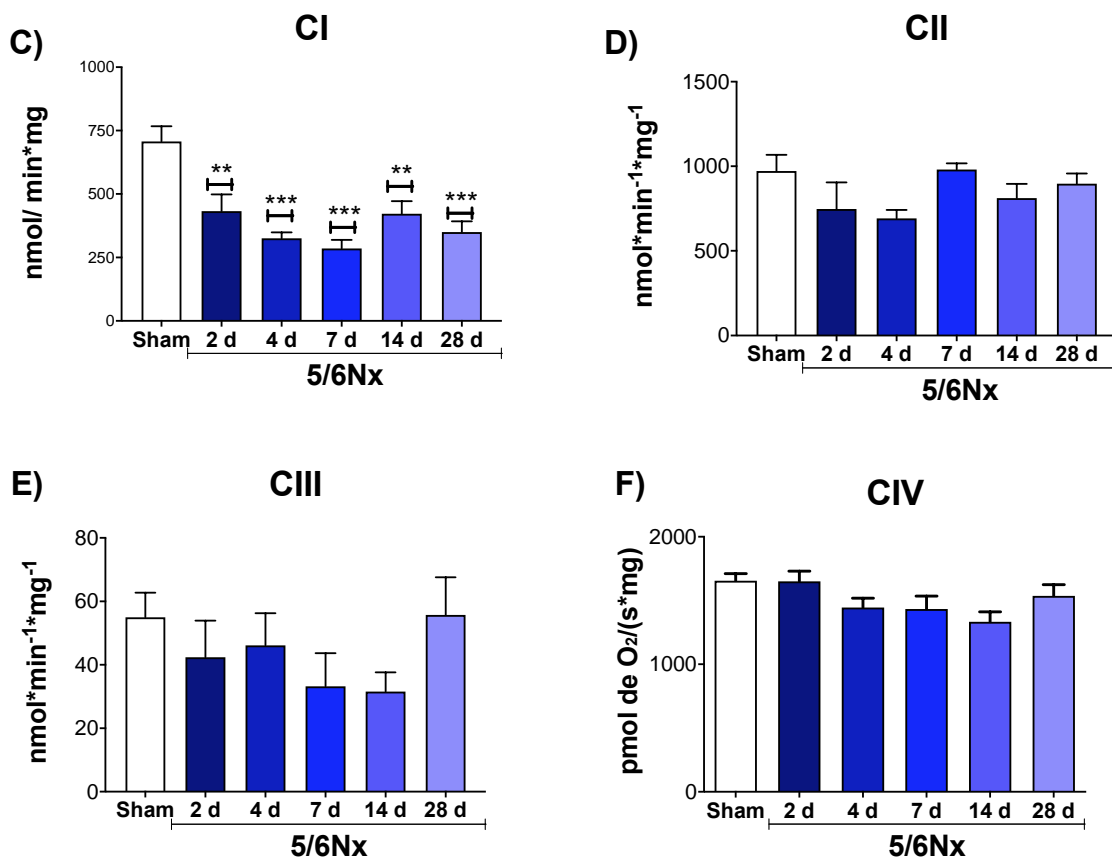


Figura 5. Cambios en los elementos del sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) y el potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$). (A) Actividad de adenosín trifosfato (ATP) sintasa. (B) Cambio en $\Delta\Psi_m$ en el estado 3 (S3) y $\Delta\Psi_m$ en el estado 4 inducido por oligomicina (S4o). (C) Complejo I (CI); (D) complejo II (CII); (E) complejo III (CIII); y (F) complejo IV (CIV). Los datos son la media SEM, n= 4–7. * p <0,05, ** p <0,01 y *** p <0,001 frente a Sham, prueba de Dunnett. d= días después de la cirugía de nefrectomía, Sham= grupo de control de operación simulada; 5/6Nx= 5/6 nefrectomía.

7.4 El desacoplamiento mitocondrial inducido por 5/6Nx está relacionado con un estado pro-oxidativo en las mitocondrias

Demostramos previamente que a las 24 h después de la nefrectomía, la alteración en la respiración ligada a CI desencadena el aumento de la producción de H_2O_2 mitocondrial y el estrés oxidativo [133]. Además, la disminución de $\Delta\Psi_m$ y el desacoplamiento a menudo desencadenan la sobreproducción de ROS mitocondriales [148,149]. Por lo tanto, evaluamos si las alteraciones bioenergéticas están relacionadas con una mayor producción de ROS por parte de las mitocondrias. 5/6Nx induce un aumento permanente en la producción de H_2O_2 mitocondrial en S3 y S4o en todos los puntos de tiempo evaluados (Figura 6A). Asimismo, la evaluación de enzimas antioxidantes en mitocondrias muestra una

reducción en la actividad de la superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD) los días 4 y 7 (Figura 6B) y en la actividad de la GPx los días 2, 4 y 28 con respecto al grupo Sham (Figura 6C). No se encontraron cambios significativos en la actividad de la GR en todos los puntos de tiempo evaluados (Figura 6D), lo que podría indicar una susceptibilidad diferencial de las enzimas antioxidantes mitocondriales al estrés oxidativo. Curiosamente, esto también se ha observado en el modelo de daño renal inducido por FA [146,29]. Sin embargo, aún son necesarios estudios más profundos. Juntos, estos datos muestran un aumento persistente del estrés oxidativo mitocondrial en el riñón remanente.

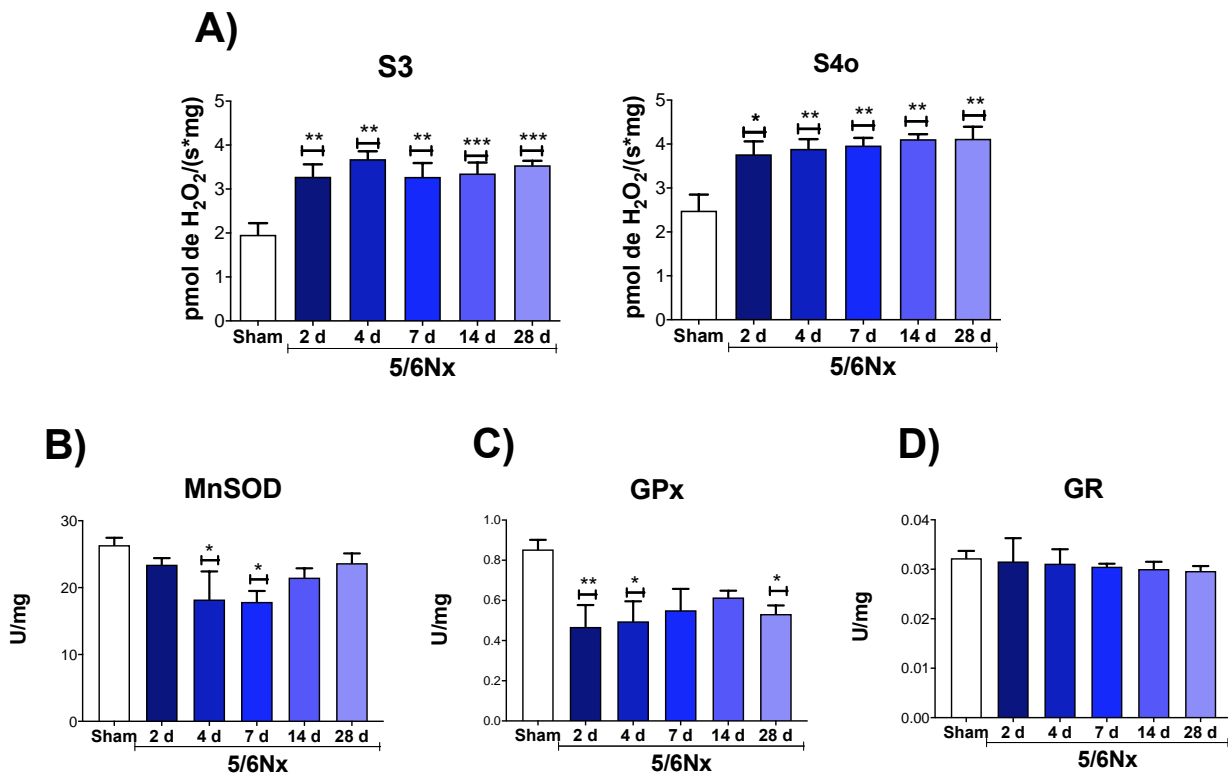


Figura 6. Estrés oxidativo en mitocondrias de la masa renal remanente. (A) Tasas de producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en mitocondrias aisladas en estado 3 (S3) y estado 4 inducidas por oligomicina (S4o). (B) Actividad de las enzimas antioxidantes Mn superóxido dismutasa (MnSOD), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR) en mitocondrias aisladas. Los datos son la media SEM, n= 5-6. * p <0.05, ** p <0.01 y *** p <0.001 vs. Sham. d= días después de la cirugía de nefrectomía, Sham= grupo de control de operación simulada; 5/6Nx= 5/6 nefrectomía

7.5 Alteraciones temporales inducidas por 5/6Nx en la ultraestructura mitocondrial

La morfología ultraestructural de las mitocondrias se evalúa en las células epiteliales de los túbulos contorneados proximales en los diferentes puntos de tiempo

seleccionados. En comparación con los animales control que muestran numerosas y largas mitocondrias bien conformadas ubicadas en el área citoplasmática basal (Figura 7A), las células epiteliales tubulares en el día 2 de la nefrectomía muestran numerosas mitocondrias pequeñas de forma redonda con borramiento de las crestas, alternando con mitocondrias hinchadas de forma irregular más grandes con ruptura o borramiento de las crestas (Figura 7B). Existen numerosos lisosomas y algunos de ellos están adheridos a las mitocondrias, lo cual es sugerente de mitofagia. En los días 4 (Figura 7C) y 7 (Figura 7D) de la nefrectomía, estos cambios ultraestructurales son más acentuados, particularmente con la presencia de numerosas mitocondrias pequeñas con borramiento de crestas, lisosomas y autofagosomas, así como muchos ribosomas libres alrededor de las mitocondrias. El día 14 de la nefrectomía, hay muchas mitocondrias pequeñas con borramiento de las crestas, pero también son comunes las mitocondrias fusionadas (Figura 7E); mientras que en el día 28 de la nefrectomía, las mitocondrias fusionadas son más comunes, así como grandes lisosomas y cúmulos de ribosomas libres (Figura 7F). Por lo tanto, parece que en los días 7 y 14 de la nefrectomía, hay un daño mitocondrial sustancial con actividad de fisión activa y mitofagia, mientras que, al mes de la nefrectomía, hay más fusión mitocondrial, pero todavía hay muchas mitocondrias pequeñas y redondas con borramiento de las crestas y algunas mitocondrias de forma normal con síntesis de proteínas aparentemente activa, apoyadas por la existencia de numerosos ribosomas libres.

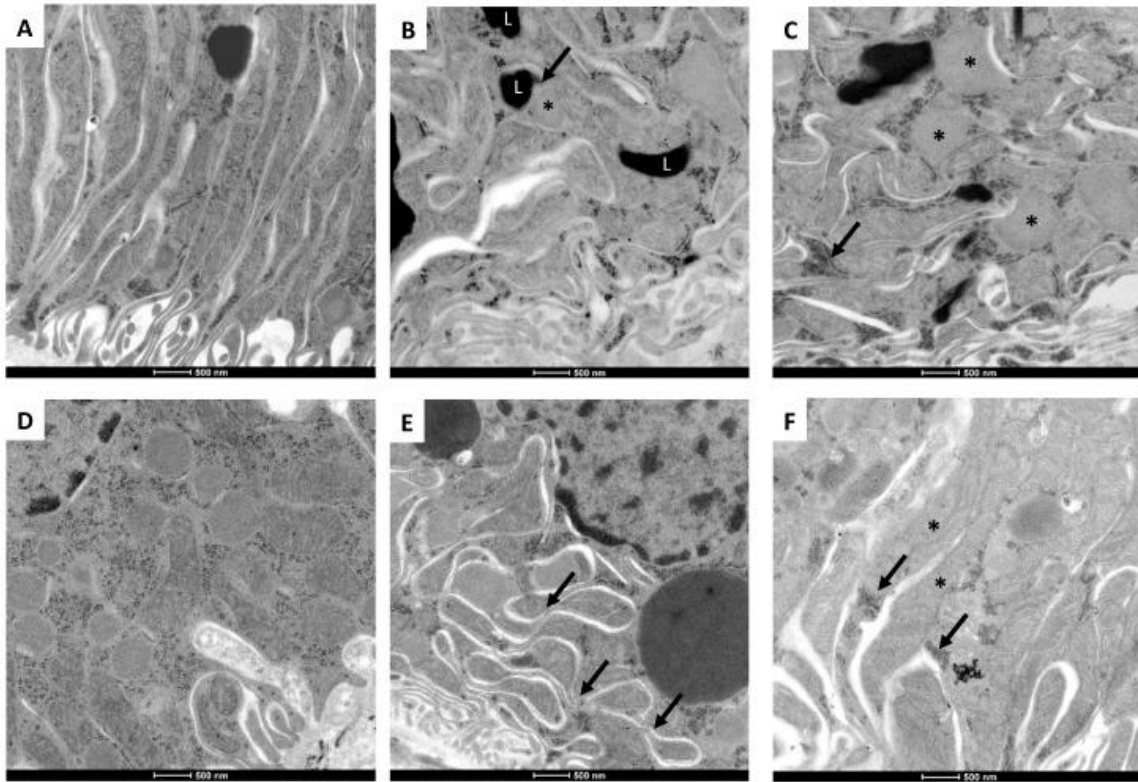


Figura 7. Micrografías representativas de microscopía electrónica de mitocondrias de células epiteliales tubulares en diferentes momentos. (A) Control Los riñones de animales simulados muestran una estructura mitocondrial normal. (B) En el día 2 de la nefrectomía, las mitocondrias muestran borramiento de las crestas y hay numerosos lisosomas (L), una pequeña mitocondria redonda (asterisco) está en contacto con un lisosoma (mitofagia, flecha). (C) El día 4 de la nefrectomía se observan mitocondrias pequeñas más redondas (asteriscos), lisosomas y numerosos ribosomas libres (flecha). (D) Se observa un patrón ultraestructural similar en el día 7 de la nefrectomía, algunas mitocondrias bien conservadas están rodeadas por numerosas mitocondrias pequeñas y redondas con borramiento de las crestas. (E) En el día 14 de la nefrectomía, además de las pequeñas mitocondrias con borramiento de las crestas, también son frecuentes muchas mitocondrias fusionadas (flechas) y lisosomas grandes. (F) En el día 28 de la nefrectomía, las mitocondrias fusionadas son más comunes (asteriscos), así como las mitocondrias pequeñas y redondas, además acumulación de ribosomas libres (flechas).

Segunda parte

7.6 Daño en el riñón

El modelo 5/6Nx induce el aumento de los marcadores de daño renal clásico desde las etapas iniciales y la alteración permanente de la estructura y función del riñón

remanente [150, 151]. Para confirmar la presencia de daño renal se evaluó el nivel de las proteínas molécula de daño renal 1 (KIM-1) y lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL), dos marcadores de daño renal asociados principalmente a lesión tubular, así como los marcadores fibróticos molécula profibrótica del factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1) y actina alfa del músculo liso (α -SMA). Las proteínas KIM-1 y NGAL mostraron un aumento progresivo del riñón remanente con el tiempo en el grupo de 5/6Nx en comparación con el grupo de control (Figura 8A, B), lo que confirma la progresión del deterioro tubular. Además, TGF- β 1 y α -SMA mostraron un aumento progresivo con el tiempo después del día 2, lo que indica el desarrollo de fibrosis.

La evaluación histológica usando secciones teñidas con H&E mostró una histología normal en animales simulados (Figura 8C-C1). Después de dos días de resección renal, las áreas focales se distribuyeron aleatoriamente de túbulo contorneado proximal caracterizado por epitelio atrófico aplanado (Figura 8C-C2); algunos túbulo revisitados con células necróticas y cilindros hialinos en sus luces, rodeados de un ligero infiltrado inflamatorio y edema, se observaron después de 1 (Figura 8C-C3) y 2 (Figura 1C-C4) semanas de nefrectomía. Estas áreas focales de atrofia tubular aumentaron progresivamente en tamaño y número. Así, el día 28 después de la resección del riñón, había áreas extensas de atrofia tubular epitelial e inflamación crónica con fibrosis aterradora (Figura 8C-C5); arterias y arteriolas de tamaño moderado presentaban engrosamiento de la pared muscular con reducción de sus luces y glomérulos con aumento de la matriz mesangial, así como celularidad y fibrosis leve. La determinación morfométrica del daño tubular confirmó estas características, mostrando daño tubular progresivo (Figura 8C-C6).

