



Universidad Nacional de Rosario
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas
Departamento de Ciencias Fisiológicas
Área Farmacología

Tesis de Doctorado

**Excreción urinaria del transportador de aniones orgánicos 5
(Oat5) en nefrotoxicidad inducida por cisplatino.
Potencial biomarcador temprano de esta patología.**

Autora: Lic. Romina Paula Bulacio

Directora: Prof. Dra. Adriana Mónica Torres

Rosario, Argentina

2015

**Excreción urinaria del transportador de aniones orgánicos 5
(Oat5) en nefrotoxicidad inducida por cisplatino.
Potencial biomarcador temprano de esta patología.**

Romina Paula Bulacio

Licenciada en Biotecnología

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Área Farmacología del Departamento de Ciencias Fisiológicas, dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre los años 2011 y 2015, bajo la dirección de la Prof. Dra. Adriana Mónica Torres.

Agradecimientos:

- ✦ *En primer lugar, quisiera agradecer especialmente a la Dra. Adriana Mónica Torres, quien ha dirigido este trabajo de Tesis con tanta dedicación y cariño, y quien ha contribuido a mi formación desde la investigación y la docencia.*
- ✦ *A mis compañeras Hermi, Mara y Ana, con quienes hemos compartido mucho más que el trabajo en el día a día, y me han brindado su apoyo constante.*
- ✦ *Al Prof. H. Endou y al Prof. N. Anzai (Department of Pharmacology and Toxicology, Kyorin University School of Medicine, Tokyo, Japan) por ceder tan gentilmente el anticuerpo anti-Oat5 con el que se realizó este trabajo de Tesis.*
- ✦ *A la Sra. Alejandra Martínez, del Área de Morfología de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la U.N.R., por su colaboración en los estudios histológicos.*
- ✦ *También quisiera agradecer a mis compañeros del Área de Farmacología de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la U.N.R., por los lindos momentos compartidos.*
- ✦ *Quisiera expresar mi agradecimiento al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y a la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la U.N.R., por brindarme apoyo económico para realizar este trabajo de Tesis.*
- ✦ *A mis amigas queridas, Marina, Estefi, Male, Juli, Vero, Nani y Ro, por estar en las buenas y en las malas.*
- ✦ *A mi compañero de rutas Ernesto, por su abrazo, su música y su amor.*
- ✦ *A mis padres Raúl y Patricia, y a mi hermano Lautaro, por todo el cariño que me han brindado siempre y cuando más lo necesité.*

✦ Parte de los resultados presentados en este trabajo de Tesis han sido publicados en Revistas extranjeras con referato y presentados en Congresos Nacionales e Internacionales. A continuación se encuentra el detalle de los mismos:

Resultados publicados en Revistas Científicas

1. Bulacio RP, Torres AM (2013) Organic anion transporter 5 (Oat5) renal expression and urinary excretion in rats treated with cisplatin: a potential biomarker of cisplatin-induced nephrotoxicity. *Arch. Toxicol.* 87:1953-62. ISSN: 0340-5761.

2. Bulacio RP, Torres AM (2014) Time course of organic anion transporter 5 (Oat5) urinary excretion in rats treated with cisplatin: a novel urinary biomarker for early detection of drug-induced nephrotoxicity. *Arch. Toxicol.* DOI: 10.1007/s00204-014-1345-0. ISSN: 1432-0738.

3. Bulacio RP, Torres AM (2015) Organic anion transporter 5 (Oat5) urinary excretion is a specific biomarker of kidney injury. Evaluation of urinary excretion of exosomal Oat5 after N-acetylcysteine prevention of cisplatin-induced nephrotoxicity. *Enviado a publicar*

Resultados presentados en Congresos Nacionales

1- *Excreción urinaria del transportador de aniones orgánicos 5 (Oat5) en ratas tratadas con cisplatino.* Bulacio RP, Torres AM. **XVII Congreso Argentino de Toxicología**, septiembre de 2011, Tandil, Buenos Aires. Resumen publicado en Acta Toxicológica Argentina 19 (Supl), 78-79, 2011; ISSN 0327-9286.

Presentado también en las **V Jornadas de Ciencia y Técnica, U.N.R.**, diciembre de 2011, Rosario, Santa Fe.

2- *Efecto de diferentes dosis de cisplatino sobre la excreción urinaria y expresión renal de Oat5 en ratas.* Bulacio RP, Torres AM. **XLIII Reunión de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental**, noviembre de 2011, San Miguel de Tucumán, Tucumán. Resumen publicado en el libro de resúmenes SAFE 2011, 30; ISSN 2250-4079.

3- *Alteraciones en la excreción urinaria del transportador de aniones orgánicos 5 (Oat5) en ratas con insuficiencia renal aguda inducida por cisplatino.* Bulacio RP, Torres AM. **LVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica - Reunión Sociedad Argentina de Fisiología 2011 - II Congreso Nacional AACYTAL - IV Reunión Científica Regional por el Bienestar del Animal del Laboratorio y el Progreso de la Ciencia**, noviembre de 2011, Mar del Plata, Buenos Aires. Resumen publicado en *Medicina* 71 (Supl III): 315, 2011; ISSN 0025.7680.

4- *Seguimiento de la evolución del daño renal inducido por cisplatino mediante la excreción urinaria de Oat5 en ratas.* Bulacio RP, Torres AM. **XLIV Reunión de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental**, noviembre de 2012, Ciudad de Mendoza, Mendoza. Resumen publicado en el Libro de Resúmenes SAFE 2012, 30; ISSN 2250-4079.

5- *Excreción urinaria del transportador de aniones orgánicos 5 (Oat5o) en ratas tratadas con cisplatino y con N-acetilcisteína. Validación de Oat5o como biomarcador de daño renal inducido por cisplatino.* Bulacio RP, Torres AM. **XVII Congreso Argentino de Toxicología**, septiembre de 2013, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Buenos Aires. Resumen publicado en *Acta Toxicológica Argentina* 21 (Supl): 93; ISSN 0327-9286.

6- *Expresión renal del transportador de aniones orgánicos 5 en ratas tratadas con cisplatino. Efecto del pretratamiento con N-acetilcisteína.* Bulacio RP, Torres AM. **LVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Fisiología, XLV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología**, noviembre de 2013, Mar del Plata, Buenos Aires. Resumen publicado en *Medicina* 73 (Supl III): 280, 2013; ISSN 0025.7680.

7- *Expresión renal y excreción en exosomas urinarios del transportador de aniones orgánicos 5 (Oat5) y de la proteína Caveolina 2 (Cav2) en ratas tratadas con cisplatino.* Bulacio RP, Torres AM. **LIX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), LXII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI)**, noviembre de 2014, Mar del Plata, Buenos Aires. Resumen publicado en *Medicina* 74 (Supl III): 256, 2014. ISSN 0025-7680.

Este trabajo ha sido reconocido con el **Primer premio Sesión Nefrología. Premios Póster SAIC 2014.**

Resultados presentados en Congresos Internacionales

1- *Time course of renal function and urinary excretion of Oat5 in rats treated with cisplatin.* Bulacio RP, Torres AM. **2da Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas (RICIFA 2012).** VI FORO CISDEM, diciembre de 2012, Rosario, Santa Fe. Resumen publicado en AAPSP PharmSciTech; eISSN 1530-9932. DOI 10.1208/s12249-014-0082-2.