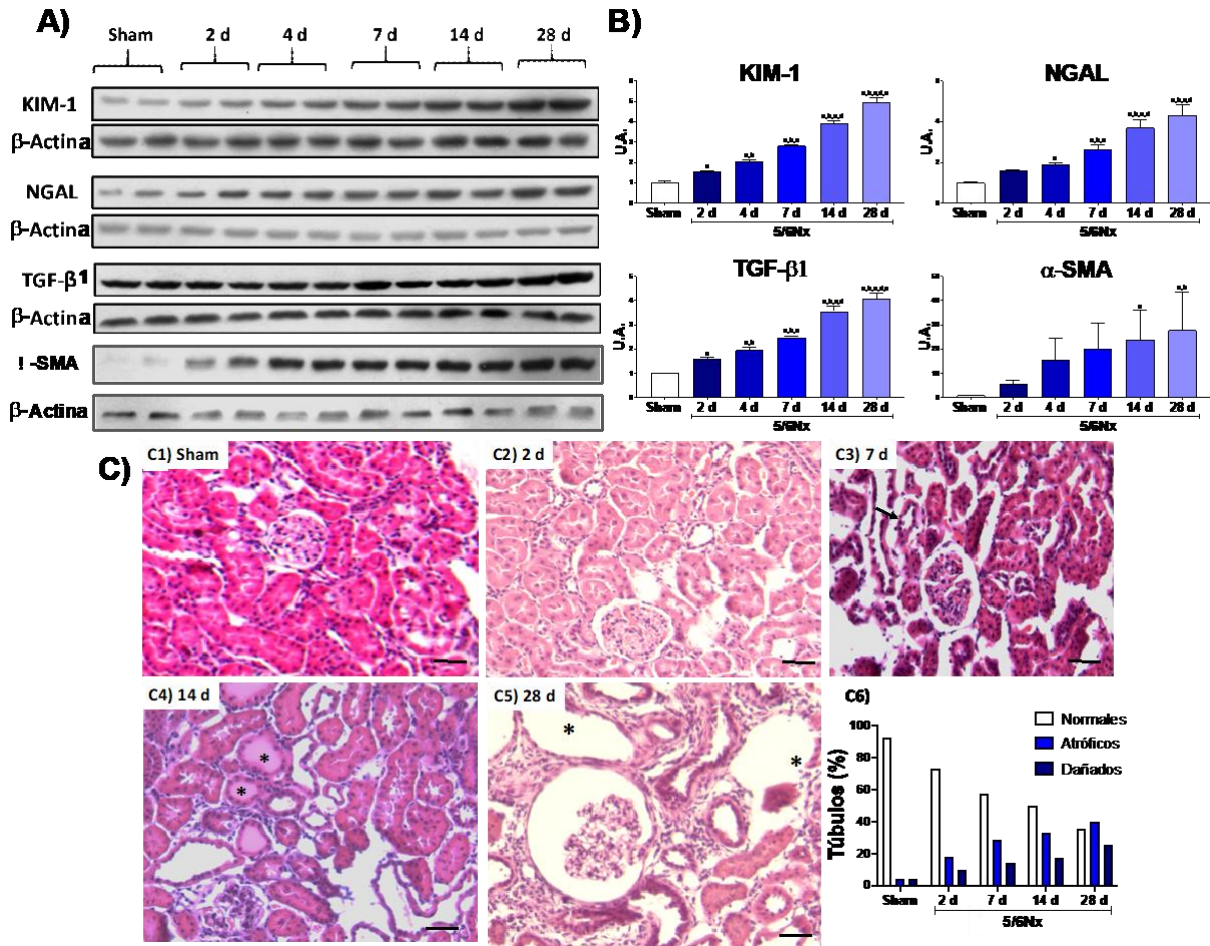


Figura 8. Progresión temporal del daño renal. (A) Western blots representativos de marcadores de daño renal y marcadores fibróticos. (B) Cuantificaciones de los marcadores de daño renal molécula de daño renal 1 (KIM-1) y lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL), así como la molécula profibrótica del factor de crecimiento transformante beta (TGF-β1) y la actina alfa del músculo liso (α-SMA). Se utilizó β-actina como control de carga. Los datos son la media ± SEM, n = 4. Prueba de Tukey. a = p ≤ 0,05 frente a simulado, b = p ≤ 0,05 frente a 2 días, c = p ≤ 0,05 frente a 4 días, d = p ≤ 0,05 frente a 7 días, e = p ≤ 0,05 frente a 14 días, simulado = grupo de operación / control simulado. (C) Micrografías representativas de riñón: (C1) Histología renal normal de animal simulado. (C2) Después de 2 días de nefrectomía 5/6 (5 / 6Nx), había túbulos proximales corticales ocasionales con epitelio plano que corresponde a atrofia tubular (flechas). (C3) Después de 1 semana de nefrectomía, más túbulos mostraron daño extenso del epitelio (flechas). (C4) Después de 2 semanas de resección renal, incluso más túbulos muestran daño epitelial con cilindros hialinos en su luz (asteriscos). (C5) Después de 5 / 6Nx, había numerosos túbulos atróficos y dilatados (asteriscos), así como un glomérulo con hiper celularidad mesangial rodeado de infiltrado inflamatorio leve y fibrosis. (C6) La

determinación morfométrica del daño tubular confirmó el daño tubular progresivo en comparación con el grupo simulado / control (S). (Tinción H/E, todas las micrografías 200 aumentos, barra de aumento de escala = 50 μm).

7.7 5/6Nx induce la disminución progresiva de la biogénesis mitocondrial relacionada con el daño tubular y la fibrosis

Para determinar si la reducción en la producción de ATP mitocondrial a lo largo de la transición de la CKD [150,152] estaba relacionada con cambios en el contenido mitocondrial, determinamos el VDAC como marcador de masa mitocondrial en el riñón remanente en las diversas etapas de progresión. Como se muestra en la Figura 9A, VDAC disminuyó progresivamente con el tiempo en el grupo 5/6Nx, lo que sugiere una reducción de la masa mitocondrial en el riñón remanente. Además, la evaluación temporal del regulador primario de la biogénesis mitocondrial, el coactivador gamma del receptor activado por proliferador de peroxisoma 1-alfa (PGC-1 α), también mostró una disminución progresiva en el tiempo (Figura 9B), lo que desencadenó una reducción en sus factores descendentes factor respiratorio nuclear 1 (NRF1) y factor respiratorio nuclear 2 (NRF2), así como en el factor de transcripción mitocondrial A (TFAM), el principal factor de transcripción del ácido desoxirribonucleico mitocondrial (mtDNA). Estos resultados sugirieron fuertemente que el deterioro de la biogénesis mitocondrial desencadena una reducción progresiva de la masa mitocondrial en 5/6Nx. Además, los niveles de la carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1) (Figura 9A) y el receptor alfa activado por proliferador de peroxisoma (PPAR α) (Figura 9B), los principales reguladores del metabolismo de los ácidos grasos, también disminuyeron progresivamente con el tiempo, lo que implica un deterioro progresivo de la β -oxidación mitocondrial por la reducción de la biogénesis mitocondrial.

Para evaluar si la reducción progresiva de los marcadores de biogénesis mitocondrial estaba relacionada con el daño tubular (las secciones de nefrona con mayor densidad mitocondrial), realizamos un análisis de correlación estadística de KIM-1, NGAL, TGF- β 1 y α -SMA con PGC- Niveles de 1 α , NRF1 o TFAM. Curiosamente, la reducción en los niveles de PGC-1 α y NRF1 mostró una fuerte correlación con el aumento de los marcadores de daño tubular (Figura 9C). Además, el aumento de los marcadores fibróticos TGF- β 1 y α -SMA también se correlacionó negativamente con los niveles de marcadores de biogénesis mitocondrial (Figura 9C). Estos resultados sugirieron que la reducción del contenido mitocondrial por alteración de la biogénesis mitocondrial promueve el daño tubular y los procesos fibróticos en este modelo.

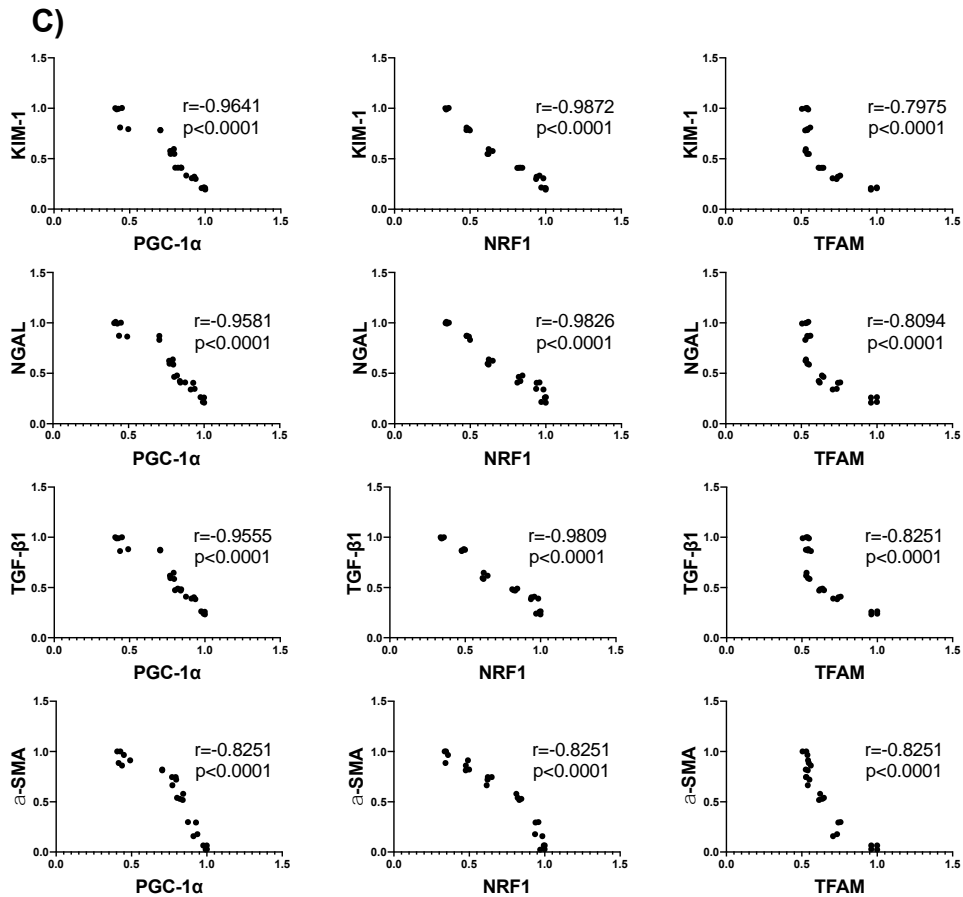
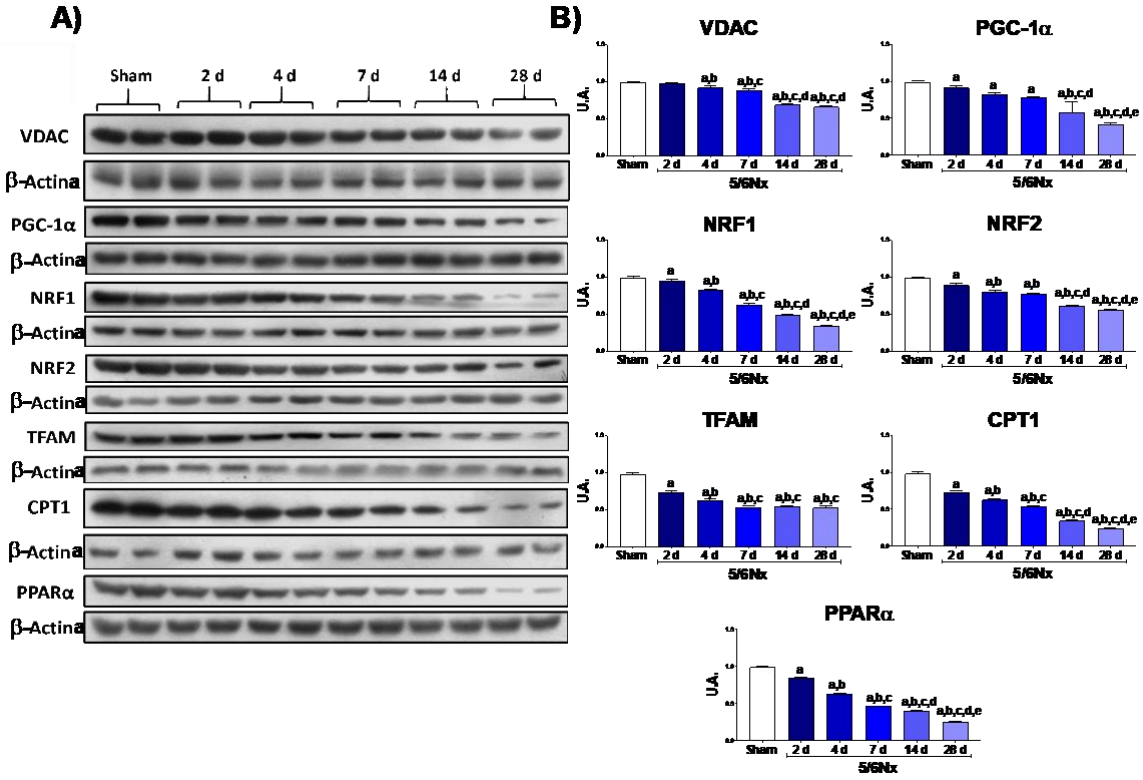


Figura 9. Disminución progresiva de la biogénesis mitocondrial en masa renal remanente. (A) Western blots y (B) cuantificación de proteínas mitocondriales: canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), coactivador gamma del receptor activado por proliferador de peroxisoma 1-alfa (PGC-1 α), factor respiratorio nuclear 1 (NRF1) y 2 (NRF2), factor de transcripción mitocondrial A (TFAM), carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1) y receptor alfa activado por proliferador de peroxisoma (PPAR α). Se utilizó β -actina como control de carga. (C) Análisis de correlación de la molécula de daño renal 1 (KIM-1), la lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL), la molécula profibrótica del factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1) y la alfa actina del músculo liso (α -SMA) con PGC-1 α , NRF1 o TFAM. Los datos son la media \pm SEM, n = 4. Prueba de Tukey. a = p \leq 0,05 frente a simulado, b = p \leq 0,05 frente a 2 días, c = p \leq 0,05 frente a 4 días, d = p \leq 0,05 frente a 7 días, e = p \leq 0,05 frente a 14 días, 5 / 6Nx = 5/6 nefrectomía, d = días después de 5 / 6Nx, simulacro = operación simulada / grupo de control.

7.8 5/6Nx induce el aumento de la fisión mitocondrial y la reducción de la fusión mitocondrial

La mitocondria es un orgánulo dinámico cuya distribución, control de calidad y masa dependen del equilibrio entre los procesos de fusión (fusión) y fisión (fragmentación) [153]. De hecho, en muchos modelos de daño renal, el deterioro de la producción de ATP mitocondrial se ha relacionado con un desequilibrio en la dinámica mitocondrial [155, 153, 156-158]. Anteriormente demostramos que, 24 h después de 5/6Nx, hay un aumento en la localización de las proteínas de fusión MFN1 y OPA1 en las mitocondrias [152], junto con un aumento de la masa mitocondrial en la sección tubular proximal [152, 159], lo que sugiere un cambio a la fusión mitocondrial en los primeros momentos después de 5/6Nx. Sin embargo, los cambios en la dinámica mitocondrial a lo largo de la transición de la CKD seguían siendo poco conocidos. Por lo tanto, evaluamos los cambios en las proteínas de la dinámica mitocondrial a lo largo del tiempo. Curiosamente, DRP1 mostró un aumento solo a los 28 días después de la cirugía, sin cambios significativos en los niveles de FIS1 (Figura 10A, B). Por otro lado, las proteínas de fusión MFN2 y OPA1 disminuyeron en el grupo 5/6Nx, desde el día 2 hasta el final del seguimiento (Figura 10A, B). El análisis ultraestructural mostró mitocondrias normales del grupo simulado (Figura 11A); por el contrario, hubo un aumento progresivo en las mitocondrias pequeñas y redondas, lo que sugiere un cambio a la fisión mitocondrial (Figura 11B), después del día 7 de 5/6Nx. Por lo tanto, estos resultados implican que el cambio de la dinámica mitocondrial a la fisión es un proceso posterior durante la progresión de la CKD.

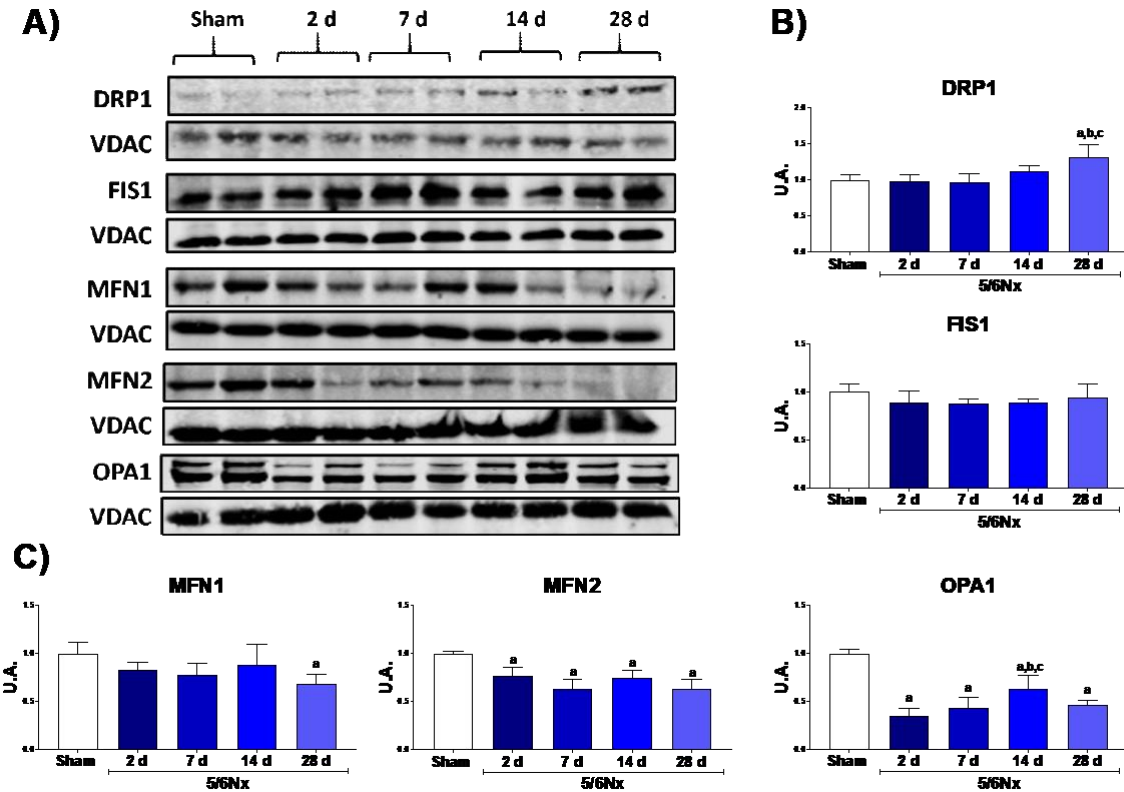


Figura 10. Alteración de la dinámica mitocondrial en masa renal remanente. (A) Western blots representativos de las proteínas de fisión y fusión. (B) Cuantificación de las proteínas de fisión: proteína similar a dinamina-1 (DRP1) y proteína de fisión mitocondrial 1 (FIS1). (C) Cuantificación de las proteínas de fusión: mitofusina 1 (MFN1) y 2 (MFN2) y atrofia óptica 1 (OPA1). El canal aniónico dependiente del voltaje (VDAC) se utilizó como control de carga. Los datos son la media \pm SEM, $n = 4$. Prueba de Tukey. $a = p \leq 0,05$ frente a simulación, $b = p \leq 0,05$ frente a 2 días, $c = p \leq 0,05$ frente a 4 días, $5 / 6N_x = 5/6$ nefrectomía, $d =$ días después de $5 / 6N_x$, simulación = operación simulada / grupo de control.