2- *Urinary excretion and renal expression of caveolin-2 in rats with cisplatin-induced acute kidney injury.* Bulacio RP, Torres AM. **3ra Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas (RICIFA 2014),** septiembre de 2014, Ciudad de Córdoba, Córdoba. Resumen publicado en International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research (IJPSR), Conference Proceeding (2015), 188; ISSN 2320-5148.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	I
RESUMEN.....	II
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 CISPLATINO.....	1
1.1.1 Introducción a los fármacos utilizados en la quimioterapia antineoplásica.....	1
1.1.2 Clasificación de los fármacos antineoplásicos.....	1
1.1.3 Introducción al cisplatino: estructura química y su descubrimiento.....	3
1.1.4 Mecanismos de acción del cisplatino.....	3
1.1.5 Formas de administración y farmacocinética del cisplatino.....	5
1.1.6 Regímenes de dosificación del cisplatino.....	6
1.1.7 Efectos adversos del cisplatino.....	7
1.1.8 Nefrotoxicidad inducida por cisplatino.....	9
1.1.8.1. Conversión del cisplatino a una nefrotoxina en las células de los túbulos proximales.....	9
1.1.8.2 Mecanismos involucrados en la patogénesis de la nefrotoxicidad causada por el cisplatino.....	10
1.1.8.3 Características de la insuficiencia renal aguda inducida por el cisplatino.....	12
1.1.8.4 Relación entre la nefrotoxicidad y la dosis empleada del cisplatino.....	13
1.1.8.5 Formas de prevenir la nefrotoxicidad inducida por cisplatino.....	14
1.1.8.5.1 Disminución de la nefrotoxicidad por diferentes protocolos de hidratación del paciente tratado con cisplatino.....	14
1.1.8.5.2 Disminución de la nefrotoxicidad inducida por cisplatino por diferentes compuestos.....	15
1.1.8.6 Compuestos con propiedades antioxidantes.....	16
1.1.8.6.1 N-acetilcisteína como agente renoprotector de la nefrotoxicidad inducida por cisplatino.....	16
1.2 TRANSPORTADORES RENALES DE ANIONES ORGÁNICOS.....	18
1.2.1 Transporte de iones orgánicos en el riñón.....	18

1.2.2.1 Sistema de transporte de aniones orgánicos en las células de túbulo proximal renal.....	19
1.2.2 Transportador de aniones orgánicos 5 (Oat5).....	21
1.3 BIOMARACADORES DE INSUFICIENCIA RENAL AGUDA.....	24
1.3.1 Definición de insuficiencia renal aguda y sus clasificaciones.....	24
1.3.2 Definición de biomarcador.....	26
1.3.3 Biomarcadores de insuficiencia renal aguda convencionales.....	26
1.3.4 Nuevos biomarcadores de insuficiencia renal aguda.....	29
1.3.5 La orina como fuente de biomarcadores.....	33
1.3.6 Empleo de exosomas urinarios como material de partida para el descubrimiento de biomarcadores urinarios de insuficiencia renal aguda.....	34
2. OBJETIVOS.....	36
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
3.1 MÉTODOS.....	38
3.1.1 Animales de experimentación.....	38
3.1.2 Grupos experimentales.....	38
3.1.2.1 Grupos experimentales para la evaluación de la excreción urinaria de Oat5 en un modelo de insuficiencia renal aguda inducida por cisplatino.....	38
3.1.2.2 Grupos experimentales para la evaluación de la función renal, la excreción urinaria y la expresión renal de Oat5 en ratas tratadas con diferentes dosis de cisplatino.....	39
3.1.2.3 Grupos experimentales para el seguimiento de la excreción urinaria y la expresión renal de Oat5 en el tiempo en un modelo de insuficiencia renal aguda inducida por cisplatino.....	39
3.1.2.4 Grupos experimentales para la evaluación del efecto de la N-acetilcisteína sobre la excreción urinaria y la expresión renal de Oat5 en ratas con nefrotoxicidad inducida por cisplatino.....	40
3.1.3 Obtención de muestras y su posterior procesamiento.....	41
3.1.4 Monitoreo de la pérdida de peso con los diferentes tratamientos.....	41
3.1.5 Determinaciones analíticas.....	42
3.1.5.1 Determinación de la concentración plasmática de urea.....	42

3.1.5.2 Determinación de la concentración de creatinina en muestras de plasma y orina.....	42
3.1.5.3 Determinación de la concentración de glucosa en orina.....	42
3.1.5.4 Determinación de la concentración de proteínas totales en orina.....	43
3.1.5.5 Determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina en orina.....	43
3.1.5.6 Determinación de la concentración de proteínas en tejido renal.....	43
3.1.6 Estudios histopatológicos y de inmunohistoquímica.....	44
3.1.6.1 Estudios histopatológicos.....	45
3.1.6.2 Estudios de inmunohistoquímica.....	46
3.1.7 Estimación de la velocidad de filtración glomerular mediante la determinación del <i>clearance</i> renal de creatinina.....	46
3.1.7.1 Empleo de jaulas metabólicas para estudios de <i>clearance</i> renal de creatinina.....	46
3.1.7.2 Estimación del <i>clearance</i> renal de creatinina.....	47
3.1.8 Análisis de la excreción urinaria y de la expresión renal de Oat5.....	48
3.1.8.1 Preparación de homogenados y de membranas apicales de tejido renal.....	48
3.1.8.2 Aislamiento de exosomas urinarios.....	50
3.1.8.3 Estudios de los niveles de Oat5 en tejido renal, en orina y en exosomas urinarios mediante <i>Western blotting</i>	51
3.2 MATERIALES.....	53
3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	53
4. RESULTADOS	54
4.1 EXCRECIÓN URINARIA DE OAT5 EN UN MODELO DE INSUFICIENCIA RENAL AGUDA INDUCIDA POR CISPLATINO.....	54
4.1.1 Caracterización del modelo de insuficiencia renal aguda inducida por cisplatino.....	54
4.1.2 Evaluación de la excreción urinaria de Oat5 en el modelo de insuficiencia renal aguda inducida por cisplatino.....	59
4.2 EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN RENAL, LA EXCRECIÓN URINARIA Y LA EXPRESIÓN RENAL DE OAT5 EN RATAS TRATADAS CON DIFERENTES DOSIS DE CISPLATINO.....	62

4.2.1 Evaluación de la función renal en ratas tratadas con diferentes dosis de cisplatino.....	62
4.2.2 Evaluación de la excreción urinaria de Oat5 en ratas tratadas con diferentes dosis de cisplatino.....	66
4.2.3 Expresión renal de Oat5 en ratas tratadas con diferentes dosis de cisplatino.....	67
4.2.3.1 Estudios de la expresión renal de Oat5 mediante <i>Western blotting</i>	67
4.2.3.2 Estudios de la expresión renal de Oat5 mediante inmunohistoquímica.....	68
4.3 SEGUIMIENTO DE LA EXCRECIÓN URINARIA Y EXPRESIÓN RENAL DE OAT5 EN EL TIEMPO EN UN MODELO DE INSUFICIENCIA RENAL AGUDA INDUCIDA POR CISPLATINO.....	71
4.3.1 Evolución temporal de la función renal en ratas con un cuadro de insuficiencia renal aguda inducida por cisplatino.....	71
4.3.2 Evolución temporal de la excreción urinaria de Oat5 en ratas con insuficiencia renal aguda inducida por cisplatino.....	77
4.3.3 Evolución temporal de la expresión renal de Oat5 en ratas con insuficiencia renal aguda inducida por cisplatino.....	78
4.3.3.1 Análisis de la expresión renal de Oat5 mediante <i>Western blotting</i>	78
4.3.3.2 Análisis de la expresión renal de Oat5 mediante inmunohistoquímica.....	79
4.4 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA N-ACETILCISTEÍNA SOBRE LA EXCRECIÓN URINARIA Y EXPRESIÓN RENAL DE OAT5 EN RATAS CON NEFROTOXICIDAD INDUCIDA POR CISPLATINO.....	80
4.4.1 Caracterización del efecto renoprotector de la N-acetilcisteína sobre la nefrotoxicidad inducida por cisplatino.....	80
4.4.2 Efecto de la de la N-acetilcisteína sobre la excreción urinaria de Oat5 en ratas con nefrotoxicidad inducida por cisplatino.....	85
4.4.2.1 Análisis de la abundancia de Oat5 en orina total.....	85
4.4.2.2 Análisis de la abundancia de Oat5 en exosomas urinarios.....	86
4.4.3 Efecto de la de la N-acetilcisteína sobre la expresión renal de Oat5 en ratas con nefrotoxicidad inducida por cisplatino.....	88
4.4.3.1 Análisis de la expresión renal de Oat5 mediante <i>Western blotting</i>	88

4.4.3.2 Análisis de la expresión renal de Oat5 mediante inmunohistoquímica.....	89
5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	90
5.1 EXCRECIÓN URINARIA DE OAT5 EN UN MODELO DE INSUFICIENCIA RENAL AGUDA INDUCIDA POR CISPLATINO.....	90
5.2 EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN RENAL, LA EXCRECIÓN URINARIA Y LA EXPRESIÓN RENAL DE OAT5 EN RATAS TRATADAS CON DIFERENTES DOSIS DE CISPLATINO.....	95
5.3 SEGUIMIENTO DE LA EXCRECIÓN URINARIA Y LA EXPRESIÓN RENAL DE OAT5 EN EL TIEMPO EN UN MODELO DE INSUFICIENCIA RENAL AGUDA INDUCIDA POR CISPLATINO.....	101
5.4 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA N-ACETILCISTEÍNA SOBRE LA EXCRECIÓN URINARIA Y LA EXPRESIÓN RENAL DE OAT5 EN RATAS CON NEFROTOXICIDAD INDUCIDA POR CISPLATINO.....	107
5.5 CONCLUSIONES FINALES.....	111
6. BIBLIOGRAFÍA.....	115

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ANOVA: análisis de la variancia

AO: anión orgánico

CMV: cuerpos multivesiculares

Ctr1: proteína transportadora de cobre 1

DTT: ditioneitol

ERO: especies reactivas del oxígeno

GSH: glutatión reducido

HE: hematoxilina-eosina

HRP: peroxidasa de rabanito

IRA: insuficiencia renal aguda

Kim-1: molécula de injuria renal 1

Mg/EGTA: magnesio/ ácido etilenglicol-bis-(β-aminoetiléter) N, N, N', N'-tetraacético

Na⁺/K⁺-ATPasa: sodio-potasio adenosinatrifosfatasa

NAC: N-acetilcisteína

NAG: N-acetil-β-glucosaminidasa

NGAL: lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos

NTA: necrosis tubular aguda

OAT: transportadores de aniones orgánicos

Oat1: transportador de aniones orgánicos 1

Oat3: transportador de aniones orgánicos 3

Oat5: transportador de aniones orgánicos 5

Oct2: transportador de cationes orgánicos 2

PBST: buffer fosfato salino con Tween 20

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo

SDS: detergente dodecil sulfato sódico

S.E.M: error estándar medio

Tris: 2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol

VGF: velocidad de filtración glomerular

Vo: volumen minuto de orina

t_{1/2}: tiempo de vida media

RESUMEN

La insuficiencia renal aguda (IRA) es un síndrome clínico complejo que se caracteriza por una rápida e importante disminución de la función excretora del riñón. A pesar de los avances en el campo de la nefrología en los últimos años, su incidencia sigue siendo preocupantemente alta. Los marcadores que tradicionalmente se emplean para diagnosticar a la IRA, tales como los niveles plasmáticos de urea y creatinina, resultan poco sensibles y específicos, y sus valores se encuentran alterados recién cuando ya existe un significativo daño renal. A consecuencia de esto surge la necesidad de hallar nuevos biomarcadores de daño que permitan realizar un diagnóstico más temprano de la IRA, para mejorar así el pronóstico del paciente.

El transportador de aniones orgánicos 5, Oat5 (Slc22a19), se expresa exclusivamente en riñón en la membrana apical de las células de los túbulos proximales, principalmente en la región S3. Nuestro grupo ha sido pionero en la detección de Oat5 en orina. A raíz de ello, posteriores estudios demostraron que la excreción urinaria de Oat5 podría ser considerado como un novedoso biomarcador temprano de daño renal en modelos de IRA isquémica e inducida por cloruro mercúrico.

El cisplatino (cis-diaminodicloroplatino II) es un fármaco antineoplásico ampliamente utilizado en la actualidad para el tratamiento de una gran variedad de tumores sólidos. A pesar de su gran efectividad, su uso muchas veces se ve limitado por la nefrotoxicidad que este fármaco produce, principalmente en forma de IRA.

En base a todo lo expuesto entonces, el objetivo de este trabajo de Tesis consistió en evaluar si los niveles urinarios de Oat5 también podrían ser utilizados como un biomarcador temprano de daño renal de IRA inducida por cisplatino.

En una primera instancia, se analizó el comportamiento de la excreción urinaria de Oat5 en ratas Wistar macho adultas tratadas con una dosis nefrotóxica de cisplatino de 10 mg/kg p.c., i.p., con dos días de tratamiento. Con ello, se pudo corroborar el desarrollo de un cuadro de IRA, ya que parámetros tradicionales utilizados para analizar la función renal se hallaron significativamente modificados en los animales tratados. Por otra parte, los niveles de Oat5 en orina se encontraron notablemente aumentados en el grupo tratado con respecto a los animales controles. En base a estos últimos resultados, la excreción urinaria de Oat5 podría ser propuesta como un marcador de daño renal en IRA inducida por cisplatino.

En estudios dosis-respuesta, se pudo observar que la excreción urinaria de Oat5 aumentó de manera dosis-dependiente de cisplatino, y que además se halló incrementada a

una dosis tan baja como ser de 1 mg/kg p.c., i.p. del antineoplásico, dos días luego de su administración, cuando aún no se evidenciaban otro tipo de alteraciones renales que se verían manifestadas a mayores tiempos de tratamiento.