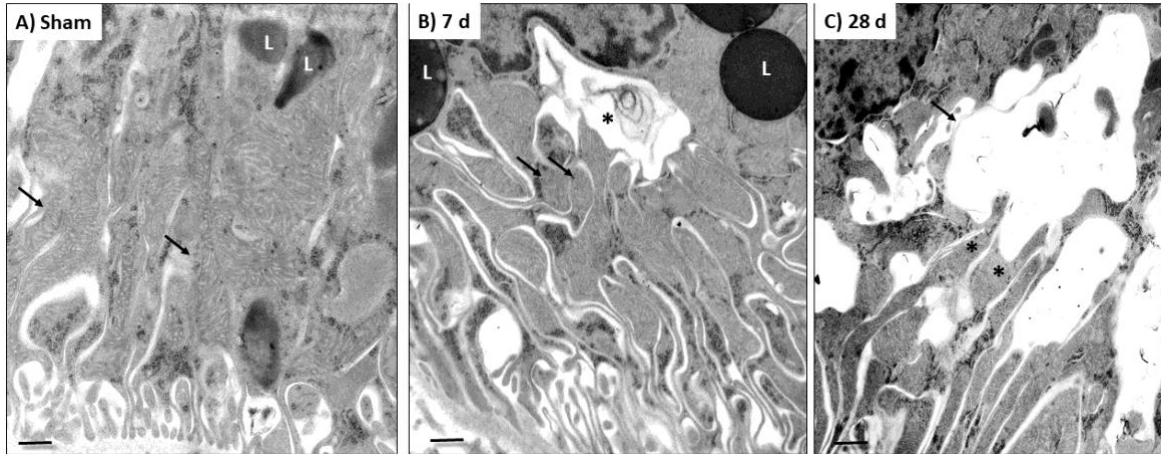


Figura 11. Micrografías ultraestructurales representativas de células epiteliales de túbulo contorneado proximal. (A) Aspecto normal de las áreas citoplasmáticas basales y leves de una célula tubular epitelial de un animal simulado, que muestra mitocondrias largas (flechas) y lisosomas densos en electrones redondos (L). (B) Después de 7 días (d) de 5/6Nx, había mitocondrias pequeñas y redondas (flechas) y grandes vacuolas citoplasmáticas limitadas por una doble membrana correspondiente a autofagosomas (asterisco), que estaban cerca de mitocondrias y lisosomas grandes (L). (C) Después de 28 días de resección renal, estas vacuolas citoplasmáticas de doble membrana (flecha) eran más grandes y estaban conectadas directamente a las mitocondrias (asteriscos). Barra de aumento de escala = 500 nm.

7.9 5/6Nx induce alteraciones temporales en la autofagia en el riñón remanente

La reducción de la biogénesis mitocondrial también puede estar relacionada con la eliminación de las mitocondrias dañadas por el proceso de mitofagia. Además, el estudio ultraestructural de la sección renal mostró un aumento progresivo del número de mitocondrias pequeñas y redondas a partir del día 7 (Figura 11B), por lo que algunas de ellas estaban incluidas o en contacto directo con grandes vacuolas de doble membrana que correspondían a autofagosomas (mitofagia), especialmente a los 28 días (Figura 11C). Por tanto, estos resultados implican que la degradación mitocondrial por autofagia se induce en momentos posteriores a la nefrectomía. Así, se procedió a evaluar los cambios a lo largo del tiempo en los niveles de las proteínas de mitofagia PINK y Parkin, dos proteínas de la vía clásica de la mitofagia. Aunque las imágenes de WB sugirieron que ambas proteínas se redujeron en 5/6Nx en comparación con el grupo Sham, esta reducción no fue significativa en ningún punto de tiempo evaluado (Figura 12A). Sin embargo, las proteínas de macroautofagia p62 y las proteínas asociadas a microtúbulos 1A / 1B de cadena ligera 3B I y II (LC3B-I/II) mostraron un aumento temporal en 5/6Nx (Figura 12B), lo que sugiere inducción de autofagia. Congruentemente, la reducción

en la relación LC3B-II/LC3B-I (Figura 12B) también sugiere un aumento en la inducción del flujo de autofagia. Junto con el aumento observado en los cuerpos de autofágicos en momentos posteriores (Figura 11C), estos hallazgos sugieren un deterioro en el flujo de autofagia.

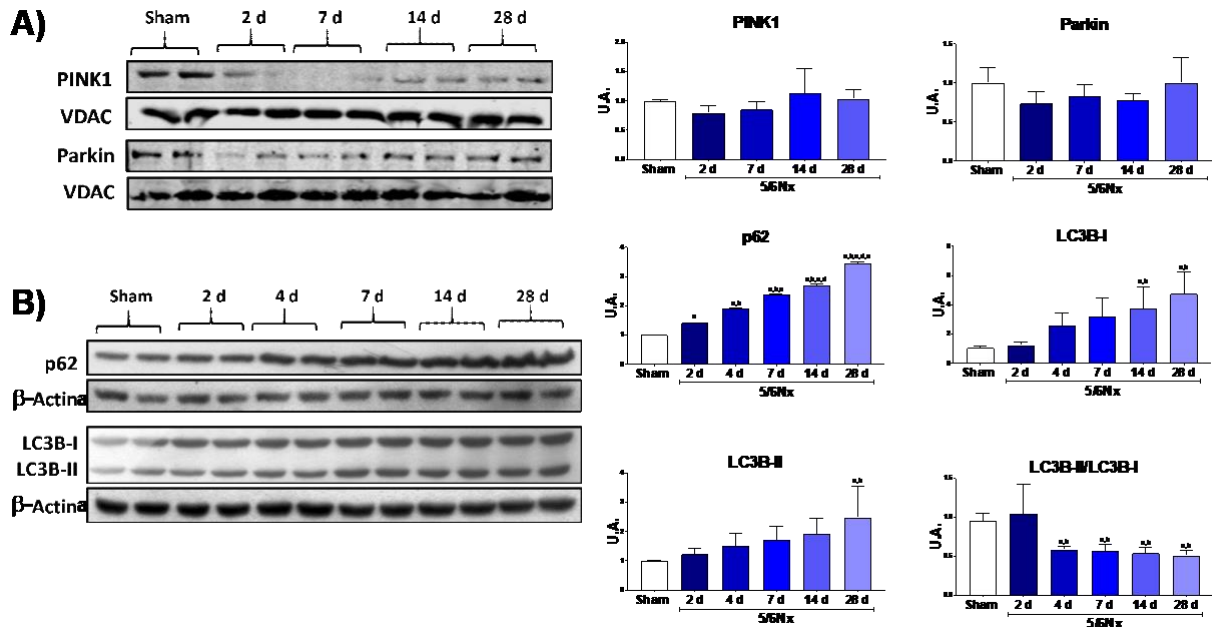


Figura 12. Alteración de marcadores de mitofagia y autofagia en masa remanente. (A) Western blots y sus cuantificaciones de proteínas de mitofagia: quinasa 1 (PINK1) inducida por homólogo de fosfato y tensina (PTEN) y PARKIN en mitocondria aislada. El canal aniónico dependiente del voltaje (VDAC) se utilizó como control de carga. (B) Western blots y sus cuantificaciones de proteínas de autofagia: p62 y proteínas asociadas a microtúbulos 1A / 1B de cadena ligera 3B I y II (LC3B-I / II). Se utilizó β -actina como control de carga. Los datos son la media \pm SEM, n = 4. Prueba de Tukey. a = $p \leq 0,05$ frente a simulado, b = $p \leq 0,05$ frente a 2 días, c = $p \leq 0,05$ frente a 4 días, d = $p \leq 0,05$ frente a 7 días, e = $p \leq 0,05$ frente a 14 días, 5 / 6Nx = 5/6 nefrectomía, d = días después de 5 / 6Nx, simulacro = operación simulada / grupo de control.

8. Discusión

En los modelos de nefrectomía subtotal, las alteraciones hemodinámicas aparecen inmediatamente después de la cirugía [160], lo que lleva a un aumento de la snGFR , de la actividad de la $\text{ATPasa Na}^+/\text{K}^+$ y del gasto energético [161]. La pérdida de nefronas también desencadena un proceso de hipertrofia compensatoria en el riñón remanente, aumentando la síntesis de biomoléculas y factores de crecimiento desde el comienzo de la nefrectomía [162-164]. Juntas, la hiperfiltración y la hipertrofia generan una demanda de energía excesiva en los primeros momentos, especialmente en el PT, que puede inducir estrés en las fuentes de ATP, especialmente en las mitocondrias [161,133,142]. Además, los cambios en la perfusión renal y la oxigenación pueden inducir cambios metabólicos mitocondriales [136-138,161,165,142,]. Además, la sobreactivación posterior del sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) puede inducir un mayor daño mitocondrial, como la despolarización de $\Delta\Psi_m$ y el aumento de la producción de ROS, que se ha relacionado con la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato de hidrógeno (NADPH) oxidasa y activación nuclear de las vías $\text{NF-}\kappa\text{B}$ [166,167,168]. Esto está de acuerdo con nuestro informe anterior, donde mostramos que 24 h después de 5/6Nx, las alteraciones bioenergéticas en las mitocondrias de la masa renal remanente conducen a una reducción en la producción de ATP mitocondrial [133]. Aunque en 5/6Nx, las adaptaciones iniciales se desarrollan para compensar la reducción de la masa renal, con el tiempo son desadaptativas, produciendo un ciclo de deterioro progresivo en el riñón, que resulta en daño estructural renal y progresión a CKD [134,161]. En el presente estudio confirmamos la permanencia de la enfermedad renal inducida por ablación renal subtotal.

Como mostramos en la Figura 1A, B, el aumento de los marcadores clásicos de daño renal BUN y creatinina persiste a lo largo del tiempo en el grupo 5/6Nx. Además, el daño estructural de la nefrona en el riñón remanente y los procesos fibróticos aumentan progresivamente con el tiempo (Figura 1C-G). De hecho, al séptimo día postoperatorio observamos cambios hemodinámicos característicos de la CKD, como el aumento de la PAM (Figura 2A), que se mantiene a lo largo del tiempo. Curiosamente, la FF en el grupo de 5/6Nx aumentó en este momento (Figura 2E), lo que puede explicarse como parte de un mecanismo compensatorio activado para compensar la pérdida de masa renal. Sin embargo, como muestra la disminución de la GFR, RBF y RPF (Figura 2B-D), el aumento compensatorio en el día 7 en la GFR no es suficiente para mantener la función renal.

Existe un consenso de que las mitocondrias no mantienen el suministro de ATP en las nefronas remanentes [161,169,170]. La reducción de la presión de perfusión inducida por un aumento de la vasoconstricción es un mecanismo bien conocido

que induce la reducción concomitante del ATP celular, alterando el metabolismo de los nucleótidos de adenina [171]. En el presente estudio, el RBF cae un 70% el día 7 de 5/6Nx y permanece bajo los días 14 y 28. Por el contrario, el RVR aumenta aproximadamente 3 veces en todos los puntos de tiempo evaluados (Figura 2). Además, observamos una correlación positiva entre los 2 principales parámetros respiratorios asociados a la producción de ATP, S3 y P, y los cambios en RBF (Figura 4A, B). Aunque los valores de r todavía son bajos (Figura 4), lo que puede estar asociado con el bajo número de réplicas en los ensayos de respirometría. En conjunto, estos hallazgos muestran que la lesión inicial reduce las concentraciones renales de ATP y afecta la función y estructura mitocondrial, como se muestra en el estudio ultraestructural que exhibe fisión mitocondrial, numerosas mitocondrias pequeñas y redondas con crestas y lisosomas que entran en contacto con mitocondrias que denotan mitofagia, que se observa en todos los puntos temporales estudiados con alguna fusión mitocondrial luego de dos semanas de resección renal (Figura 7). Con el tiempo, es posible que el deterioro de la producción de ATP mitocondrial pueda afectar directamente el suministro de sangre renal. Además, se ha demostrado que la lesión isquémica renal daña permanentemente la microvasculatura renal perpetuando la isquemia tisular [172], lo que probablemente contribuya a un mayor daño a la producción de ATP mitocondrial.

Como mencionamos, actualmente, la literatura coincide en el hecho de que las adaptaciones mitocondriales después de la nefrectomía no son suficientes para mantener el suministro de ATP [161,169,170]. Sin embargo, el mecanismo y la progresión de las alteraciones mitocondriales, especialmente en el intervalo de tiempo entre el día 1 y el día 28, aún no está claro [166]. La falta de cambio en los parámetros respiratorios reportados previamente durante este intervalo [135] puede explicarse por la limitación de resolución de los protocolos clásicos de Oxygraph usados en esos trabajos, donde la capacidad de OXPHOS (P) y el Estado 3 se subestiman con frecuencia y S4 se sobreestima, evitando el discernimiento entre cambios sutiles [140]. Por tanto, utilizamos respirometría de alta resolución para evaluar alteraciones bioenergéticas mitocondriales. Nuestros resultados muestran que la caída en la producción de ATP mitocondrial en la respiración ligada a CI se debe a una reducción en los valores de P y S3 (Figura 3B) en todos los puntos de tiempo evaluados, lo que implica que el daño mitocondrial temprano informado a las 24 h [133] se conserva a lo largo de la transición de la CKD. Esto está de acuerdo con la reducción en las concentraciones de ATP y en las concentraciones de la subunidad β de ATP sintasa en la corteza renal de ratas observada el día 28 de 5/6Nx [138]. Nuestros resultados muestran que la reducción de la capacidad de OXPHOS mitocondrial (Figura 3B) es el resultado de una disminución en $\Delta\Psi_m$ en el estado respiratorio S3 (Figura 5B), en el que el consumo de oxígeno se utiliza predominantemente para la producción de ATP. Por tanto, la $\Delta\Psi_m$ más baja (Figura

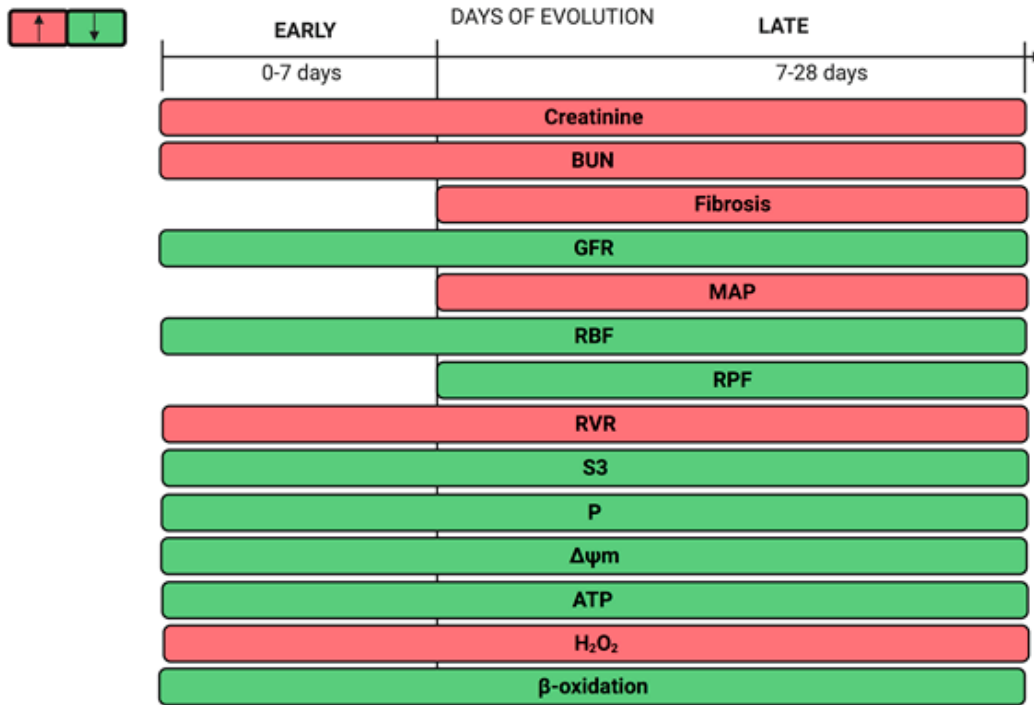
5B) da como resultado una actividad de ATP sintasa más baja (Figura 5A). Esta reducción en $\Delta\Psi_m$ puede atribuirse a la reducción de la actividad de CI observada desde el día 2 (Figura 5C), pero también a la disminución posterior en la actividad de CIII observada desde el día 7 (Figura 5E), lo que implica que el deterioro de CI precede al deterioro de CIII. Curiosamente, este fenómeno también se observó en el modelo de transición de IRA a CKD inducida por la administración de FA [143] y puede asociarse con una mayor susceptibilidad de CI a sufrir modificaciones postranscripcionales inducidas por estrés oxidativo [144-146]. Además, estos datos concuerdan con la disminución de las actividades de CI y CIII, y los niveles más bajos de subunidad β de ATP sintasa y subunidad de NADH deshidrogenasa-ubiquinona 1 subcomplejo beta subunidad 8 (NDUFB8) CI detectados el día 56 en ratas 5/6Nx [139]. De hecho, varios grupos informaron en grupos de 5/6Nx que después del día 28, la reducción de la biogénesis mitocondrial desencadena una disminución de la actividad de CI [136,137,139,142,173]. Sin embargo, en los primeros momentos, es decir, en los días 1, 10 y 14 de la nefrectomía, los estudios no encontraron un aumento en el mtDNA, en el ácido ribonucleico mitocondrial (mtRNA), en los niveles de subunidades de los complejos mitocondriales o en los niveles de transportadores [136,137,139,142,173], lo que puede sugerir que la reducción de las actividades de los complejos observados (Figura 5C, E) no está relacionada con la reducción de la biogénesis mitocondrial en la etapa temprana.