El comportamiento de la excreción urinaria de Oat5 también fue analizada en el tiempo luego de la administración del cisplatino, para intentar establecer una relación con la progresión del daño renal en un modelo de IRA inducida por dicho antineoplásico. Al respecto, pudo evidenciarse que los niveles de Oat5 en orina aumentaron a los dos días de tratamiento, antes de que se observaran alteraciones en parámetros tradicionales indicadores de daño renal. Sin embargo, los niveles urinarios de dicho transportador no acompañaron a los cambios observados en el tiempo en la función renal. Estos resultados entonces estarían indicando que la excreción urinaria de Oat5 resultaría un biomarcador altamente sensible y temprano de disfunción renal ocasionado por la administración de cisplatino, pero no resultaría útil para realizar un seguimiento de las modificaciones de la función renal en el tiempo en la IRA inducida por cisplatino.

Luego, se evaluó si los niveles de Oat5 en orina son sensibles a las modificaciones del estrés oxidativo y/o restauración de la función renal en animales con nefrotoxicidad inducida por cisplatino. Para ello, se analizó el efecto de la N-acetilcisteína (NAC), un compuesto con propiedades antioxidantes, sobre la excreción urinaria de Oat5 en ratas tratadas con cisplatino. En dichos experimentos, pudo observarse que en los animales cotratados con el antineoplásico y la NAC no se evidenció el importante incremento en la excreción urinaria de Oat5 hallado en los animales tratados sólo con cisplatino.

Por otra parte, en posteriores experimentos se detectó por primera vez a Oat5 en exosomas urinarios, lo que postula a la vía de excreción exosomal como una de las principales vías involucradas en la eliminación de Oat5 por orina.

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis entonces, se logró caracterizar y aportar mayores conocimientos al comportamiento de la excreción urinaria de Oat5 ante el desarrollo de daño renal causado por un agente nefrotóxico, y permitiría así postular a los niveles urinarios de Oat5 como un novedoso biomarcador temprano y no invasivo de IRA inducida por cisplatino.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CISPLATINO

1.1.1 Introducción a los fármacos utilizados en la quimioterapia antineoplásica

El cáncer es un conjunto de enfermedades que se caracteriza por la presencia de células que han atravesado cambios que producen fallas en los mecanismos de control encargados de regular la diferenciación y proliferación celular. Una proliferación celular excesiva puede conducir a la invasión de tejidos vecinos, a la compresión de nervios, vasos, etc. y a la migración de estas células hacia otros territorios donde aún continuarán proliferando.

Los fármacos utilizados para el tratamiento de las enfermedades neoplásicas son conocidos como agentes antineoplásicos o citostáticos, y son empleados para el tratamiento de tumores malignos en los casos donde la cirugía o la radioterapia no son una posibilidad o han resultado inefectivas. Estos fármacos pueden ser también utilizados en conjunto con la cirugía y la radioterapia, o pueden formar parte de un tratamiento inicial. Vale destacar que la terapia con drogas antineoplásicas puede resultar positiva sólo en algunos tipos de tumores y por ende también pueden ser empleados como paliativos de la sintomatología o para prolongar la vida en otros casos (Flórez, 2008; Sweetman, 2009).

1.1.2. Clasificación de los fármacos antineoplásicos

Los antineoplásicos son fármacos diversos en cuanto a estructura química y mecanismo de acción. Todos ellos tienen en común la capacidad de alterar el ciclo celular, lo cual provoca la muerte de las células por disminuir la capacidad de proliferación. Entre la gran variedad existente, se los suele agrupar de la siguiente manera:

- *Fármacos alquilantes y complejos de coordinación con platino.* Entre los fármacos alquilantes más utilizados en la actualidad podemos mencionar a las mostazas nitrogenadas (mecloretamina, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán, clorambucilo, etc.), las nitrosoureas (carmustina, estreptozocina, bendamustina, etc.), las etileniminas y metilmelaminas (altretamina, tiotepa), los alquilsulfonatos (busulfán), los triazenos (dacarbazina, temozolomida) y las metilhidrazinas (procarbazina).

Por otro lado están los complejos de coordinación con platino que por su semejanza en los mecanismos de acción y resistencia a los compuestos alquilantes generalmente se los suele encontrar agrupados con ellos. En este grupo de fármacos podemos encontrar al **cisplatino**, carboplatino y oxaliplatino.

- *Fármacos antimetabolitos.* Entre ellos podemos nombrar a los análogos del ácido fólico (metrotexato, premetexed), los análogos de pirimidinas (análogos del uracilo: ej. 5-fluorouracilo, análogos de la citocina: citarabina), los análogos de purinas (la 6-mercaptopurina y la 6-tioguanina son los análogos azufrados de la hipoxantina y la guanina, respectivamente), entre otros.

- *Productos naturales.* En este grupo se encuentran los alcaloides de la vinca (vinblastina, vincristina, vinorelbina) y los taxanos (paclitaxel, docetaxel) que actúan dañando a los microtúbulos. También forman parte de este grupo los análogos de la camptotecina, cuyo mecanismo de acción es inhibir la topoisomerasa I (topotecán, irinotecán), los antibióticos (como ser actinomicina D, antraciclinas, doxorubicina, etc.) y las epipodofilotoxinas (etopósido, tenipósido).

- *Fármacos con diferentes mecanismos de acción.* Fármacos tales como la bleomicina, mitomicina, mitotano, trabectedina y enzimas como la L-asparaginasa se hallan en este grupo. También los fármacos inductores de la diferenciación, inhibidores de la tirosinquinasa, inhibidores del proteasoma, modificadores de la respuesta biológica, inmunomoduladores y anticuerpos monoclonales (Brunton y Col., 2012; Salinas, 2005; Flórez, 2008).

Vale la pena destacar que en la terapia antineoplásica se suele administrar en conjunto o de manera sucesiva más de un tipo de fármaco para evitar el fracaso de la terapia por adquisición de resistencia. Esto se debe a que cuando un determinado tipo de tumor se trata con un único fármaco ejerce una presión selectiva sobre éste. Las células sensibles son destruidas, pero sin embargo existe una subpoblación de ellas que son resistentes a la terapia producto de alguna mutación. A causa de esto último, dichas células sobreviven y son capaces de proliferar. Un tratamiento plurifarmacológico, por lo tanto, responde a las modificaciones bioquímicas y cinéticas que sufren las células tumorales (Flórez, 2008).

1.1.3 Introducción al cisplatino: estructura química y su descubrimiento

El cisplatino, también conocido como cis-diaminodicloroplatino II [$\text{cis-PtCl}_2(\text{NH}_3)_2$], es un compuesto inorgánico que pertenece al grupo de fármacos que son complejos de coordinación con platino. Es una de las drogas antineoplásicas más utilizadas en la actualidad para el tratamiento de una gran variedad de tumores sólidos, como ser de vejiga, de testículo, de ovario, de cabeza y cuello, de pulmón, de esófago, de cuello uterino, de mama y de colon, entre muchos otros. Además, el cisplatino sensibiliza a las células tumorales a la radioterapia y actúa mejorando el control de algunos tumores avanzados localizados si se lo administra junto con la radiación (Miller y Col., 2010; Pabla y Dong, 2008, Yao y Col., 2007; Brunton y Col., 2012).

El cisplatino es un compuesto de coordinación metálico, donde el átomo de platino se halla en estado de oxidación +2 formando un complejo planar con dos átomos de cloro en posición *cis* y dos grupos amino (ver *Figura 1.1*).

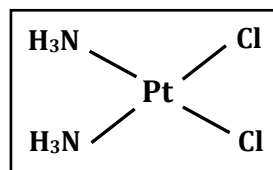


Figura 1.1 Estructura química del cisplatino.

El cisplatino fue sintetizado por primera vez en 1844 por Peyronein y su estructura química fue dilucidada en 1893 por Wernerin (Dasari y Tchounwou, 2014). Sin embargo, recién en 1965 Rosenberg y Col. demostraron que este compuesto era capaz de inhibir la división celular en *Escherichia Coli* y pocos años después, en 1969, demostraron su capacidad antitumoral en un modelo animal (Rosenberg y Col., 1969). Finalmente, en 1978 fue aprobado por la FDA (del inglés *Food and Drug Administration*) para su uso en el tratamiento contra el cáncer (Burger y Col., 2011).

1.1.4 Mecanismo de acción del cisplatino

El mecanismo de acción de este compuesto no está completamente dilucidado, pero se cree que produce sus efectos citotóxicos principalmente a través de su interacción con el ADN, y sus acciones antineoplásicas no son específicas de una fase del ciclo celular en particular. El platino de su estructura química es capaz de formar enlaces covalentes, con lo

cual se asemeja a las reacciones de alquilación, y es por ello que se lo vincula con los fármacos antineoplásicos alquilantes.

El cisplatino entra a las células de mamífero a partir de la circulación sistémica a través de un transportador activo de cobre (Ctr1) (Yonezawa y Col., 2005). En el interior de la célula la baja concentración de iones cloruro presentes promueve la formación de un complejo monohidratado de cisplatino. Allí, los ligandos de cloruro de su molécula son desplazados por moléculas de agua formando enlaces covalentes, con lo cual se genera un compuesto cargado positivamente muy electrofílico. Éste reacciona con los sitios nucleofílicos del ADN y de proteínas, formando aductos. En el ADN produce entrecruzamientos inter e intracatenarios, lo cual conlleva a distorsiones, generando así un arresto en la replicación, en la transcripción y en la división celular de células con alta tasa de proliferación. En respuesta a ello, se ponen entonces en marcha los mecanismos de reparación del ADN o se emite una señal para comenzar el proceso de apoptosis (ver *Figura 1.2*). El principal sistema de reparación involucrado en la remoción de los aductos ADN-cisplatino en el núcleo es el sistema de reparación por escisión de nucleótidos (sistema NER) (Marullo y Col., 2013). Además, el ADN dañado puede ser reconocido por la proteína p53 y otras proteínas de control de ciclo celular y conllevar esto al arresto celular y a la apoptosis (Jamieson y Lippard, 1999; Alderden y Col., 2006; Pabla y Dong, 2008; Miller y Col., 2010; Brunton y Col., 2012).

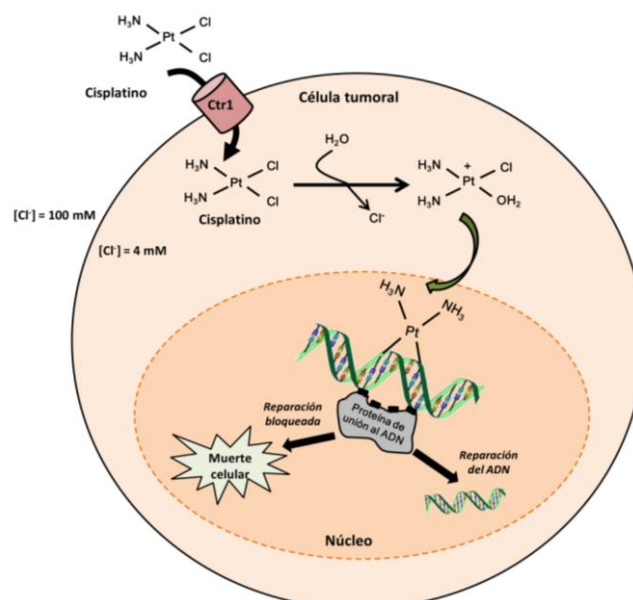


Figura 1.2 Mecanismo citotóxico del cisplatino. Luego de entrar a la célula a través del transportador de cobre Ctr1, el cisplatino se convierte en un compuesto nucleofílico, el cuál es capaz de unirse al ADN. Si la lesión causada no puede ser reparada, puede conllevar a muerte celular.

El cisplatino interfiere en los procesos de replicación, explicando así su amplia toxicidad para las células que se están dividiendo activamente, como es el caso de las células tumorales. Esto también explicaría la toxicidad que causa a las células hematopoyéticas como efecto secundario a su administración, produciendo mielosupresión. Sin embargo, el cisplatino también puede afectar a las células en fase posmitótica, como ser las células de túbulo proximal de riñón que no se encuentran replicándose activamente. El daño generado por este fármaco en el ADN nuclear por sí sólo no es suficiente para explicar su gran efectividad como citotóxico de las células tumorales ni tampoco para explicar la citotoxicidad que causa en otros tejidos que no se encuentran en división activa.

En los últimos años se han realizado numerosos trabajos que aportan claras evidencias de que el cisplatino se acumula en las mitocondrias. Esto podría deberse a que el cisplatino es atraído hacia las mitocondrias, y en su interior puede formar aductos con el ADN y proteínas mitocondriales. Teniendo en cuenta que los procesos de reparación del ADN en la mitocondria son más rudimentarios que los del núcleo celular, el cisplatino puede de este modo causar disfunción mitocondrial, lo que estimularía la producción de radicales libres del oxígeno y de las vías de señalización proapoptóticas (Pabla y Dong, 2008; Marullo y Col., 2013).

1.1.5 Formas de administración y farmacocinética del cisplatino

El cisplatino se administra en la mayoría de los casos por vía intravenosa. Existen otras formas alternativas de administración utilizadas menos frecuentemente, tales como la vía intraarterial (empleada en algunas ocasiones para el tratamiento de cáncer de hígado), la vía intraperitoneal (puede ser utilizada en cáncer de ovario) o la instilación dentro de la vejiga. En todos los casos el paciente debe estar hospitalizado y bajo estricto control médico.

Por vía intravenosa, el cisplatino se administra en forma de infusión en una solución de cloruro de sodio 0,9% o en una solución que contenga cloruro de sodio y glucosa, y se lo infunde en un lapso de cuatro a ocho horas. Las concentraciones plasmáticas de platino total aumentan gradualmente durante la perfusión y llegan a su pico inmediatamente luego de ser finalizada. Dado que uno de los principales efectos adversos que presenta su administración es la toxicidad renal, se puede estimular la diuresis para evitar la acumulación de cisplatino en el tejido renal agregando manitol a la infusión, en algunos casos. Como otra medida preventiva para el desarrollo de la nefrotoxicidad, generalmente el paciente es hidratado ocho a doce horas previas a la infusión del cisplatino con uno a dos litros de fluidos, como así

también debe mantenerse una adecuada hidratación por veinticuatro horas luego de finalizada su administración (Brunton y Col., 2012; Sweetman, 2009).