Por otro lado, en este trabajo reportamos por primera vez en 5/6Nx, una reducción en los parámetros respiratorios S3 y P, y en la β -oxidación de ácidos grasos en los días 2 y 4 (Figura 3C), mostrando que la producción de ATP por la β -oxidación también se reduce en los primeros momentos de este modelo. Esto es particularmente importante porque estudios recientes sugieren que el deterioro de las proteínas de oxidación mitocondrial parece ser una patología común en la CKD [174,175,142]. De hecho, en el daño renal inducido por FA, el deterioro de la β -oxidación de FA mitocondrial es un mecanismo temprano que promueve la transición a la CKD y el aumento de los procesos fibróticos [143,176]. En concordancia, nuestros resultados muestran que el deterioro de la oxidación (Figura 3C) precede a la acumulación de colágeno en el riñón remanente (Figura 1D-F). Además, los sustratos ligados a la oxidación muestran una disminución progresiva en el acoplamiento mitocondrial (Figura 3C), lo que explica parcialmente el aumento en la producción de H_2O_2 mitocondrial observado a lo largo del intervalo de tiempo evaluado (Figura 6A). Esto, junto con la reducción de los niveles de enzimas antioxidantes en las mitocondrias (Figura 6B, C), implica un estado pro-oxidativo permanente en estos orgánulos del riñón remanente. De hecho, en el día 10 de 5/6Nx, la disminución de la actividad de la aconitasa (un indicador de estrés oxidativo mitocondrial) y el aumento de los niveles de 4-hidroxi-2-nonenal, se han informado previamente [177]. Las mitocondrias también son más susceptibles a ser

dañadas por oxidantes externos [147], lo que confirma un desequilibrio mitocondrial redox en los primeros momentos después de la ablación renal. Además, informes recientes muestran que un estado pro-oxidante mitocondrial crónico persiste a largo plazo en ratas 5/6Nx, como lo sugieren los niveles elevados del marcador de lipoperoxidación malondialdehído (MDA), los niveles disminuidos de GSH y la actividad reducida de MnSOD y los niveles de proteína en los días 56, 84 y 91 de nefrectomía [136-139,177]. Además, el estrés oxidativo mitocondrial en una etapa crónica induce fuertemente los procesos inflamatorios y fibróticos que conducen a la CKD en este modelo [133,137,178]. Una consecuencia deletérea adicional de una reducción de la β -oxidación de FA es la acumulación de lípidos intrarrenales que causan lipotoxicidad, un mecanismo que es perjudicial para la función renal [179].

Como se presenta en la Figura 13A, los cambios patológicos observados en el riñón remanente se pueden dividir en dos periodos de tiempo para su análisis: (1) aquellos que son observables desde épocas tempranas, como las alteraciones hemodinámicas que aparecen inmediatamente después de la pérdida de masa renal, incluyendo el aumento de RVR y presión de los capilares glomerulares, así como la disminución del RBF. Estas alteraciones pueden estar estrechamente relacionadas con el daño mitocondrial, especialmente con el deterioro de la capacidad y oxidación de OXPHOS, que persisten y son progresivos a lo largo de la evolución de la enfermedad y consisten en áreas focales de atrofia tubular e inflamación intersticial. En tanto, (2) las segundas aparecen en épocas posteriores y están relacionadas con el desarrollo de CKD, como el aumento de la MAP y el aumento de la inflamación intersticial con fibrosis, el engrosamiento de la capa muscular de las arteriolas y el aumento del ensanchamiento mesangial. Como presentamos en un esquema integrador de alteraciones mitocondriales (Figura 13B), desde tiempos tempranos, 5/6Nx induce la disminución de la actividad de CI y beta oxidación mitocondrial. Estos cambios y la posterior disminución de la actividad de CIII desencadenan una reducción permanente de $\Delta\Psi_m$, favoreciendo la reducción de la actividad de la ATP sintasa y, por tanto, de la producción de ATP. Como se puede observar por la reducción de los valores de S3 y P en la respiración ligada a CI, que se correlacionan con la disminución de RBF y RPF y con el aumento de RVR, cambios hemodinámicos que están estrechamente relacionados con el desarrollo de CKD en este modelo. Por otro lado, las deficiencias en las actividades de los complejos y en la oxidación también favorecen el aumento del desacoplamiento mitocondrial y del S4o, mejorando la fuga de la respiración y la producción de H₂O₂ mitocondrial. Por tanto, nuestros resultados pueden sugerir que el aumento renal de ROS y el estrés oxidativo, junto con el deterioro de la oxidación, pueden contribuir al desarrollo de la fibrosis renal y la progresión de la CKD en este modelo.

A)



B)

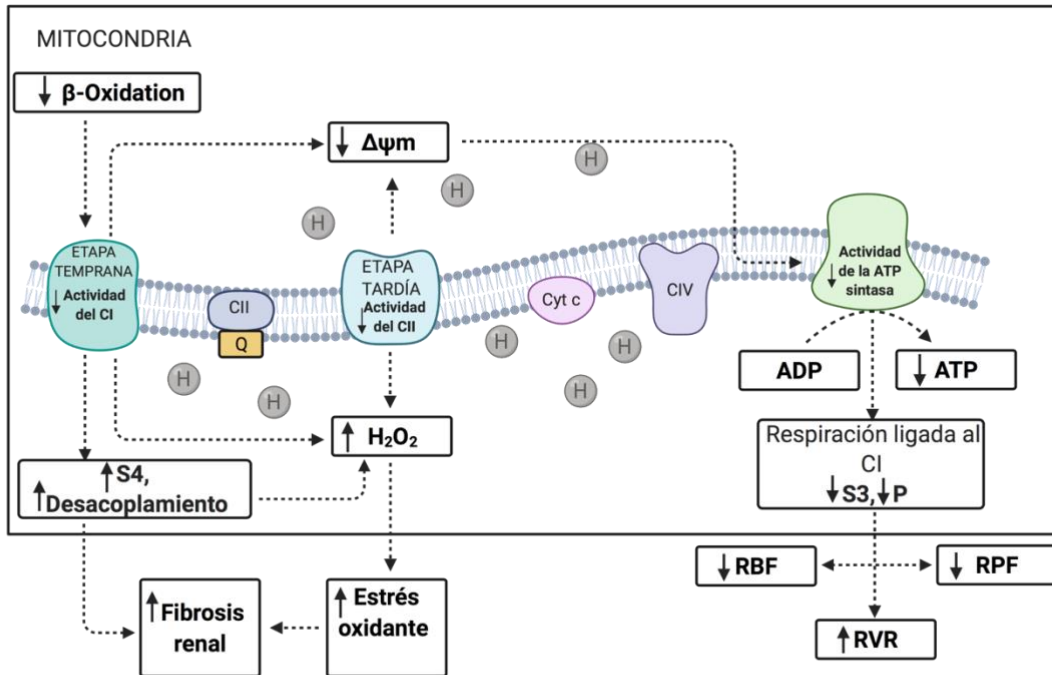


Figura 13. (A) Evolución temporal del cambio patológico observado en riñón remanente tras nefrectomía 5/6 (5/6Nx). Para facilitar el análisis, se pueden identificar dos etapas, una etapa temprana (desde las primeras horas y hasta el día 7) y una etapa tardía (días 7 a 28). Las barras rojas representan un aumento en los valores de los respectivos parámetros, mientras que las barras verdes representan una disminución. (B) Esquema integrador de los cambios patológicos mitocondriales y su contribución al desarrollo de CKD en el modelo 5/6Nx. La flecha de línea continua hacia arriba (\uparrow) indica un aumento en el parámetro correspondiente. Las flechas de línea continua hacia abajo (\downarrow) indican una disminución en el parámetro correspondiente. La flecha de puntos indica las relaciones propuestas entre los cambios observados. BUN= nitrógeno ureico en sangre; CI= complejo mitocondrial I; CII= complejo mitocondrial II; CIII= complejo mitocondrial III; CIV= complejo mitocondrial IV; Cyt c= citocromo c; GFR= tasa de filtración glomerular; H₂O₂= peróxido de hidrógeno mitocondrial; Q= quinona; P= respiración asociada a fosforilación oxidativa; S3= estado respiratorio 3; S4o= estado respiratorio 4 inducido por oligomicina; RBF= flujo sanguíneo renal; RPF= flujo plasmático renal; RVR= resistencia vascular renal; MAP= presión arterial media; DYm= potencial de membrana mitocondrial.

Aunque la dramática reducción de nefronas en poco tiempo producida por modelos de ablación renal, como 5/6Nx, es poco frecuente en pacientes, este tipo de modelo es el más utilizado para caracterizar la progresión de la CKD, porque imita muchos procesos patológicos observados en la contraparte humana [161,180]. Además, muchos mecanismos implicados en la progresión de la CKD en este modelo también se encuentran en pacientes, tanto en contextos diabéticos como no diabéticos [134,161]. Aunque estos hechos hacen que 5/6Nx sea una herramienta poderosa para estudiar la progresión de la CKD, este modelo también posee limitaciones; por ejemplo, los polimorfismos genéticos en animales y su género podrían afectar la susceptibilidad a 5/6Nx. De hecho, los ratones 129/Sv, las ratas Wistar y las ratas hembra son más susceptibles al daño renal que los ratones C57BL5, las ratas Sprague-Dawley y las ratas macho [181]. Además, las agresiones patológicas implicadas en la génesis del daño renal pueden afectar el mecanismo implicado en la evolución de la CKD, como en el caso de la diabetes, enfermedades autoinmunes, tumores, por nombrar algunos [161,180,182]. Por lo tanto, los resultados que presentamos en este trabajo deben tomarse con precaución si se van a extrapolar a otros modelos de daño renal. Sin embargo, la evidencia creciente sugiere que las alteraciones mitocondriales renales participan en la progresión de varios tipos de CKD tanto en contextos diabéticos como no diabéticos [161,166, 177,183-186].

El presente trabajo también puede sugerir que la terapia de enfoque mitocondrial y

especialmente el uso de compuestos dirigidos a las mitocondrias puede prevenir o retrasar la progresión de la CKD. De hecho, como mostramos en la Figura 13, nuestros resultados muestran que tanto la disfunción de CI-CIII como el deterioro de la oxidación serían la principal diana molecular terapéutica en las mitocondrias, ya que su preservación funcional evitaría alteraciones mitocondriales posteriores en el modelo 5/6Nx. Aunque el modelo 5/6Nx no cubre completamente el amplio espectro de patologías incluidas en la CKD, otros modelos de progresión de la CKD, como el inducido por el FA [143], también muestran una reducción en la capacidad de OXPHOS relacionada con CI-CIII y deterioro de la oxidación. Además, en este modelo, la conservación en tiempos tempranos de las actividades de los complejos por la N-acetilcisteína previene el deterioro de la oxidación y la posterior transición de AKI a CKD [143]. Aunque la correlación de la información obtenida en los modelos experimentales con los datos clínicos de los pacientes con CKD es todavía escasa [187], recientemente se ha descrito la desregulación de la oxidación en los pacientes [176,188] y su regulación a la baja se relacionó con la progresión de la CKD por procesos fibróticos [176]. Juntos, estos trabajos y nuestros resultados pueden sugerir que los complejos mitocondriales y la terapia de diana de oxidación pueden potencialmente prevenir la progresión del daño renal en múltiples tipos de CKD. De hecho, en el modelo 5/6Nx, las terapias de dianas mitocondriales como la administración de Mito-TEMPO [189], carnitina [190] y resveratrol [138], antioxidantes capaces de inducir la biogénesis mitocondrial, pueden prevenir la progresión de la CKD. Sin embargo, aún son necesarios estudios más profundos y protocolos clínicos mejorados para confirmar esta hipótesis, con especial interés en las moléculas enfocadas en prevenir la pérdida de las actividades del complejo mitocondrial en las primeras etapas del daño renal.

Como mencionamos anteriormente, la reducción de la masa renal en 5/6Nx desencadena varias adaptaciones en las nefronas remanentes para mantener la función renal [191]. Entre ellos, los aumentos de la GFR de una sola nefrona, de la reabsorción de solutos y de los procesos biosintéticos relacionados con la hipertrofia generan un aumento de la demanda de ATP, especialmente en los segmentos tubulares [192,193]. Sin embargo, las adaptaciones mitocondriales después de 5/6Nx no son suficientes para mantener el suministro de ATP en condiciones de estrés energético [191,194,195]. Un entorno energético tan desfavorable conduce al deterioro de las mitocondrias, que se caracteriza por una reducción de la capacidad de OXPHOS, por una disminución de la actividad del complejo respiratorio I (CI) en la etapa temprana [152] y por una disminución del complejo respiratorio III (CIII). actividad en la última etapa, junto con la reducción de la β -oxidación mitocondrial, especialmente en el intervalo de tiempo entre 2 días y 28 días después de la ablación renal subtotal [150]. Sin embargo, en el momento más temprano (1 día) después de 5/6Nx, estas alteraciones mitocondriales no están

relacionadas con los niveles de proteína mitocondrial [150]. Sin embargo, en momentos más avanzados de la enfermedad, no se puede excluir la participación de los procesos que coordinan el recambio mitocondrial (biogénesis mitocondrial y remoción mitocondrial), especialmente porque la bioenergética mitocondrial está estrechamente coordinada con el recambio y la dinámica mitocondrial, favoreciendo cambios específicos en estos procesos dependientes de las demandas energéticas [196-198]. Sin embargo, el desarrollo de la biogénesis mitocondrial y los cambios en la dinámica no está claro en el intervalo de tiempo entre el día 2 y el día 28 después de la ablación renal subtotal [154].

Nuestros resultados mostraron que, en este intervalo, hay una reducción progresiva de los genes de biogénesis mitocondrial en el riñón remanente (Figura 9). De hecho, además de las alteraciones bioenergéticas mitocondriales, se ha informado de un aumento temprano en el volumen mitocondrial por célula a partir del día 1 y persistiendo hasta el día 14 [152,159], sin un aumento en el mtDNA o en la expresión de genes mitocondriales codificados en el núcleo (con excepción de los transportadores de glutatión) [152,159,199,200]. Esto es congruente con nuestros resultados, en los que observamos una reducción en los niveles de PGC-1 α , NRF1, NRF2 y TFAM (Figura 9B), lo que implica la regulación a la baja de la maquinaria de biogénesis mitocondrial a lo largo del tiempo. Esta reducción apareció después del día 2 y fue progresiva con el tiempo (Figura 9B), provocando una disminución en las proteínas VDAC desde el día 4 al día 28 (Figura 9A). De acuerdo con estos datos, los análisis proteómicos de la corteza renal de ratas 5/6Nx en el día 28 mostraron una regulación a la baja de las proteínas mitocondriales: acetildeshidrogenasa de cadena media (MCAD), fosfoglicerato quinasa 1 (PGK-1), proteína 75 regulada por glucosa. (GRP-75), NDUFB8 y citocromo c oxidasa subunidades I (COXI) y IV (COXIV) [201]. Además, también se detectaron niveles más bajos de la subunidad β de ATP sintasa, COXI y NDUFB8 8 semanas después de la cirugía en ratas 5/6Nx [202]. Otros también informaron que aparece una reducción en la biogénesis mitocondrial después del deterioro de la bioenergética [152]. Sin embargo, la reducción de la biogénesis mitocondrial comienza a partir del día 2, lo que lleva a una reducción posterior de las proteínas mitocondriales de OXPHOS y de la β -oxidación a las 4 semanas después de la cirugía [201,202]. Anteriormente informamos que la β -oxidación mitocondrial estaba alterada en el riñón remanente ya en el día 2 con una reducción en la producción de ATP [150]; esta observación está de acuerdo con una reducción en los niveles de CPT1 (Figura 2A) y PPAR α (Figura 9B), informada en el presente estudio.

Algunos autores demostraron que, de 12 a 13 semanas después de 5/6Nx, hay una disminución significativa del mtDNA en el riñón remanente, asociada con una alteración de la biogénesis inducida por el aumento del nivel de TGF- β 1 [203,204].

Esto es particularmente interesante porque la reducción en la expresión de genes de β -oxidación de ácidos grasos precedió al aumento de procesos fibróticos en otros modelos de CKD [205,206]. De hecho, recientemente se demostró que la reducción de las proteínas de β -oxidación de ácidos grasos por sí sola es suficiente para reprogramar las células epiteliales tubulares en un fenotipo profibrótico a través de la vía TGF- β 1 [205]. De acuerdo, nuestros resultados mostraron una correlación positiva entre la reducción en NRF1 y PGC-1 α (Figura 9B) y un aumento en las proteínas de daño tubular KIM-1 y NGAL (Figura 8A, B), lo que implica que una reducción en la biogénesis mitocondrial puede ser un desencadenante esencial de la reprogramación tubular al fenotipo fibrótico en el modelo 5/6Nx.

En varios modelos de daño renal, se ha informado que la mitofagia mediada por PINK-Parkin es el principal mecanismo involucrado en la eliminación de las mitocondrias dañadas [207-209]. Sin embargo, en los períodos evaluados en este estudio, no observamos cambios significativos en los niveles de Parkin y PINK en mitocondrias aisladas de riñones remanentes (Figura 5A). Por el contrario, los marcadores de macroautofagia p62, LC3B-I y LC3B-II aumentaron progresivamente con el tiempo (Figura 12B), lo que implica la inducción de autofagia. Además, la microscopía electrónica mostró, en el día 28, evidencia sustancial de autofagia y mitocondrias cerca de los cuerpos de autofagia (Figura 11C), lo que sugiere que este mecanismo estaría principalmente presente más adelante. Sin embargo, aún son necesarios estudios más profundos para determinar la participación de estos mecanismos en la reducción de la masa mitocondrial después de la nefrectomía, como la evaluación de marcadores de autofagia PINK-Parkin-independientes a lo largo del tiempo.

Nuestros resultados también mostraron un cambio progresivo de la dinámica mitocondrial de la fusión a la fisión (Figura 10). En el día 1, después de 5/6Nx, el aumento de las proteínas MFN1 y OPA1 y la disminución de los niveles de FIS1 y DRP1 en las mitocondrias conducen a un tamaño mitocondrial más grande en el túbulo proximal [152]. El análisis morfométrico en esta sección confirmó este aumento del volumen mitocondrial, alcanzando su máximo el día 14 (66% en comparación con el control) [159]. También notamos en este momento que el mtDNA no aumentó y que la biogénesis mitocondrial se redujo (Figura 9). Otros autores también concluyeron que las mitocondrias sufrieron hipertrofia patológica (aumento de tamaño) en lugar de proliferación [159,210]. Sin embargo, esta tendencia cambia junto con la progresión de la CKD; De hecho, nuestros resultados mostraron que DRP1 aumentó 28 días después de la cirugía (Figura 10A, B) y las proteínas de fusión MFN2 y OPA1 comenzaron a aumentar desde el día 2 (Figura 10A, C), mientras que la fragmentación mitocondrial se observó por microscopía electrónica después del día 7 (Figura 11). En conjunto, estos datos sugieren el

cambio gradual y lento a la fisión mitocondrial. De acuerdo con otros, informamos de un aumento en la fragmentación mitocondrial en el día 28 [150,211] sin cambios en el mtDNA. Esta tendencia persistió incluso 8 semanas después de la cirugía [202]. Por lo tanto, nuestros datos sugieren que, en el riñón remanente, el intervalo del día 2 al día 28 llevó a un cambio de la fusión mitocondrial a la fisión en este modelo (Figuras 10 y 11).