Una vez administrado por vía intravenosa, el cisplatino se distribuye ampliamente en fluidos y tejidos, tales como riñón, hígado, intestinos y testículos, pero presenta escasa penetración en el sistema nervioso central. El cisplatino se une fuertemente en un porcentaje mayor al 90% a proteínas plasmáticas, y posee una rápida conversión no enzimática a metabolitos inactivos.

Los niveles plasmáticos de cisplatino decaen de manera bifásica. Inicialmente, la concentración plasmática disminuye rápidamente como consecuencia de su distribución a los tejidos y su eliminación por vía renal, presentando un tiempo de vida media de eliminación de 25 a 50 minutos ($t_{1/2\alpha}$), donde el fármaco eliminado en dicha etapa corresponde al fármaco libre sin metabolizar. Luego, la concentración plasmática total del fármaco (tanto libre como unido) disminuye paulatinamente, presentando un extenso tiempo de vida media mayor a 24 horas ($t_{1/2\beta}$ = 58 a 74 horas), quizá como consecuencia de su intensa unión a los diferentes tejidos. Se postula una tercera fase de eliminación, con una vida media prolongada, ya que se han detectado altas concentraciones en plasma de cisplatino luego de varios días de su administración ($t_{1/2anúrica} > 240$ horas).

Se elimina principalmente por riñón en las primeras horas en una pequeña fracción, donde luego le sigue una lenta excreción durante varios días, habiéndose informado que hasta un 43% de la dosis inicial puede aparecer en orina luego de cinco días de su administración, en su mayoría unido a proteínas. La excreción por vía biliar se considera mínima. Vale tener en cuenta que el cisplatino puede ser detectado en tejidos cuatro meses o más luego de su administración (Brunton y Col., 2012; Flórez, 2008; Astolfi y Col., 2013).

1.1.6 Regímenes de dosificación del cisplatino

En la actualidad se utiliza una gran variedad de dosis y de regímenes de dosificación del cisplatino, tanto administrado como agente único o en combinación con otros citostáticos. Los regímenes de dosificación a emplear dependerán de las condiciones del paciente (estado general que presenta a la hora de comenzar el tratamiento, respuesta clínica al tratamiento o aparición de toxicidad), tipo de cáncer a tratar, objetivo terapéutico y de si es administrado sólo o en combinación, ajustándose a las necesidades de cada paciente.

Los regímenes de dosificación típicos varían desde 20 a 120 mg/m² por vía intravenosa como dosis única, cada tres a cuatro semanas. También se pueden encontrar esquemas

alternativos de dosificación, como ser 20 mg/m² diariamente por cinco días, o 20 mg/m² una vez por semana, durante tres a cuatro semanas (Brunton y Col., 2012; Albers y Col., 2011). La dosis total para un único curso de cisplatino, ya sea administrado como infusión única o como una infusión fraccionada en varios días, no debe exceder los 120 mg/m², ya que dosis mayores pueden resultar potencialmente letales. Cuando el cisplatino es utilizado en terapias combinado con otros citostáticos, se debe reajustar y reducir las dosis administradas (Sweetman, 2009).

Debido a la resistencia al tratamiento que puede observarse en el tratamiento del cáncer en algunos pacientes, el cisplatino es utilizado comúnmente en combinación con otras drogas para el tratamiento de cáncer de ovario, biliar, de colon, de pulmón, gástrico, de mama, de próstata, de páncreas, melanomas, entre muchos otros. Al respecto, en tumores metastásicos de testículo, el cisplatino es utilizado como agente principal o en combinación con bleomicina, etopósido, ifosfamida o vinblastina, con una efectividad del 90%. En tumores metastásicos de ovario puede ser empleado sólo o combinado, generalmente con paclitaxel (Dasari y Tchounwou, 2014).

Los siguientes esquemas de dosificación son a modo orientativo en pacientes adultos:

- Tumores testiculares metastásicos: 20 mg/m² intravenoso durante cinco días, cada tres a cuatro semanas. Generalmente para el tratamiento de este tipo de tumores se lo suele combinar con bleomicina y vinblastina.

- Tumores ováricos metastásicos: Como agente único 100 mg/m² intravenoso, cada cuatro semanas. O bien en combinación con paclitaxel ajustando la dosis.

- Cáncer avanzado de vejiga: como agente único, 50-70 mg/m² intravenoso. Debe administrarse una vez cada tres a cuatro semanas. En pacientes que han sido pretratados intensamente con radioterapia o quimioterapia, se recomienda utilizar la dosis más baja del rango sugerido (Sweetman, 2009).

1.1.7 Efectos adversos del cisplatino

El cisplatino puede producir múltiples efectos adversos producto de su administración, observándose más frecuentemente alteraciones gastrointestinales, ototoxicidad, nefrotoxicidad, neurotoxicidad, hiperuricemia, mielosupresión leve o moderada y alteraciones electrolíticas, entre otros. Algunos revisten mayor gravedad y necesitan de atención médica,

mientras que otros se presentan sólo durante la administración del cisplatino y luego desaparecen paulatinamente; sin embargo deben ser monitoreados (Astolfi y Col., 2013).

Entre las **manifestaciones gastrointestinales** más frecuentes que aparecen, encontramos a las náuseas y vómitos. Éstos suelen ocurrir en forma muy severa en la mayoría de los pacientes, donde las náuseas pueden persistir hasta una semana luego del tratamiento.

La **ototoxicidad** puede manifestarse en forma de hipoacusia a altas frecuencias, tinnitus, y en ocasiones puede causar toxicidad vestibular o sordera. Puede ser unilateral o bilateral. Este efecto es más frecuente que aparezca en niños y con dosis repetidas de cisplatino.

Los efectos sobre el **sistema nervioso central** aparecen en forma de neuropatía motora y sensitiva periférica, y son dependientes de la dosis, ya que aparecen más frecuentemente a dosis altas o luego de múltiples ciclos. Estos signos pueden seguir progresando luego de interrumpida la administración del antineoplásico.

Los efectos sobre **la médula ósea** pueden ser muy severos y dependen también de la dosis administrada. Aparecen como mielosupresión leve o moderada, acompañadas de trombocitopenia y leucopenia transitorias.

Las **alteraciones electrolíticas** se manifiestan en forma de hipomagnesemia, hipocalcemia, hipofosfatemia e hipopotasemia. La hipocalcemia e hipomagnesemia son consecuencia directa de la nefrotoxicidad que causa el cisplatino, como describiremos en detalle más adelante, y si no son debidamente tratadas pueden causar tetania; sin embargo, esto último ocurre en raras ocasiones.

Entre los efectos adversos que se presentan menos frecuentemente, podemos mencionar a las reacciones anafilácticas que se producen generalmente apenas minutos luego de la administración intravenosa del cisplatino, y pueden manifestarse como edema facial, sibilancias, taquicardia e hipotensión. También puede aparecer extravasación, produciendo entumecimiento en la zona de inyección, alteraciones dermatológicas y alteraciones hepáticas (Sweetman, 2009, Brunton y Col., 2012; Astolfi y Col., 2013).