Integramos los resultados en el diagrama de la Figura 14, en el que mostramos la progresión temporal de los cambios en la biogénesis y dinámica mitocondrial en el intervalo de tiempo entre el día 2 y el día 28 tras 5/6Nx, así como su relación con la progresión de daño renal. Teniendo en cuenta los datos obtenidos en este manuscrito, las mitocondrias pueden ser un objetivo eficaz para atenuar el daño renal. La terapia dirigida a las mitocondrias ayudaría a mantener la homeostasis mitocondrial y, por lo tanto, a prevenir el desarrollo de CKD, como se sugirió anteriormente [212,213].

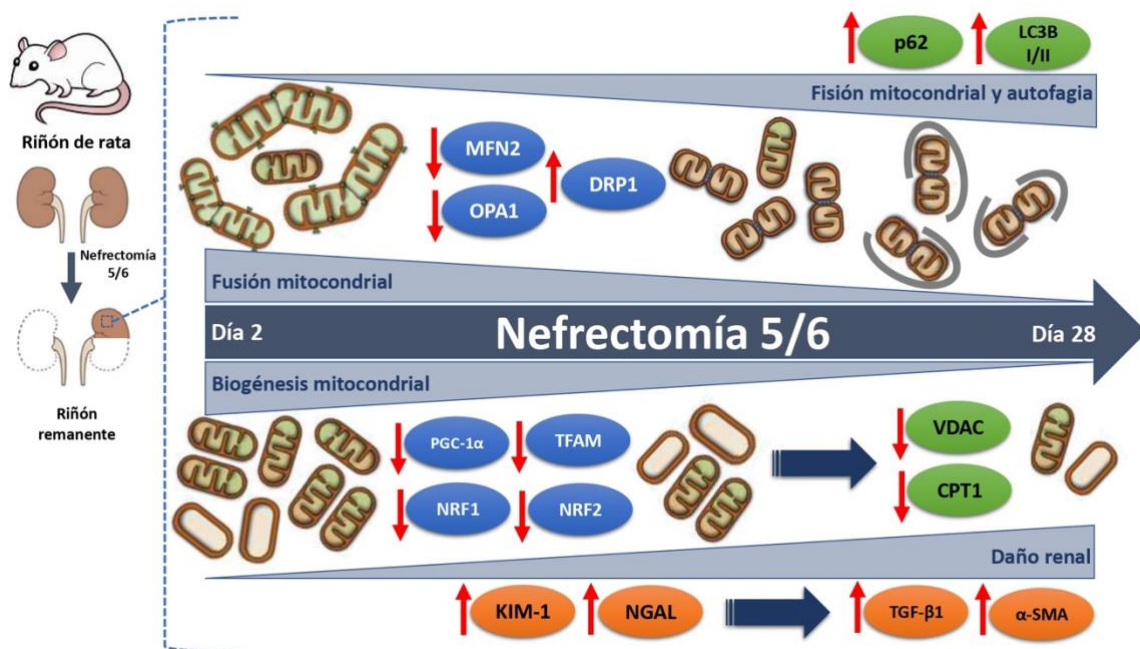


Figura 14. Evolución de la biogénesis mitocondrial y cambios de dinámica en el intervalo de tiempo entre el día 2 y el día 28 después de la nefrectomía 5/6 (5/6Nx). En este intervalo, hay una reducción progresiva en los niveles de coactivador 1-alfa del receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma (PGC-1 α), receptor alfa activado por proliferador de peroxisoma (PPAR α), factor respiratorio nuclear 1 (NRF1) y 2 (NRF2).) y el factor de transcripción mitocondrial A (TFAM), que implica la regulación a la baja de la maquinaria de biogénesis mitocondrial a lo largo del tiempo. Esta reducción aparece a partir del día 2 y es progresiva en el tiempo,

desencadenando la disminución de proteínas mitocondriales como el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) y la carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1) desde el día 2 al día 28. Existe una correlación positiva entre la reducción en factores de biogénesis mitocondrial con el aumento de las proteínas de daño tubular molécula de daño renal 1 (KIM-1) y lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL) y factor de crecimiento transformante de molécula profibrótica beta (TGF- β), lo que implica que la biogénesis mitocondrial reducida puede ser un desencadenante clave de la reprogramación tubular al fenotipo fibrótico en el modelo de nefrectomía 5/6. Además, también se muestra un cambio lento y gradual en la dinámica mitocondrial de la fusión a la fisión. Esta tendencia se inició con la reducción el día 2 posterior a la nefrectomía en las proteínas de fusión mitofusina 2 (MFN2) y atrofia óptica 1 (OPA1), favoreciendo la fragmentación mitocondrial observada a partir de los 7 días y continúa con los aumentos de DRP1. a los 28 d después de la cirugía. Además, los marcadores de macro-autofagia, la proteína de unión a ubiquitina p62 y las proteínas asociadas a microtúbulos 1A / 1B de cadena ligera 3B I y II (LC3B-I / II) aumentaron progresivamente con el tiempo, lo que implica la inducción de autofagia. Este mecanismo estaría presente principalmente en épocas crónicas.

9. Conclusiones

- La ablación renal subtotal desencadena cambios hemodinámicos tempranos que conducen a un estado patológico en la respiración ligada a CI mitocondrial en el riñón remanente.
- Este estado patológico se caracteriza por una reducción de la capacidad de OXPHOS, por una disminución de la actividad de los CI en la etapa temprana; y en la etapa posterior, por una disminución de la actividad de CIII.
- Estos cambios patológicos contribuyen al deterioro de la producción de ATP mitocondrial y la β -oxidación, favoreciendo la progresión de la CKD en este modelo.
- Estos efectos, junto con las alteraciones de la oxidación mitocondrial (desacoplamiento mitocondrial), persisten en el tiempo.
- El modelo de 5/6Nx induce una reducción progresiva de la masa mitocondrial a través de una disminución de la biogénesis mitocondrial,
- El modelo de 5/6Nx induce un cambio lento de la fisión mitocondrial a la

fusión en el riñón remanente.

10. Referencias

- [1] B.M. Koeppen, B.A. Stanton, 2 - Structure and Function of the Kidneys, in: B.M. Koeppen, B.A. Stanton (Eds.), *Ren. Physiol.* (Fifth Ed., Fifth Edit, Mosby, Philadelphia, 2013: pp. 15–26. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-08691-2.00002-8>.
- [2] BrennerRector, *Anatomy of the Kidney, Taal Brenner Rector's Kidney*, 9th Ed. (2011) 1– 111. doi:[10.1016/B978-1-4160-6193-9.10002-8](https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-6193-9.10002-8).
- [3] D.U. Silverthorn, *Fisiología humana : Un enfoque integrado*, 4th ed., Buenos Aires, 2009.
- [4] C. Lote, *Principles of renal physiology*, 4th ed., Springer New York, 2014.
- [5] A.B. Fogo, A.H. Cohen, R.B. Colvin, J.C. Jennette, C.E. Alpers, *Fundamentals of renal pathology*, First edit, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2014. doi:[10.1007/978-3-642-39080-7](https://doi.org/10.1007/978-3-642-39080-7).
- [6] A.S.L.Y. Jianghui Hou, Madhumitha Rajagopal, NIH Public Access, (2013) 479–501. doi:[10.1146/annurev-physiol-030212-183705.Claudins](https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183705.Claudins).
- [7] A. Doucet, A.I. Katz, High-affinity Ca-Mg-ATPase along the rabbit nephron, *Am. J. Physiol.* 242 (1982) F346–F352.
- [8] T. Sekine, H. Endou, Solute Transport, Energy Consumption, and Production in the Kidney, in: *Seldin and Geibisch's The Kidney*, Fifth Edit, Elsevier, 2013: pp. 143–175. doi:[10.1016/B978-0-12-381462-3.00006-9](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381462-3.00006-9).
- [9] F. Kiil, K. Aukland, H. Refsum, Renal sodium transport and oxygen consumption., *Am. J. Physiol.* 201 (1961) 511–6.
- [10] W. Pfaller, M. Rittinger, Quantitative morphology of the rat kidney, *Int. J. Biochem.* 12 (1980) 17–22.
- [11] K. Klein, W. Maw-Song, S. Torikai, D.D. Warren, K. Kurakawa, Substrate oxidation by isolated single nephron segments of the rat, *Kidney Int.* 20 (1981) 29–35.

- [12]** R.L.S. Goncalves, C.L. Quinlan, I. V Perevoshchikova, M. Hey-Mogensen, M.D. Brand, Sites of superoxide and hydrogen peroxide production by muscle mitochondria assessed ex vivo under conditions mimicking rest and exercise., *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 209–27. doi:10.1074/jbc.M114.619072.
- [13]** M. Lehir, U. Dubach, Peroxisomal and Mitochondrial Beta-Oxidation in the Rat Kidney: Distribution of Fatty Acyl-Coenzyme A Oxidase and 3-Hydroxyacyl-Coenzyme A Dehydrogenase Activities along the Nephron, *J. Histochem. Cytochem.* (1982).
- [14]** S.I. Harris, R.S. Balaban, L. Barrett, L.J. Mandel, Mitochondrial respiratory capacity and Na⁺- and K⁺-dependent adenosine triphosphatase-mediated ion transport in the intact renal cell, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 10319–10328.
- [15]** W.G. Guder, S. Wagner, G. Wirthensohn, Metabolic fuels along the nephron : Pathways and intracellular mechanisms of interaction GlutamineW, 29 (1986).
- [16]** V. Affairs, N. Orleans, Metabolic support of collecting duct transport, 53 (1998) 408–415.
- [17]** A.M. Hall, G.J. Rhodes, R.M. Sandoval, P.R. Corridon, B.A. Molitoris, In vivo multiphoton imaging of mitochondrial structure and function during acute kidney injury, *Kidney Int.* 83 (2014) 72–83. doi:10.1038/ki.2012.328.In.
- [18]** A.M. Hall, R.J. Unwin, N. Parker, M.R. Duchon, Multiphoton imaging reveals differences in mitochondrial function between nephron segments., *J. Am. Soc. Nephrol.* 20 (2009) 1293–302. doi:10.1681/ASN.2008070759.
- [19]** M. Zhan, C. Brooks, F. Liu, L. Sun, Z. Dong, Mitochondrial dynamics: regulatory mechanisms and emerging role in renal pathophysiology, *Kidney Int.* 83 (2013) 568–581. doi:10.1038/ki.2012.441.
- [20]** Y. Ishimoto, R. Inagi, Mitochondria: a therapeutic target in acute kidney injury., *Nephrol. Dial. Transplant.* 31 (2015) 1062–1069. doi:10.1093/ndt/gfv317.
- [21]** S. Granata, A. Dalla Gassa, P. Tomei, A. Lupo, G. Zaza, Mitochondria: a new therapeutic target in chronic kidney disease., *Nutr. Metab. (Lond).* 12 (2015) 1–21. doi:10.1186/s12986-015-0044-z.
- [22]** R. Che, Y. Yuan, S. Huang, A. Zhang, Mitochondrial dysfunction in the

pathophysiology of renal diseases, *Am. J. Physiol. Physiol.* 306 (2014) F367–F378. doi:10.1152/ajprenal.00571.2013.

[23] A. Mather, C. Pollock, Glucose handling by the kidney., *Kidney Int. Suppl.* 79 (2011) S1– S6. doi:10.1038/ki.2010.509.

[24] A. Maleque, H. Endou, C. Koseki, F. Sakai, Nephron heterogeneity: gluconeogenesis from pyruvate in rabbit nephron, *FEBS Lett.* 116 (1980) 154–156. doi:10.1016/0014- 5793(80)80631-4.

[25] E. Cersosimo, P.E. Molina, N.N. Abumrad, Renal lactate metabolism and gluconeogenesis during insulin-induced hypoglycemia, *Diabetes.* 47 (1998) 1101–1106. doi:10.2337/diabetes.47.7.1101.

[26] A.A. McDonough, S.C. Thomson, Metabolic Basis of Solute Transport, in: Brenner and Rector's *The Kidney*, Ninth Edit, Elsevier, 2012: pp. 138–157. doi:10.1016/b978-1-4160- 6193-9.10004-1.

[27] R.J. Mailloux, W.G. Willmore, S-glutathionylation reactions in mitochondrial function and disease., *Front. Cell Dev. Biol.* 68 (2014) 1–17. doi:10.3389/fcell.2014.00068.

[28] C.L. Quinlan, I. V. Perevoshchikova, M. Hey-Mogensen, A.L. Orr, M.D. Brand, Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates, *Redox Biol.* 1 (2013) 304–312. doi:10.1016/j.redox.2013.04.005.

[29] C.L. Quinlan, J.R. Treberg, I. V. Perevoshchikova, A.L. Orr, M.D. Brand, Native rates of superoxide production from multiple sites in isolated mitochondria measured using endogenous reporters, *Free Radic. Biol. Med.* 53 (2012) 1807–1817. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.015.

[30] B.-Z. Shao, Z.-Q. Xu, B.-Z. Han, D.-F. Su, C. Liu, NLRP3 inflammasome and its inhibitors: a review., *Front. Pharmacol.* 6 (2015) 262. doi:10.3389/fphar.2015.00262.

[31] S. Granata, V. Masola, E. Zoratti, M.T. Scupoli, A. Baruzzi, M. Messa, F. Sallustio, L. Gesualdo, A. Lupo, G. Zaza, NLRP3 inflammasome activation in dialyzed chronic kidney disease patients, *PLoS One.* 10 (2015) 1–16. doi:10.1371/journal.pone.0122272.

[32] J.F. Chen, H. Liu, H.F. Ni, L.L. Lv, M.H. Zhang, A.H. Zhang, R.N. Tang, P.S.

Chen, B.C. Liu, Improved mitochondrial function underlies the protective effect of pirfenidone against tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats, *PLoS One*. 8 (2013) 1–15. doi:10.1371/journal.pone.0083593.

[33] Y. Yuan, Y. Chen, P. Zhang, S. Huang, C. Zhu, G. Ding, B. Liu, T. Yang, A. Zhang, Mitochondrial dysfunction accounts for aldosterone-induced epithelial-to-mesenchymal transition of renal proximal tubular epithelial cells, *Free Radic. Biol. Med.* 53 (2012) 30–43. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.03.015.

[34] J. Blaine, M. Chonchol, M. Levi, Renal control of calcium, phosphate, and magnesium homeostasis, *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 10 (2015) 1257–1272. doi:10.2215/CJN.09750913.

[35] C. Giorgi, A. Danese, S. Missiroli, S. Patergnani, P. Pinton, Calcium Dynamics as a Machine for Decoding Signals, *Trends Cell Biol.* 28 (2018) 258–273. doi:10.1016/j.tcb.2018.01.002.

[36] C. Giorgi, S. Marchi, P. Pinton, The machineries, regulation and cellular functions of mitochondrial calcium, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (2018). doi:10.1038/s41580-018-0052-8.

[37] G. Csordás, D. Weaver, G. Hajnóczky, Endoplasmic Reticulum–Mitochondrial Contactology: Structure and Signaling Functions, *Trends Cell Biol.* 28 (2018) 523–540. doi:10.1016/j.tcb.2018.02.009.

[38] J. Prudent, H.M. McBride, The mitochondria–endoplasmic reticulum contact sites: a signalling platform for cell death, *Curr. Opin. Cell Biol.* 47 (2017) 52–63. doi:10.1016/j.ceb.2017.03.007.

[39] H. Nishi, T. Higashihara, R. Inagi, Lipotoxicity in kidney, heart, and skeletal muscle dysfunction, *Nutrients*. 11 (2019) 1–17. doi:10.3390/nu11071664.

[40] A.A. Sharfuddin, S.D. Weisbord, P.M. Palevsky, B.A. Molitoris, Acute Kidney Injury, in: K. Skorecki, G.M. Chertow, P.A. Marsden, M.W. Taal, A.S.L. Yu (Eds.), *Brenner and Rector's The Kidney*, Ninth Edit, Elsevier, Philadelphia, 2012: pp. 1044–1099. doi:10.1016/B978-1-4160-6193-9.10030-2.

[41] M.E. Thomas, C. Blaine, A. Dawnay, M. a J. Devonald, S. Ftouh, C. Laing, S. Latchem, A. Lewington, D. V Milford, M. Ostermann, The definition of acute kidney injury and

its use in practice., *Kidney Int.* 87 (2014) 1–12. doi:10.1038/ki.2014.328.

[42] E.D. Siew, A. Davenport, The growth of acute kidney injury: a rising tide or just closer attention to detail? GROWTH IN THE INCIDENCE OF AKI: IS IT REAL? Changes in the incidence of AKI using administrative codes, *Kidney Int.* 87 (2014) 46–61. doi:10.1038/ki.2014.293.

[43] M. Morigi, L. Perico, C. Rota, L. Longaretti, S. Conti, D. Rottoli, R. Novelli, G. Remuzzi, A. Benigni, Sirtuin 3-dependent mitochondrial dynamic improvements protect against acute kidney injury, *J. Clin. Invest.* 125 (2015) 715–726. doi:10.1172/JCI77632.

[44] P.K.T. Li, E.A. Burdmann, R.L. Mehta, Acute kidney injury: Global health alert, *Hong Kong J. Nephrol.* 15 (2013) 1–5. doi:10.1016/j.hkjin.2013.03.001.

[45] M. Negrette-Guzmán, S. Huerta-Yeppez, O.N. Medina-Campos, Z.L. Zatarain-Barrón, R. Hernández-Pando, I. Torres, E. Tapia, J. Pedraza-Chaverri, Sulforaphane Attenuates Gentamicin-Induced Nephrotoxicity: Role of Mitochondrial Protection, *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 2013 (2013) 1–17. doi:10.1155/2013/135314.

[46] M. Ostermann, K. Liu, Pathophysiology of AKI, *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.* 31 (2017) 305–314. doi:10.1016/j.bpa.2017.09.001.

[47] M.N. Rana, J. Tangpong, M.M. Rahman, Toxicodynamics of Lead, Cadmium, Mercury and Arsenic- induced kidney toxicity and treatment strategy: A mini review., *Toxicol. Reports.* 5 (2018) 704–713. doi:10.1016/j.toxrep.2018.05.012.

[48] A.A. Sharfuddin, B.A. Molitoris, Pathophysiology of ischemic acute kidney injury, *Nat. Rev. Nephrol.* 7 (2011) 189–200. doi:10.1038/nrneph.2011.16.

[49] A.M. El Nahas, K.B. Aminu, Chronic kidney disease: the global challenge, *Lancet.* 365 (2005) 331–340. doi:10.1016/S0140-6736(05)70199-9.

[50] M.W. Taal, B.M. Brenner, Adaptation to Nephron Loss and Mechanisms of Progression in Chronic Kidney Disease, in: K. Skorecki, G.M. Chertow, P.A. Marsden, M.W. Taal, A.S.L. Yu (Eds.), *Brenner & Rector's The Kidney*, Ninth Edit, Elsevier, 2012: pp. 1918– 1971. doi:10.1016/B978-1-4160-6193-9.10051-X.

- [51] T. Shafi, J. Coresh, Chronic Kidney Disease: Definition, Epidemiology, Cost, and Outcomes, in: J. Himmelfarb, M.H. Sayegh (Eds.), *Chronic Kidney Dis. Dial. Transplant.*, 3rd ed., Elsevier Inc., 2010: pp. 3–21. doi:10.1016/B978-1-4377-0987-2.00001-7.
- [52] J.-J. Carrero, M. Hecking, I. Ulasi, L. Sola, B. Thomas, Chronic Kidney Disease, Gender, and Access to Care: A Global Perspective, *Semin. Nephrol.* 37 (2017) 296–308. doi:10.1016/j.semnephrol.2017.02.009.
- [53] A. Khwaja, M. El Kossi, J. Floege, M. El Nahas, The management of CKD: A look into the future, *Kidney Int.* 72 (2007) 1316–1323. doi:10.1038/sj.ki.5002489.
- [54] L.S. Gallardo Vidal, A.J. Rodríguez Méndez, M. Burgos Ochoa, M.L. Martínez Martínez, P. García Solís, M.E. Villagrán Herrera, A.M. Pérez Baza, Utilidad de un modelo de predicción para la enfermedad renal crónica en una unidad de primer nivel de atención, *Nefrología.* (2015) 3–5. doi:10.1016/j.nefro.2015.10.010.
- [55] A. Méndez-Durán, G. Pérez-Aguilar, F. Ayala-Ayala, R.A. Ruiz-Rosas, J.D.J. González- Izquierdo, J. Dávila-Torres, Panorama epidemiológico de la insuficiencia renal crónica en el segundo nivel de atención del Instituto Mexicano del Seguro Social, *Diálisis y Traspl.* 35 (2014) 148–156. doi:10.1016/j.dialis.2014.08.001.
- [56] A. Méndez-Durán, J. Francisco Méndez-Bueno, T. Tapia-Yañez, A.M. Montes, L. Aguilar-Sánchez, Epidemiología de la insuficiencia renal crónica en México, *Dial. y Traspl.* 31 (2010) 7–11. doi:10.1016/S1886-2845(10)70004-7.
- [57] D. Amato, C. Alvarez-Agular, R. Limones-Castañeda, E. Rodriguez, M. Avila-Diaz, F. Arreola, A. Gomez, R. Panigua, Prevalence of chronic kidney disease in an urban Mexican population, *Kidney Int.* 68 (2005) 11–17.
- [58] M. Morlans, J.R. Laporte, X. Vidal, D. Cabeza, P.D. Stolley, End-stage renal disease and non-narcotic analgesics: a case-control study., *Br. J. Clin. Pharmacol.* 30 (1990) 717–23.
- [59] E.D. Siew, A. Davenport, The growth of acute kidney injury: A rising tide or just closer attention to detail?, *Kidney Int.* 87 (2015) 46–61. doi:10.1038/ki.2014.293.
- [60] A.C. Webster, E. V. Nagler, R.L. Morton, P. Masson, Chronic Kidney Disease, *Lancet.* 389 (2017) 1238–1252. doi:10.1016/S0140-6736(16)32064-5.

- [61] O. Akinlolu, Addressing the global burden of chronic kidney disease through clinical and translational research., *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 125 (2014) 229–43; discussion 243-6.
- [62] V. Jha, G. Garcia-Garcia, K. Iseki, Z. Li, S. Naicker, B. Plattner, R. Saran, A.Y.M. Wang, C.W. Yang, Chronic kidney disease: Global dimension and perspectives, *Lancet.* 382 (2013) 260–272. doi:10.1016/S0140-6736(13)60687-X.
- [63] K. Doi, H. Rabb, Impact of acute kidney injury on distant organ function: Recent findings and potential therapeutic targets, *Kidney Int.* 89 (2016) 555–564. doi:10.1016/j.kint.2015.11.019.
- [64] P.S. Brookes, Y.S. Yoon, J.L. Robotham, M.W. Anders, S.S. Sheu, Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle, *Am. J. Physiol. Physiol.* 287 (2004) C817– C833. doi:10.1152/ajpcell.00139.2004.
- [65] P. Mukhopadhyay, B. Horváth, Z. Zsengellér, J. Zielonka, G. Tanchian, E. Holovac, M. Kechrid, V. Patel, I.E. Stillman, S.M. Parikh, J. Joseph, B. Kalyanaraman, P. Pacher, Mitochondrial-targeted antioxidants represent a promising approach for prevention of cisplatin-induced nephropathy., *Free Radic. Biol. Med.* 52 (2012) 497–506. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.11.001.
- [66] Y. Ishimoto, R. Inagi, Mitochondria: A therapeutic target in acute kidney injury, *Nephrol. Dial. Transplant.* 31 (2016) 1062–1069. doi:10.1093/ndt/gfv317.
- [67] C. Brooks, Q. Wei, S. Cho, Z. Dong, Regulation of mitochondrial dynamics in acute kidney injury in cell culture and rodent models, 119 (2009) 1275–1285. doi:10.1172/JCI37829DS1.
- [68] S. Granata, G. Zaza, S. Simone, G. Villani, D. Latorre, P. Pontrelli, M. Carella, F.P. Schena, G. Grandaliano, G. Pertosa, Mitochondrial dysregulation and oxidative stress in patients with chronic kidney disease, *BMC Genomics.* 10 (2009) 1–13. doi:10.1186/1471-2164-10-388.
- [69] E. Molina-Jijón, O.E. Aparicio-Trejo, R. Rodríguez-Muñoz, J.C. León-Contreras, M. del Carmen Cárdenas-Aguayo, O.N. Medina-Campos, E. Tapia, L.G. Sánchez-Lozada, R. Hernández-Pando, J.L. Reyes, L. Arreola-Mendoza, J. Pedraza-Chaverri, The nephroprotection exerted by curcumin in maleate-induced renal damage is associated with decreased mitochondrial fission and autophagy, *BioFactors.* (2016). doi:10.1002/biof.1313.

- [70] G. Zaza, S. Granata, V. Masola, C. Rugiu, F. Fantin, L. Gesualdo, F.P. Schena, A. Lupo, Downregulation of Nuclear-Encoded Genes of Oxidative Metabolism in Dialyzed Chronic Kidney Disease Patients, *PLoS One*. 8 (2013) 1–9. doi:10.1371/journal.pone.0077847.
- [71] J.P. Hayslett, M. Kashgarian, F.H. Epstein, Functional correlates of compensatory renal hypertrophy., *J. Clin. Invest.* 47 (1968) 774–799. doi:10.1172/JCI105772.
- [72] K. Tabei, D.J. Levenson, B.M. Brenner, Early enhancement of fluid transport in rabbit proximal straight tubules after loss of contralateral renal excretory function, *J. Clin. Invest.* 72 (1983) 871–881. doi:10.1172/JCI111058.
- [73] O.E. Aparicio-Trejo, E. Tapia, E. Molina-Jijón, O.N. Medina-Campos, N.A. Macías- Ruvalcaba, J.C. León-Contreras, R. Hernández-Pando, F.E. García-Arroyo, M. Cristóbal, L.G. Sánchez-Lozada, J. Pedraza-Chaverri, Curcumin prevents mitochondrial dynamics disturbances in early 5/6 nephrectomy: Relation to oxidative stress and mitochondrial bioenergetics, *BioFactors*. 43 (2017) 293–310. doi:10.1002/biof.1338.
- [74] L. V Fedorova, A. Tamirisa, D.J. Kennedy, S.T. Haller, G. Budnyy, J.I. Shapiro, D. Malhotra, Mitochondrial impairment in the five-sixth nephrectomy model of chronic renal failure: proteomic approach., *BMC Nephrol*. 14 (2013) 209–230. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3851543&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [75] W. Ding, T. Liu, X. Bi, Z. Zhang, Mitochondria-Targeted Antioxidant Mito-Tempo Protects Against Aldosterone-Induced Renal Injury in Vivo, *Cell. Physiol. Biochem*. 44 (2017) 741–750. doi:10.1159/000485287.
- [76] J.M. Forbes, D.R. Thorburn, Mitochondrial dysfunction in diabetic kidney disease, *Nat. Rev. Nephrol*. 14 (2018) 291–312. doi:10.1038/nrneph.2018.9.
- [77] S. Hwang, R. Bohman, P. Navas, J.T. Norman, T. Bradley, L.G. Fine, Hypertrophy of renal mitochondria., *J. Am. Soc. Nephrol*. 1 (1990) 822–7.
- [78] S. Kume, T. Uzu, S. Araki, T. Sugimoto, K. Isshiki, M. Chin-Kanasaki, M. Sakaguchi, N. Kubota, Y. Terauchi, T. Kadowaki, M. Haneda, A. Kashiwagi, D. Koya, Role of altered renal lipid metabolism in the development of renal injury induced by a high-fat diet., *J. Am. Soc. Nephrol*. 18 (2007) 2715–2723.

doi:10.1681/ASN.2007010089.

[79] H.H. Szeto, S. Liu, Y. Soong, N. Alam, G.T. Prusky, S. V. Seshan, Protection of mitochondria prevents high-fat diet induced glomerulopathy and proximal tubular injury, *Kidney Int.* 90 (2016) 997–1011. doi:10.1016/j.kint.2016.06.013.

[80] S. Hallan, M. Afkarian, L.R. Zelnick, B. Kestenbaum, S. Sharma, R. Saito, M. Darshi, G. Barding, D. Raftery, W. Ju, M. Kretzler, K. Sharma, I.H. de Boer, Metabolomics and Gene Expression Analysis Reveal Down-regulation of the Citric Acid (TCA) Cycle in Non-diabetic CKD Patients, *EBioMedicine.* 26 (2017) 68–77. doi:10.1016/j.ebiom.2017.10.027.

[81] M.T. Coughlan, T.-V. Nguyen, S.A. Penfold, G.C. Higgins, V. Thallas-Bonke, S.M. Tan, N.J. Van Bergen, K.C. Sourris, B.E. Harcourt, D.R. Thorburn, I.A. Trounce, M.E. Cooper, J.M. Forbes, Mapping time-course mitochondrial adaptations in the kidney in experimental diabetes, *Clin. Sci.* 130 (2016) 711–720. doi:10.1042/cs20150838.

[82] Mackenzie Walser, Progression of chronic renal failure in man, *Kidney Int.* 37 (1990) 1195–1210.

[83] A. Priyadarshi, S. Periyasamy, T.J. Burke, S.L. Britton, D. Malhotra, J.I. Shapiro, Effects of reduction of renal mass on renal oxygen tension and erythropoietin production in the rat, *Kidney Int.* 61 (2002) 542–546. doi:10.1046/j.1523-1755.2002.00140.x.

[84] B.M. Brenner, Nephron adaptation to renal injury or ablation., *Am. J. Physiol.* 249 (1985) F324–F337. doi:10.1152/ajprenal.1985.249.3.F324.

[85] L. Sun, Q. Yuan, T. Xu, L. Yao, J. Feng, J. Ma, L. Wang, C. Lu, D. Wang, Pioglitazone Improves Mitochondrial Function in the Remnant Kidney and Protects against Renal Fibrosis in 5/6 Nephrectomized Rats, *Front. Pharmacol.* 8 (2017) 1–10. doi:10.3389/fphar.2017.00545.

[86] H. Zhao, Y. jun Liu, Z. rui Liu, D. dong Tang, X. wen Chen, Y. hua Chen, R. ning Zhou, S. qi Chen, H. xin Niu, Role of mitochondrial dysfunction in renal fibrosis promoted by hypochlorite-modified albumin in a remnant kidney model and protective effects of antioxidant peptide SS-31, *Eur. J. Pharmacol.* 804 (2017) 57–67. doi:10.1016/j.ejphar.2017.03.037.

[87] O.E. Aparicio-Trejo, E. Tapia, L.G. Sánchez-Lozada, J. Pedraza-Chaverri,

Mitochondrial bioenergetics, redox state, dynamics and turnover alterations in renal mass reduction models of chronic kidney diseases and their possible implications in the progression of this illness, *Pharmacol. Res.* 135 (2018) 1–11. doi:10.1016/j.phrs.2018.07.015.

[88] Y. Hui, M. Lu, Y. Han, H. Zhou, W. Liu, L. Li, R. Jin, Resveratrol improves mitochondrial function in the remnant kidney from 5/6 nephrectomized rats, *Acta Histochem.* 119 (2017) 392–399. doi:10.1016/j.acthis.2017.04.002.

[89] H.H. Szeto, S. Liu, Y. Soong, S. V. Seshan, L. Cohen-Gould, V. Manichev, L.C. Feldman, T. Gustafsson, Mitochondria Protection after Acute Ischemia Prevents Prolonged Upregulation of IL-1 β and IL-18 and Arrests CKD., *J. Am. Soc. Nephrol.* 28 (2017) 1437–1449. doi:10.1681/ASN.2016070761.

[90] M.T. Sweetwyne, J.W. Pippin, D.G. Eng, K.L. Hudkins, Y.A. Chiao, M.D. Campbell, D.J. Marcinek, C.E. Alpers, H.H. Szeto, P.S. Rabinovitch, S.J. Shankland, The mitochondrial- targeted peptide, SS-31, improves glomerular architecture in mice of advanced age, *Kidney Int.* 91 (2017) 1126–1145. doi:10.1016/j.kint.2016.10.036.

[91] L.H. Lash, D.A. Putt, S.J. Horky, R.K. Zalups, Functional and toxicological characteristics of isolated renal mitochondria: Impact of compensatory renal growth, *Biochem. Pharmacol.* 62 (2001) 383–395. doi:10.1016/S0006-2952(01)00673-6.

[92] J.L. Thomas, H. Pham, Y. Li, E. Hall, G.A. Perkins, S.S. Ali, H.H. Patel, P. Singh, Hypoxia-inducible factor-1 α activation improves renal oxygenation and mitochondrial function in early chronic kidney disease, *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 313 (2017) F282 LP-F290. doi:10.1152/ajprenal.00579.2016.

[93] E. Tapia, V. Soto, K.M. Ortiz-Vega, G. Zarco-Márquez, E. Molina-Jijón, M. Cristóbal- García, J. Santamaría, W.R. García-Niño, F. Correa, C. Zazueta, J. Pedraza-Chaverri, Curcumin induces Nrf2 nuclear translocation and prevents glomerular hypertension, hyperfiltration, oxidant stress, and the decrease in antioxidant enzymes in 5/6 nephrectomized rats, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013 (2012) 1–14. doi:10.1155/2012/269039.

[94] J. Trujillo, Y.I. Chirino, E. Molina-Jijón, A.C. Andérica-Romero, E. Tapia, J. Pedraza- Chaverri, Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: Recent findings., *Redox Biol.* 1 (2013) 448–456. doi:10.1016/j.redox.2013.09.003.

[95] B. Benipal, L.H. Lash, Influence of renal compensatory hypertrophy on

mitochondrial energetics and redox status, *Biochem. Pharmacol.* 81 (2011) 295–303. doi:10.1016/j.bcp.2010.10.010.

[96] R.J. Mailloux, J.R. Treberg, Protein S-glutathionylation links energy metabolism to redox signaling in mitochondria, *Redox Biol.* 8 (2016) 110–118. doi:10.1016/j.redox.2015.12.010.

[97] R.J. Mailloux, X. Jin, W.G. Willmore, Redox regulation of mitochondrial function with emphasis on cysteine oxidation reactions, *Redox Biol.* 2 (2014) 123–139. doi:10.1016/j.redox.2013.12.011.

[98] E. Molina-Jijón, E. Tapia, C. Zazueta, M. El Hafidi, Z.L. Zatarain-Barrón, R. Hernández-Pando, O.N. Medina-Campos, G. Zarco-Márquez, I. Torres, J. Pedraza-Chaverri, Curcumin prevents Cr(VI)-induced renal oxidant damage by a mitochondrial pathway, *Free Radic. Biol. Med.* 51 (2011) 1543–1557. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.07.018.

[99] E. Tapia, L.G. Sánchez-Lozada, W.R. García-Niño, E. García, a Cerecedo, F.E. García-Arroyo, H. Osorio, a Arellano, M. Cristóbal-García, M.L. Loredó, E. Molina-Jijón, J. Hernández-Damián, M. Negrette-Guzmán, C. Zazueta, S. Huerta-Yepez, J.L. Reyes, M. Madero, J. Pedraza-Chaverri, Curcumin prevents maleate-induced nephrotoxicity: Relation to hemodynamic alterations, oxidative stress, mitochondrial oxygen consumption and activity of respiratory complex I., *Free Radic. Res.* 48 (2014) 1342–54. doi:10.3109/10715762.2014.954109.

[100] J. Trujillo, L.F. Granados-Castro, C. Zazueta, A.C. Andérica-Romero, Y.I. Chirino, J. Pedraza-Chaverri, Mitochondria as a target in the therapeutic properties of curcumin, *Arch. Pharm. (Weinheim)*. 347 (2014) 873–884. doi:10.1002/ardp.201400266.

[101] L.M. Reyes-Fermín, S.H. Avila-Rojas, O.E. Aparicio-Trejo, E. Tapia, I. Rivero, J. Pedraza-Chaverri, The Protective Effect of Alpha-Mangostin against Cisplatin-Induced Cell Death in LLC-PK1 Cells is Associated to Mitochondrial Function Preservation, *Antioxidants*. 8 (2019) 133. doi:10.3390/antiox8050133.