Sin embargo, el principal efecto adverso que limita la dosis de cisplatino a emplear es la **nefrotoxicidad**, presentándose aproximadamente en un tercio de los pacientes que reciben tratamiento con este antineoplásico, y alrededor de un 20% de los pacientes que reciben altas dosis padecen de disfunciones renales severas. El grado de injuria renal que se puede desarrollar tras la administración de este antineoplásico depende fundamentalmente de la dosis administrada, la frecuencia de administración, y generalmente es reversible, salvo en

algunos casos, donde progresa hacia una insuficiencia renal irreversible o crónica (Yao y Col., 2007; Uehara y Col., 2011; Muraki y Col., 2012).

Las manifestaciones renales que puede causar el cisplatino se presentan en forma de insuficiencia renal aguda (IRA), hipomagnesemia, acidosis renal distal, hipocaliemia, defectos en la capacidad de concentrar la orina, hiperuricemia, deficiencia de eritropoyetina, entre otras. Sin embargo, la nefrotoxicidad aparece mayoritariamente como IRA, donde la incidencia también varía en función de la dosis y la frecuencia de administración. Es importante destacar que se observa nefrotoxicidad en un porcentaje considerable de pacientes tratados con cisplatino aún utilizando hidratación previa con solución salina y promoviendo su diuresis, como se explicará más adelante (Miller y Col., 2010).

1.1.8 Nefrotoxicidad inducida por cisplatino

1.1.8.1 Conversión del cisplatino a una nefrotoxina en las células de los túbulos proximales

El cisplatino se acumula en los riñones más que en cualquier otro órgano y lo hace principalmente en las células de túbulo proximal, particularmente en su región S3, causando lesiones tubulointersticiales. Esto sucede debido a que en la región S3 de dichos túbulos existe una mayor expresión del transportador de cationes orgánicos 2 (Oct2, Slc22a2), el cual es el principal encargado de ingresar al cisplatino a las células tubulares a partir de la sangre peritubular. Por otro lado, también se han registrado lesiones a nivel distal (Miller y Col., 2010).

Se ha descrito que la injuria renal que causa el cisplatino en las células de túbulo proximal no es debido al cisplatino *per se*, sino a un compuesto derivado del antineoplásico con un grupo tiol altamente reactivo, al cual se lo conoce como una nefrotoxina (**Figura 1.3**). El proceso de formación de dicha toxina comienza al conjugarse el cisplatino con glutatión reducido (GSH), lo cual puede ocurrir tanto en las células tubulares renales como también en el hígado, llegando luego por circulación (formando el conjugado Pt-GSH). En este paso se ve involucrada la enzima glutatión S-transferasa (GST). Luego, el conjugado Pt-GSH es secretado hacia el lumen tubular a través de la proteína de resistencia a multidroga 2 (Mrp2) de la membrana apical, donde resulta escindido consecutivamente por la enzima γ -glutamil transpeptidasa (GGT, dando un conjugado con Cisteína y Glicina, Pt-Cys-Gly) y luego por una aminopeptidasa N (AP-N), para dar un conjugado con cisteína (Pt-Cys).

A continuación, dicho conjugado es reabsorbido por la célula tubular y en el citosol es metabolizado, por la enzima Cisteína-S-conjugado β -liasa (C-S β -liasa), a una molécula con un grupo tiol altamente reactivo, la cual resulta ser la nefrotoxina (Hanigan y Devarajan, 2003; Miller y Col., 2010).

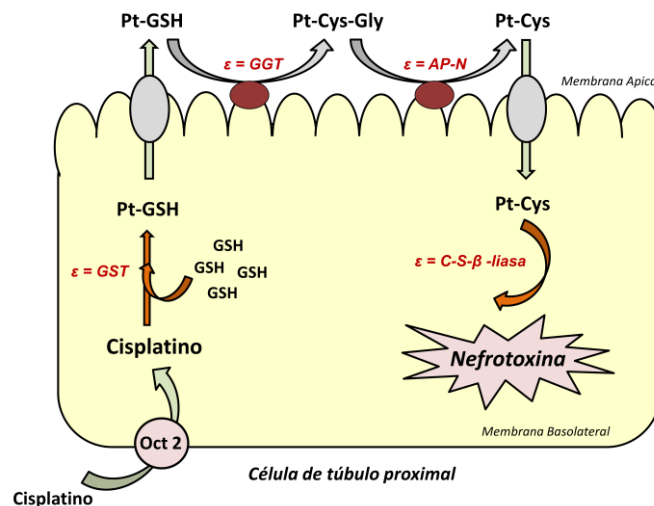


Figura 1.3 Metabolismo del cisplatino a una nefrotoxina en las células de túbulo proximal renal. Pt-GSH: cisplatino conjugado con glutatión; Pt-Cys-Gly: cisplatino conjugado con cisteína y glicina, Pt-Cys: conjugado con cisteína, GSH: glutatión reducido; ϵ = GST: enzima glutatión-S-transferasa; ϵ = GGT: enzima γ -glutamil transpeptidasa; ϵ = AP-N: enzima aminopeptidasa N; ϵ = C-S- β -liasa: enzima cisteína-S-conjugado β -liasa.

1.1.8.2 Mecanismos involucrados en la patogénesis de la nefrotoxicidad causada por el cisplatino

Los mecanismos por los cuales el cisplatino causa la injuria renal son múltiples e involucran a diversas moléculas. Entre ellos, podemos hallar al estrés oxidativo, a los procesos de apoptosis, de inflamación y fibrogénesis (ver **Figura 1.4**) (Yao y Col., 2007).

El **daño por estrés oxidativo** es uno de los principales mecanismos involucrados en el daño causado por este fármaco. La generación de especies reactivas del oxígeno (conocidas en conjunto como ERO), tales como ser el anión superóxido, peróxido de hidrogeno y radicales hidroxilos, juega un rol esencial. Dichos compuestos pueden ser generados por diferentes vías en respuesta a la entrada del cisplatino a la célula renal, como ser:

- *Por disfunción mitocondrial:* tal como ha sido mencionado anteriormente, el cisplatino causa daño sobre el ADN mitocondrial. Esto afecta a los procesos de transcripción y la síntesis de las proteínas que conforman la cadena transportadora de electrones, lo cual altera su funcionalidad y conlleva a un aumento de la producción de ERO (Marullo y Col., 2013).

- *Por agotamiento de especies antioxidantes:* el cisplatino (o su forma reactiva) al entrar a la célula es capaz de reaccionar con el GSH, el cuál es un reconocido antioxidante celular. Al producirse la depleción de los niveles de GSH reducido, se modifica el estado redox celular, lo cual produce acumulación de ERO endógenas y estrés oxidativo celular (Pabla y Dong, 2008).

Las ERO generadas tienen diferentes blancos moleculares en las células de túbulo proximal: pueden actuar sobre lípidos de membrana, proteínas y ADN, destruyendo su estructura, lo cual culmina en estrés celular. Además, las ERO participan en la activación de numerosas vías de señalización que culminan en daño y muerte celular por apoptosis (Marullo y Col., 2013; Yao y Col., 2007).