[102] S.H. Avila-Rojas, E. Tapia, A. Briones-Herrera, O.E. Aparicio-Trejo, J.C. León- Contreras, R. Hernández-Pando, J. Pedraza-Chaverri, Curcumin prevents potassium dichromate (K₂Cr₂O₇)-induced renal hypoxia, *Food Chem. Toxicol.* 121 (2018) 472–482. doi:10.1016/j.fct.2018.09.046.

[103] W. Ding, H. Guo, C. Xu, B. Wang, M. Zhang, F. Ding, Mitochondrial reactive

oxygen species-mediated NLRP3 inflammasome activation contributes to aldosterone-induced renal tubular cells injury, *Oncotarget*. 7 (2016). doi:10.18632/oncotarget.8243.

[104] E. Molina-Jijón, O.E. Aparicio-Trejo, R. Rodríguez-Muñoz, J.C. León-Contreras, M. del Carmen Cárdenas-Aguayo, O.N. Medina-Campos, E. Tapia, L.G. Sánchez-Lozada, R. Hernández-Pando, J.L. Reyes, L. Arreola-Mendoza, J. Pedraza-Chaverri, The nephroprotection exerted by curcumin in maleate-induced renal damage is associated with decreased mitochondrial fission and autophagy, *BioFactors*. 42 (2016) 686–702. doi:10.1002/biof.1313.

[105] K.A. Nath, A.J. Croatt, T.H. Hostetter, Oxygen consumption and oxidant stress in surviving nephrons., *Am. J. Physiol*. 258 (1990) F1354-62.

[106] P. Wenzel, H. Mollnau, M. Oelze, E. Schulz, J.M.D. Wickramanayake, J. Müller, S. Schuhmacher, M. Hortmann, S. Baldus, T. Gori, R.P. Brandes, T. Münzel, A. Daiber, First evidence for a crosstalk between mitochondrial and NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in nitroglycerin-triggered vascular dysfunction., *Antioxid. Redox Signal*. 10 (2008) 1435–47. doi:10.1089/ars.2007.1969.

[107] A. Daiber, Redox signaling (cross-talk) from and to mitochondria involves mitochondrial pores and reactive oxygen species., *Biochim. Biophys. Acta*. 1797 (2010) 897–906. doi:10.1016/j.bbabi.2010.01.032.

[108] Y. Liu, Y. Wang, W. Ding, Y. Wang, Mito-TEMPO Alleviates Renal Fibrosis by Reducing Inflammation, Mitochondrial Dysfunction, and Endoplasmic Reticulum Stress, *Oxid. Med. Cell. Longev*. 2018 (2018) 1–13. doi:10.1155/2018/5828120.

[109] R. Koziel, H. Pircher, M. Kratochwil, B. Lener, M. Hermann, N. a Dencher, P. Jansen- Dürr, Mitochondrial respiratory chain complex I is inactivated by NADPH oxidase Nox4., *Biochem. J*. 452 (2013) 231–9. doi:10.1042/BJ20121778.

[110] H. Wang, X. Chen, Y. Su, P. Paueksakon, W. Hu, M.-Z. Zhang, R.C. Harris, T.S. Blackwell, R. Zent, A. Pozzi, P47(Phox) Contributes To Albuminuria and Kidney Fibrosis in Mice., *Kidney Int*. 87 (2015) 948–962. doi:10.1038/ki.2014.386.

[111] M. Sedeek, R. Nasrallah, R.M. Touyz, R.L. Hébert, NADPH oxidases, reactive oxygen species, and the kidney: friend and foe., *J. Am. Soc. Nephrol*. 24 (2013) 1512–8. doi:10.1681/ASN.2012111112.

[112] H. Watanabe, Y. Miyamoto, D. Honda, H. Tanaka, Q. Wu, M. Endo, T.

Noguchi, D. Kadowaki, Y. Ishima, S. Kotani, M. Nakajima, K. Kataoka, S. Kim-Mitsuyama, M. Tanaka, M. Fukagawa, M. Otagiri, T. Maruyama, p-Cresyl sulfate causes renal tubular cell damage by inducing oxidative stress by activation of NADPH oxidase., *Kidney Int.* 83 (2013) 582–92. doi:10.1038/ki.2012.448.

[113] A.M. Garrido, K.K. Griendling, NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling., *Mol. Cell. Endocrinol.* 302 (2009) 148–58. doi:10.1016/j.mce.2008.11.003.

[114] H.J. Kim, N.D. Vaziri, Contribution of impaired Nrf2-Keap1 pathway to oxidative stress and inflammation in chronic renal failure., *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 298 (2010) F662-71. doi:10.1152/ajprenal.00421.2009.

[115] N.D. Vaziri, Y. Bai, Z. Ni, Y. Quiroz, R. Pandian, B. Rodriguez-Iturbe, Intra-renal angiotensin II/AT1 receptor, oxidative stress, inflammation, and progressive injury in renal mass reduction., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 323 (2007) 85–93. doi:10.1124/jpet.107.123638.

[116] A. Görlach, E.Y. Dimova, A. Petry, A. Martínez-Ruiz, P. Hernansanz-Agustín, A.P. Rolo, C.M. Palmeira, T. Kietzmann, Reactive oxygen species, nutrition, hypoxia and diseases: Problems solved?, *Redox Biol.* 6 (2015) 372–385. doi:10.1016/j.redox.2015.08.016.

[117] A. Voulgaris, O. Marrone, M.R. Bonsignore, P. Steiropoulos, Chronic kidney disease in patients with obstructive sleep apnea. A narrative review., *Sleep Med. Rev.* 47 (2019) 74–89. doi:10.1016/j.smrv.2019.07.001.

[118] Y. Yuan, Y. Chen, P. Zhang, S. Huang, C. Zhu, G. Ding, B. Liu, T. Yang, A. Zhang, Mitochondrial dysfunction accounts for aldosterone-induced epithelial-to-mesenchymal transition of renal proximal tubular epithelial cells, *Free Radic. Biol. Med.* 53 (2012) 30–43. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.03.015.

[119] P.H.G.M. Willems, R. Rossignol, C.E.J. Dieteren, M.P. Murphy, W.J.H. Koopman, Redox Homeostasis and Mitochondrial Dynamics, *Cell Metab.* 22 (2015) 207–218. doi:10.1016/j.cmet.2015.06.006.

[120] H.M. Ni, J.A. Williams, W.X. Ding, Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control, *Redox Biol.* 4 (2015) 6–13. doi:10.1016/j.redox.2014.11.006.

[121] B. Westermann, Mitochondrial fusion and fission in cell life and death, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11 (2010) 872–884. doi:10.1038/nrm3013.

[122] T.M. Durcan, E.A. Fon, The three ' P ' s of mitophagy: PARKIN , modifications, Genes Dev. 29 (2015) 989–999. doi:10.1101/gad.262758.115.GENES.

[123] G. Nowak, D. Bakajsova, A.M. Samarel, Protein kinase C-epsilon activation induces mitochondrial dysfunction and fragmentation in renal proximal tubules., Am. J. Physiol. Renal Physiol. 301 (2011) F197-208. doi:10.1152/ajprenal.00364.2010.

[124] R.J. Youle, D.P. Narendra, Mechanisms of mitophagy, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 12 (2011) 9–14. doi:10.1038/nrm3028.

[125] S. Rovira-Llopis, C. Bañuls, N. Diaz-Morales, A. Hernandez-Mijares, M. Rocha, V.M. Victor, Mitochondrial dynamics in type 2 diabetes: Pathophysiological implications, Redox Biol. 11 (2017) 637–645. doi:10.1016/j.redox.2017.01.013.

[126] J.T. Norman, S. Hwang, L.G. Fine, D. Nephrology, T. Bradley, J. Am, Hypertrophy of renal mitochondria, J. Am. Soc. Nephrol. 1 (1990) 822–827.

[127] H. Zhao, Y. jun Liu, Z. rui Liu, D. dong Tang, X. wen Chen, Y. hua Chen, R. ning Zhou, S. qi Chen, H. xin Niu, Role of mitochondrial dysfunction in renal fibrosis promoted by hypochlorite-modified albumin in a remnant kidney model and protective effects of antioxidant peptide SS-31, Eur. J. Pharmacol. 804 (2017) 57–67. doi:10.1016/j.ejphar.2017.03.037.

[128] E. Ojuka, B. Andrew, N. Bezuidenhout, S. George, G. Maarman, H.P. Madlala, A. Mendham, P.O. Osiki, Measurement of β -oxidation capacity of biological samples by respirometry: a review of principles and substrates, Am. J. Physiol. Metab. 310 (2016) E715–E723. doi:10.1152/ajpendo.00475.2015.

[129] C.M. Palmeira, A.J. Moreno, Mitochondrial Bioenergetics. Methods an Protocol, First, London, 2012.

[130] D. Cano-Ramírez, C.E. Torres-Vargas, S. Guerrero-Castillo, S. Uribe-Carvajal, R. Hernández-Pando, J. Pedraza-Chaverri, M. Orozco-Ibarra, Effect of glycolysis inhibition on mitochondrial function in rat brain, J. Biochem. Mol. Toxicol. 26 (2012) 206–211. doi:10.1002/jbt.21404.

[131] A. Briones-Herrera, S.H. Avila-Rojas, O.E. Aparicio-Trejo, M. Cristóbal, J.C. León-Contreras, R. Hernández-Pando, E. Pinzón, J. Pedraza-Chaverri, L.G. Sánchez-Lozada, E. Tapia, Sulforaphane prevents maleic acid-induced

nephropathy by modulating renal hemodynamics, mitochondrial bioenergetics and oxidative stress, *Food Chem. Toxicol.* 115 (2018) 185–197. doi:10.1016/j.fct.2018.03.016.

[132] E.T. Chouchani, L. Kazak, M.P. Jedrychowski, G.Z. Lu, B.K. Erickson, J. Szpyt, K.A. Pierce, D. Laznik-Bogoslavski, R. Vetrivelan, C.B. Clish, A.J. Robinson, S.P. Gygi, B.M. Spiegelman, Mitochondrial ROS regulate thermogenic energy expenditure and sulfenylation of UCP1, *Nature.* 532 (2016) 112–116. doi:10.1038/nature17399.

[133] Aparicio-Trejo, O.E.; Tapia, E.; Molina-Jijón, E.; Medina-Campos, O.N.; Macías-Ruvalcaba, N.A.; León-Contreras, J.C.; Hernández-Pando, R.; García-Arroyo, F.E.; Cristóbal, M.; Sánchez-Lozada, L.G.; et al. Curcumin prevents mitochondrial dynamics disturbances in early 5/6 nephrectomy: Relation to oxidative stress and mitochondrial bioenergetics. *BioFactors* 2017, 43, 293–310.

[134] Tapia, E.; Zatarain-Barrón, Z.L.; Hernández-Pando, R.; Zarco-Márquez, G.; Molina-Jijón, E.; Cristóbal-García, M.; Pedraza-Chaverri, J. Curcumin reverses glomerular hemodynamic alterations and oxidant stress in 5/6 nephrectomized rats. *Phytomedicine* 2013, 20, 359–366.

[135] Tapia, E.; Soto, V.; Ortiz-Vega, K.M.; Zarco-Márquez, G.; Molina-Jijón, E.; Cristóbal-García, M.; Santamaría, J.; García-Niño, W.R.; Correa, F.; Zazueta, C.; et al. Curcumin induces Nrf2 nuclear translocation and prevents glomerular hypertension, hyperfiltration, oxidant stress, and the decrease in antioxidant enzymes in 5/6 nephrectomized rats. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013, 1–14.

[136] Chen, J.F.; Liu, H.; Ni, H.F.; Lv, L.L.; Zhang, M.H.; Zhang, A.H.; Tang, R.N.; Chen, P.S.; Liu, B.C. Improved mitochondrial function underlies the protective effect of pirfenidone against tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats. *PLoS ONE* 2013, 8, 1–15.

[137] Zhao, H.; Liu, Y.J.; Liu, Z.R.; Tang, D.D.; Chen, X.W.; Chen, Y.H.; Zhou, R.N.; Chen, S.Q.; Niu, H.X. Role of mitochondrial dysfunction in renal fibrosis promoted by hypochlorite-modified albumin in a remnant kidney model and protective effects of antioxidant peptide SS-31. *Eur. J. Pharmacol.* 2017, 804, 57–67.

[138] Hui, Y.; Lu, M.; Han, Y.; Zhou, H.; Liu, W.; Li, L.; Jin, R. Resveratrol improves mitochondrial function in the remnant kidney from 5/6 nephrectomized rats. *Acta Histochem.* 2017, 119, 392–399.

[139] Sun, L.; Yuan, Q.; Xu, T.; Yao, L.; Feng, J.; Ma, J.; Wang, L.; Lu, C.; Wang, D. Pioglitazone Improves Mitochondrial Function in the Remnant Kidney and Protects against Renal Fibrosis in 5/6 Nephrectomized Rats. *Front. Pharmacol.* 2017, 8, 1–10.

[140] Gnaiger, E. Mitochondrial Pathways and Respiratory Control an Introduction to OXPHOS Analysis. 2014. Available online: http://wiki.oroboros.at/images/f/fc/Gnaiger_2014_Mitochondr_Physiol_Network_MitoPathways.pdf (accessed on 6 June 2020).

[141] Sekine, T.; Endou, H. Solute Transport, Energy Consumption, and Production in the Kidney. In Seldin and Geibisch's *The Kidney*, 5th ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2013; pp. 143–175.

[142] Fedorova, L.V.; Tamirisa, A.; Kennedy, D.J.; Haller, S.T.; Budnyy, G.; Shapiro, J.I.; Malhotra, D. Mitochondrial impairment in the five-sixth nephrectomy model of chronic renal failure: Proteomic approach. *BMC Nephrol.* 2013, 14, 209–230. Available online: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3851543&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (accessed on 3 June 2020).

[143] Aparicio-Trejo, O.E.; Avila-Rojas, S.H.; Tapia, E.; Rojas-Morales, P.; León-Contreras, J.C.; Martínez-Klimova, E.; Hernández-Pando, R.; Gabriela Sánchez-Lozada, L.; Pedraza-Chaverri, J. Pedraza-Chaverri, Chronic impairment of mitochondrial bioenergetics and beta-oxidation promotes experimental AKI-to-CKD transition induced by folic acid. *Free Radic. Biol. Med.* 2020, 154, 18–32.

[144] Kang, P.T.; Zhang, L.; Chen, C.L.; Chen, J.; Green, K.B.; Chen, Y.R. Protein thiyl radical mediates S-glutathionylation of complex I. *Free Radic. Biol. Med.* 2012, 53, 962–973.

[145] Forkink, M.; Basit, F.; Teixeira, J.; Swarts, H.G.; Koopman, W.J.H.; Willems, P.H.G.M. Complex I and complex III inhibition specifically increase cytosolic hydrogen peroxide levels without inducing oxidative stress in HEK293 cells. *Redox Biol.* 2015, 6, 607–616.

[146] Aparicio-Trejo, O.E.; Reyes-Fermín, L.M.; Briones-Herrera, A.; Tapia, E.; León-Contreras, J.C.; Hernández-Pando, R.; Sánchez-Lozada, L.G.; Pedraza-Chaverri, J. Protective effects of N-acetyl-cysteine in mitochondria bioenergetics, oxidative stress, dynamics and S-glutathionylation alterations in acute kidney damage induced by folic acid. *Free Radic. Biol. Med.* 2019, 130, 379–396.

[147] Lash, L.H.; Putt, D.A.; Horky, S.J.; Zalups, R.K. Functional and toxicological characteristics of isolated renal mitochondria: Impact of compensatory renal growth. *Biochem. Pharmacol.* 2001, 62, 383–395.

[148] Quinlan, C.L.; Gerencser, A.A.; Treberg, J.R.; Brand, M.D. The mechanism of superoxide production by the antimycin-inhibited mitochondrial Q-cycle. *J. Biol. Chem.* 2011, 286, 31361–31372.

[149] Quinlan, C.L.; Perevoshchikova, I.V.; Hey-Mogensen, M.; Orr, A.L.; Brand, M.D. Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates. *Redox Biol.* 2013, 1, 304–312.

[150] Aparicio-Trejo, O.E.; Rojas-Morales, P.; Avila-Rojas, S.H.; León-Contreras, J.C.; Hernández-Pando, R.; Jiménez-Urbe, A.P.; Prieto-Carrasco, R.; Sánchez-Lozada, L.G.; Pedraza-Chaverri, J.; Tapia, E. Temporal alterations in mitochondrial β -oxidation and oxidative stress aggravate chronic kidney disease development in 5/6 nephrectomy induced renal damage. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 6512, doi:10.3390/ijms21186512.

[151] Brenner, B.M. Nephron adaptation to renal injury or ablation. *Am. J. Physiol.* 1985, 249, F324–F337, doi:10.1152/ajprenal.1985.249.3.f324.

[152] Aparicio-Trejo, O.E.; Tapia, E.; Molina-Jijón, E.; Medina-Campos, O.N.; Macías-Ruvalcaba, N.A.; León-Contreras, J.C.; Hernández-Pando, R.; García-Arroyo, F.E.; Cristóbal, M.; Sánchez-Lozada, L.G.; et al. Curcumin prevents mitochondrial dynamics disturbances in early 5/6 nephrectomy: Relation to oxidative stress and mitochondrial bioenergetics. *BioFactors* 2016, 43, 293–310, doi:10.1002/biof.1338.

[153] Ni, H.-M.; Williams, J.A.; Ding, W.-X. Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control. *Redox Biol.* 2015, 4, 6–13, doi:10.1016/j.redox.2014.11.006.

[154] Aparicio-Trejo, O.E.; Tapia, E.; Sánchez-Lozada, L.G.; Pedraza-Chaverri, J. Mitochondrial bioenergetics, redox state, dynamics and turnover alterations in renal mass reduction models of chronic kidney diseases and their possible implications in the progression of this illness. *Pharmacol. Res.* 2018, 135, 1–11, doi:10.1016/j.phrs.2018.07.015.

[155] Zhan, M.; Brooks, C.; Liu, F.; Sun, L.; Dong, Z. Mitochondrial dynamics:

Regulatory mechanisms and emerging role in renal pathophysiology. *Kidney Int.* 2013, 83, 568–581, doi:10.1038/ki.2012.441.

[156] Aparicio-Trejo, O.E.; Reyes-Fermín, L.M.; Briones-Herrera, A.; Tapia, E.; León-Contreras, J.C.; Hernández-Pando, R.; Sánchez-Lozada, L.G.; Pedraza-Chaverri, J. Protective effects of N-acetyl-cysteine in mitochondria bioenergetics, oxidative stress, dynamics and S-glutathionylation alterations in acute kidney damage induced by folic acid. *Free Radic. Biol. Med.* 2019, 130, 379–396, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.11.005.

[157] Reyes-Fermín, L.M.; Avila-Rojas, S.H.; Aparicio-Trejo, O.E.; Tapia, E.; Rivero, I.; Pedraza-Chaverri, J. The protective effect of alpha-mangostin against cisplatin-induced cell death in LLC-PK1 cells is associated to mitochondrial function preservation. *Antioxidants* 2019, 8, 133, doi:10.3390/antiox8050133.

[158] Ortega-Domínguez, B.; Aparicio-Trejo, O.E.; García-Arroyo, F.E.; León-Contreras, J.C.; Tapia, E.; Molina-Jijón, E.; Hernández-Pando, R.; Sánchez-Lozada, L.G.; Barrera-Oviedo, D.; Pedraza-Chaverri, J. Curcumin prevents cisplatin-induced renal alterations in mitochondrial bioenergetics and dynamic. *Food Chem. Toxicol.* 2017, 107, 373–385, doi:10.1016/j.fct.2017.07.018.

[159] Hwang, S.; Bohman, R.; Novas, P.; Norman, J.T.; Bradley, T.; Fine, L.G. Hypertrophy of renal mitochondria. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1990, 1, 822–827.

[160] Hostetter, T.H.; Olson, J.L.; Renke, H.G.; Venkatachalam, M.A.; Brenner, B.M. Hyperfiltration in remnant nephrons: A potentially adverse response to renal ablation. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2001, 12, 1315–1325.

[161] Taal, M.W.; Brenner, B.M. Adaptation to Nephron Loss and Mechanisms of Progression in Chronic Kidney Disease. In Brenner & Rector's *The Kidney*, 9th ed.; Skorecki, K., Chertow, G.M., Marsden, P.A., Taal, M.W., Yu, A.S.L., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2012; pp. 1918–1971

[162] Sinuani, I.; Averbukh, Z.; Gitelman, I.; Rapoport, M.J.; Sandbank, J.; Albeck, M.; Sredni, B.; Weissgarten, J. Mesangial cells initiate compensatory renal tubular hypertrophy via IL-10-induced TGF-beta secretion: Effect of the immunomodulator AS101 on this process. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2006, 291, F384–F394.

[163] Hauser, P.; Kainz, A.; Perco, P.; Bergmeister, H.; Mitterbauer, C.; Schwarz, C.; Regele, H.M.; Mayer, B.; Meyer, T.W.; Oberbauer, R. Transcriptional response in the unaffected kidney after contralateral hydronephrosis or nephrectomy. *Kidney*

Int. 2005, 68, 2497–2507.

[164] Wolf, G.; Ziyadeh, F.N. Molecular mechanisms of diabetic renal hypertrophy. *Kidney Int.* 1999, 56, 393–405.

[165] S. Granata, A. Dalla Gassa, P. Tomei, A. Lupo, G. Zaza, Mitochondria: a new therapeutic target in chronic kidney disease., *Nutr. Metab. (Lond)*. 12 (2015) 1–21. doi:10.1186/s12986-015-0044-z.

[166] Aparicio-Trejo, O.E.; Tapia, E.; Sánchez-Lozada, L.G.; Pedraza-Chaverri, J. Pedraza-Chaverri, Mitochondrial bioenergetics, redox state, dynamics and turnover alterations in renal mass reduction models of chronic kidney diseases and their possible implications in the progression of this illness. *Pharmacol. Res.* 2018, 135, 1–11.

[167] Rastogi, R.; Geng, X.; Li, F.; Ding, Y. NOX activation by subunit interaction and underlying mechanisms in disease. *Front. Cell. Neurosci.* 2017, 10, 1–13.

[168] de Cavanagh, E.M.V.; Inserra, F.; Ferder, M.; Ferder, L. From mitochondria to disease: Role of the renin-angiotensin system. *Am. J. Nephrol.* 2007, 27, 545–553.

[169] Mackenzie Walser. Progression of chronic renal failure in man. *Kidney Int.* 1990, 37, 1195–1210.

[170] Priyadarshi, A.; Periyasamy, S.; Burke, T.J.; Britton, S.L.; Malhotra, D.; Shapiro, J.I. Effects of reduction of renal mass on renal oxygen tension and erythropoietin production in the rat. *Kidney Int.* 2002, 61, 542–546.

[171] Siegel, N.J.; Devarajan, P.; van Why, S. Renal cell injury: Metabolic and structural alterations. *Pediatr. Res.* 1994, 36, 129–136.

[172] Basile, D.P.; Donohoe, D.; Roethe, K.; Osborn, J.L. Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillaries and influences long-term function. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 2001, 281, 887–899.

[173] Benipal, B.; Lash, L.H. Modulation of mitochondrial glutathione status and cellular energetics in primary cultures of proximal tubular cells from remnant kidney of uninephrectomized rats. *Biochem. Pharmacol.* 2013, 85, 1379–1388.

[174] Feng, B.; Meng, R.; Huang, B.; Bi, Y.; Shen, S.; Zhu, D. Silymarin protects against renal injury through normalization of lipid metabolism and mitochondrial

biogenesis in high fat-fed mice. *Free Radic. Biol. Med.* 2017, 110, 240–249.

[175] Szeto, H.H.; Liu, S.; Soong, Y.; Alam, N.; Prusky, G.T.; Seshan, S.V. Protection of mitochondria prevents high-fat diet induced glomerulopathy and proximal tubular injury. *Kidney Int.* 2016, 90, 997–1011.

[176] Kang, H.M.; Ahn, S.H.; Choi, P.; Ko, Y.A.; Han, S.H.; Chinga, F.; Park, A.S.D.; Tao, J.; Sharma, K.; Pullman, J.; et al. Defective fatty acid oxidation in renal tubular epithelial cells has a key role in kidney fibrosis development. *Nat. Med.* 2015, 21, 37–46.

[177] Benipal, B.; Lash, L.H. Influence of renal compensatory hypertrophy on mitochondrial energetics and redox status. *Biochem. Pharmacol.* 2011, 81, 295–303.

[177] Nath, K.A.; Croatt, A.J.; Hostetter, T.H. Oxygen consumption and oxidant stress in surviving nephrons. *Am. J. Physiol.* 1990, 258, F1354–F1362.

[178] Granata, S.; Masola, V.; Zoratti, E.; Scupoli, M.T.; Baruzzi, A.; Messa, M.; Sallustio, F.; Gesualdo, L.; Lupo, A.; Zaza, G. NLRP3 inflammasome activation in dialyzed chronic kidney disease patients. *PLoS ONE* 2015, 10, 1–16.

[179] Gai, Z.; Wang, T.; Visentin, M.; Kullak-Ublick, G.A.; Fu, X.; Wang, Z. Lipid accumulation and chronic kidney disease. *Nutrients* 2019, 11, 722.

[180] Chunsun, D.; Lawrence, P.K.; Youhua, L. *Animal Models of Kidney Diseases*. In *Sourcebook of Models for Biomedical Research*; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2008; pp. 657–664.

[181] Hamzaoui, M.; Djerada, Z.; Brunel, V.; Mulder, P.; Richard, V.; Bellien, J.; Guerrot, D. 5/6 nephrectomy induces different renal, cardiac and vascular consequences in 129/Sv and C57BL/6JRj mice.

[182] Becker, G.J.; Hewitson, T.D. Animal models of chronic kidney disease: Useful but not perfect. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2013, 28, 2432–2438.

[183] Tamaki, M.; Miyashita, K.; Wakino, S.; Mitsuishi, M.; Hayashi, K.; Itoh, H. Chronic kidney disease reduces muscle mitochondria and exercise endurance and its exacerbation by dietary protein through inactivation of pyruvate dehydrogenase. *Kidney Int.* 2014, 85, 1330–1339.

[184] Forbes, J.M.; Thorburn, D.R. Mitochondrial dysfunction in diabetic kidney disease. *Nat. Rev. Nephrol.* 2018, 14, 291–312.

[185] Mafra, D.; Gidlund, E.K.; Borges, N.A.; Magliano, D.C.; Lindholm, B.; Stenvinkel, P.; vonWalden, F. Bioactive food and exercise in chronic kidney disease: Targeting the mitochondria. *Eur. J. Clin. Investig.* 2018, 48, e13020.

[186] Hallan, S.; Sharma, K. The Role of Mitochondria in Diabetic Kidney Disease. *Curr. Diab. Rep.* 2016, 16, 1–9.

[187] Pedraza-Chaverri, J.; Sánchez-Lozada, L.G.; Osorio-Alonso, H.; Tapia, E.; Scholze, A. New Pathogenic Concepts and Therapeutic Approaches to Oxidative Stress in Chronic Kidney Disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016, 1–21.

[188] Afshinnia, F.; Rajendiran, T.M.; Soni, T.; Byun, J.; Wernisch, S.; Sas, K.M.; Hawkins, J.; Bellovich, K.; Gipson, D.; Michailidis, G.; et al. Impaired beta-Oxidation and Altered Complex Lipid Fatty Acid Partitioning with Advancing CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2018, 29, 295–306.

[189] Liu, Y.; Wang, Y.; Ding, W.; Wang, Y. Mito-TEMPO Alleviates Renal Fibrosis by Reducing Inflammation, Mitochondrial Dysfunction, and Endoplasmic Reticulum Stress. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2018, 1–13.

[190] Ahmad, N.A.; Armaly, Z.; Berman, S.; Jabour, A.; Aga-Mizrachi, S.; Mosenegro-Ornan, E.; Avital, A. L-Carnitine improves cognitive and renal functions in a rat model of chronic kidney disease. *Physiol. Behav.* 2016, 164, 182–188.

[191] Taal, M.W.; Brenner, B.M. Adaptation to Nephron Loss and Mechanisms of Progression in Chronic Kidney Disease. In Brenner & Rector's the Kidney, 9th ed.; Taal, M.W., Chertow, G.M., Marsden, P.A., Skorecki, K., Yu, A., Brenner, B.M., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2011; pp. 1918–1971.

[192] Hayslett, J.P.; Kashgarian, M.; Epstein, F.H. Functional correlates of compensatory renal hypertrophy. *J. Clin. Investig.* 1968, 47, 774–782, doi:10.1172/jci105772.

[193] Tabei, K.; Levenson, D.J.; Brenner, B.M. Early enhancement of fluid transport in rabbit proximal straight tubules after loss of contralateral renal excretory function. *J. Clin. Investig.* 1983, 72, 871–881, doi:10.1172/jci111058.

[194] Walser, M. Progression of chronic renal failure in man. *Kidney Int.* 1990, 37,

1195–1210.

[195] Priyadarshi, A.; Periyasamy, S.; Burke, T.J.; Britton, S.L.; Malhotra, D.; Shapiro, J.I. Effects of reduction of renal mass on renal oxygen tension and erythropoietin production in the rat. *Kidney Int.* 2002, 61, 542–546, doi:10.1046/j.1523-1755.2002.00140.x.

[196] Wai, T.; Langer, T. Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. *Trends Endocrinol. Metab.* 2016, 27, 105–117, doi:10.1016/j.tem.2015.12.001.

[197] Durcan, T.M.; Fon, E.A. The three ‘P’s of mitophagy: PARKIN, PINK1, and post-translational modifications. *Genes Dev.* 2015, 29, 989–999, doi:10.1101/gad.262758.115.

[198] Anzell, A.R.; Maizy, R.; Przyklenk, K.; Sanderson, T.H. Mitochondrial Quality Control and Disease: Insights into Ischemia-Reperfusion Injury. *Mol. Neurobiol.* 2017, 55, 2547–2564, doi:10.1007/s12035-017-0503-9.

[199] Lash, L.H.; Putt, D.A.; Horky, S.J.; Zalups, R.K. Functional and toxicological characteristics of isolated renal mitochondria: Impact of compensatory renal growth. *Biochem. Pharmacol.* 2001, 62, 383–395, doi:10.1016/s0006-2952(01)00673-6.

[200] Funk, J.A.; Schnellmann, R.G. Persistent disruption of mitochondrial homeostasis after acute kidney injury. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2012, 302, F853–F864, doi:10.1152/ajprenal.00035.2011.

[201] Fedorova, L.V.; Tamirisa, A.; Kennedy, D.J.; Haller, S.T.; Budnyy, G.; Shapiro, J.I.; Malhotra, D. Mitochondrial impairment in the five-sixth nephrectomy model of chronic renal failure: Proteomic approach. *BMC Nephrol.* 2013, 14, 209–230, doi:10.1186/1471-2369-14-209.

[202] Sun, L.; Yuan, Q.; Xu, T.; Yao, L.; Feng, J.; Ma, J.; Wang, L.; Lu, C.; Wang, D. Pioglitazone Improves Mitochondrial Function in the Remnant Kidney and Protects against Renal Fibrosis in 5/6 Nephrectomized Rats. *Front. Pharmacol.* 2017, 8, 1–10, doi:10.3389/fphar.2017.00545.

[203] Zhao, H.; Liu, Y.-; Liu, Z.-; Tang, D.-; Chen, X.-; Chen, Y.-; Zhou, R.-; Chen, S.-; Niu, H.-. Role of mitochondrial dysfunction in renal fibrosis promoted by hypochlorite-modified albumin in a remnant kidney model and protective effects of antioxidant peptide SS-31. *Eur. J. Pharmacol.* 2017, 804, 57–67, doi:10.1016/j.ejphar.2017.03.037.

[204] Chen, J.-F.; Liu, H.; Ni, H.-F.; Lv, L.-L.; Zhang, M.-H.; Zhang, A.-H.; Tang, R.-N.; Chen, P.-S.; Liu, B.-C. Improved mitochondrial function underlies the protective effect of pirfenidone against tubulointerstitial fibrosis in 5/6 Nephrectomized rats. *PLoS ONE* 2013, 8, 1–15, doi:10.1371/journal.pone.0083593.

[205] Kang, H.M.; Ahn, S.H.; Choi, P.; Ko, Y.-A.; Han, S.H.; Chinga, F.; Park, A.S.D.; Tao, J.; Sharma, K.; Pullman, J.; et al. Defective fatty acid oxidation in renal tubular epithelial cells has a key role in kidney fibrosis development. *Nat. Med.* 2014, 21, 37–46, doi:10.1038/nm.3762.

[206] Aparicio-Trejo, O.E.; Avila-Rojas, S.H.; Tapia, E.; Rojas-Morales, P.; León-Contreras, J.C.; Martínez-Klimova, E.; Hernán-dez-Pando, R.; Sánchez-Lozada, L.G.; Pedraza-Chaverri, J. Chronic impairment of mitochondrial bioenergetics and β -oxidation promotes experimental AKI-to-CKD transition induced by folic acid. *Free Radic. Biol. Med.* 2020, 154, 18–32, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2020.04.016.

[207] Zhao, Y.; Guo, Y.; Jiang, Y.; Zhu, X.; Liu, Y.; Zhang, X. Mitophagy regulates macrophage phenotype in diabetic nephropathy rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017, 494, 42–50, doi:10.1016/j.bbrc.2017.10.088.

[208] Xiao, L.; Xu, X.; Zhang, F.; Wang, M.; Xu, Y.; Tang, D.; Wang, J.; Qin, Y.; Liu, Y.; Tang, C.; et al. The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ ameliorated tubular injury mediated by mitophagy in diabetic kidney disease via Nrf2/PINK1. *Redox Biol.* 2017, 11, 297–311, doi:10.1016/j.redox.2016.12.022.

[209] Kaushal, G.P.; Shah, S.V. Autophagy in acute kidney injury. *Kidney Int.* 2016, 89, 779–791, doi:10.1016/j.kint.2015.11.021.

[210] Hostetter, T.H.; Olson, J.L.; Rennke, H.G.; Venkatachalam, M.A.; Brenner, B.M. Hyperfiltration in remnant nephrons: A potentially adverse response to renal ablation. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1981, 241, F85–F93, doi:10.1152/ajprenal.1981.241.1.f85.

[211] Hui, Y.; Lu, M.; Han, Y.; Zhou, H.; Liu, W.; Li, L.; Jin, R. Resveratrol improves mitochondrial function in the remnant kidney from 5/6 nephrectomized rats. *Acta Histochem.* 2017, 119, 392–399, doi:10.1016/j.acthis.2017.04.002.

[212] Jiang, M.; Bai, M.; Lei, J.; Xie, Y.; Xu, S.; Jia, Z.; Zhang, A. Mitochondrial dysfunction and the AKI-to-CKD transition. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2020, 319, F1105–F1116, doi:10.1152/ajprenal.00285.2020.

[213] Fontecha-Barriuso, M.; Martin-Sanchez, D.; Martinez-Moreno, J.; Monsalve, M.; Ramos, A.; Sanchez-Niño, M.; Ruiz-Ortega, M.; Ortiz, A.; Sanz, A. The Role of PGC-1 α and Mitochondrial Biogenesis in Kidney Diseases. *Biomolecules* 2020, 10, 347, doi:10.3390/biom10020347.

11. Índice de figuras

Figura	Página
Figura 1. Marcadores de función renal de los grupos experimentales	32
Figura 2. Daño renal crónico inducido por nefrectomía 5/6 (5/6Nx)	34
Figura 3. Parámetros respiratorios mitocondriales en la masa renal remanente	36
Figura 4. Correlaciones de Pearson entre cambios en parámetros energéticos y parámetros hemodinámicos	39
Figura 5. Cambios en los elementos del sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) y el potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$)	40
Figura 6. Estrés oxidativo en mitocondrias de la masa renal remanente	42
Figura 7. Micrografías representativas de microscopía electrónica de mitocondrias de células epiteliales tubulares en diferentes momentos	44
Figura 8. Progresión temporal del daño renal	46
Figura 9. Disminución progresiva de la biogénesis mitocondrial en masa renal remanente	48
Figura 10. Alteración de la dinámica mitocondrial en masa renal remanente	50
Figura 11. Micrografías ultraestructurales representativas de células epiteliales de túbulos contorneados proximales	51
Figura 12. Alteración de marcadores de mitofagia y autofagia en masa remanente	52
Figura 13. Evolución temporal del cambio patológico observado en riñón remanente tras nefrectomía 5/6 (5/6Nx)	57
Figura 14. Evolución de la biogénesis mitocondrial y cambios de dinámica en el intervalo de tiempo entre el día 2 y el día 28 después de la nefrectomía 5/6 (5/6Nx)	62