Diferentes vías **apoptóticas** se han visto involucradas en la muerte celular de las células de túbulo proximal renal en respuesta al cisplatino, como ser a la vía intrínseca mitocondrial, la vía extrínseca activada por receptores de muerte celular (como los receptores de los Factores de Necrosis Tumoral 1 y 2 (TNFR1 y 2, del inglés *Tumor Necrosis Factor Receptor*) o receptores Fas) y la vía del estrés del retículo endoplasmático. Particularmente, la llamada vía de apoptosis mitocondrial ha sido propuesta como la principal vía apoptótica en la nefrotoxicidad causada por el cisplatino, y diferentes proteínas se ven involucradas en dicho proceso (Pabla y Dong, 2008).

Por otra parte, se sabe que altas dosis de cisplatino causan necrosis de las células tubulares, mientras que dosis menos elevadas causan muerte celular por apoptosis (Zhang y Hanigan, 2003).

Como bien se mencionó anteriormente, el cisplatino produce además **inflamación** del tejido renal. Esto se genera en respuesta a un incremento de los niveles del Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α , del inglés *Tumor Necrosis Factor α*), el cual induce luego la transcripción de otras citoquinas inflamatorias y recluta a células que median la inflamación al tejido renal (Yao y Col., 2007; Ozkok y Edelstein, 2014).

El cisplatino también induce **fibrosis** alrededor de los túbulos afectados, acompañado por infiltración de macrófagos y linfocitos. Los macrófagos cumplen un rol esencial en el proceso de fibrogénesis por producir factor transformador de crecimiento beta 1, TGF- β 1 (del

inglés *Transforming Growth Factor β 1*), y $\text{TNF-}\alpha$, los cuales se comportan como factores fibrogénicos al mediar la inducción de células miofibroblásticas capaces de producir matrices extracelulares (Yao y Col., 2007).

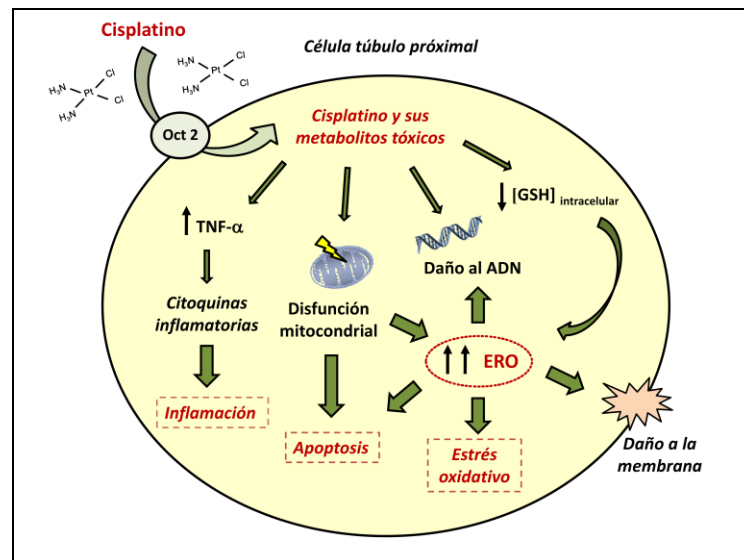


Figura 1.4 Mecanismos involucrados en la nefrotoxicidad causada por el cisplatino en las células de túbulo proximal renal. GSH: glutatión reducido; $\text{TNF-}\alpha$: factor de necrosis tumoral α ; ERO: especies reactivas del oxígeno.

1.1.8.3 Características de la insuficiencia renal aguda inducida por el cisplatino

La nefrotoxicidad inducida por el cisplatino se puede manifestar de diferentes formas, tal como se mencionó en el ítem 1.1.7 de esta sección. Sin embargo, la IRA es la forma más severa y común en que se manifiesta la nefrotoxicidad inducida por este fármaco. Su aparición es dependiente de la dosis empleada para tratar a los pacientes y depende también de las dosis acumulativas (Miller y Col., 2010).

La insuficiencia renal se inicia varios días después de la administración del cisplatino y generalmente se detecta por un aumento de los niveles de creatinina o urea en plasma. Además, también es común hallar hipomagnesemia y pequeñas cantidades de proteínas y glucosa en orina. La recuperación de la función renal puede ocurrir en el lapso de dos a cuatro semanas luego de la administración del cisplatino, pero en algunos casos se requiere de más tiempo o incluso puede no haber recuperación, derivando en un cuadro de insuficiencia renal crónica (Miller y Col., 2010).

Como bien se expuso anteriormente, el principal sitio blanco del cisplatino en el tejido renal son las células de los túbulos proximales renales, particularmente la región S3. La disfunción en los túbulos proximales precede a las alteraciones observadas en la hemodinamia renal. Al respecto, se ha informado que 48 a 72 horas luego de la administración de este compuesto ya se observan alteraciones en la reabsorción tubular, tanto a nivel proximal como distal, y un aumento en la resistencia vascular. El cisplatino en su mecanismo de toxicidad produce disfunción mitocondrial por daño a su ADN, conllevando a una disminución de la producción de ATP. Esto trae como consecuencia alteraciones en la funcionalidad de distintos transportadores y a una reducción en la capacidad de reabsorber sodio y agua. El exceso de sodio y agua que no resultan entonces reabsorbidos en el túbulo proximal es sentido en la mácula densa y conlleva a un aumento en la resistencia vascular periférica y a una incapacidad para concentrar la orina. Los efectos sobre el transporte de sodio y de agua representan alteraciones tempranas, ya que se encuentran cuando todavía no hay aumentos en la urea o creatinina plasmática. Lo que ocurre finalmente es un aumento de la excreción de sodio y agua.

La poliuria que entonces puede acompañar a la administración del cisplatino ocurre en dos fases bien diferenciadas. La primera fase ocurre dentro de las primeras 24 a 48 horas luego de la administración del antineoplásico y está caracterizada por una disminución en la osmolaridad urinaria, pero la velocidad de filtración glomerular (VFG) se mantiene estable. Esta fase está mediada por prostaglandinas y puede ser prevenida por la administración de vasopresina, y generalmente se resuelve espontáneamente. La segunda fase comienza dentro de las 72 a 96 horas y se caracteriza por una disminución de la VFG. De este modo, los pacientes pueden presentar pérdidas de sodio, potasio, magnesio y calcio por orina (Santoso y Col., 2003; Yao y Col., 2007).

1.1.8.4 Relación entre la nefrotoxicidad y la dosis empleada del cisplatino

Ha sido extensamente estudiado que el efecto nefrotóxico del cisplatino es dependiente de la dosis empleada y que esto puede requerir en algunos casos la reducción de la dosis, con el riesgo de ineffectividad, o la interrupción del tratamiento. Al respecto, roedores y humanos desarrollan daño renal a dosis comparables, se producen cambios histopatológicos renales equivalentes y exhiben un perfil de la nefrotoxicidad del cisplatino en el tiempo similar. Es por ello entonces que los roedores son comúnmente empleados para el estudio de

nefrotoxicidad inducida por cisplatino (Dobyan y Col., 1980; Aleksunes y Col., 2008; Miller y Col., 2010).

Al respecto, en ratón 15-20 mg/kg p.c. de cisplatino corresponden aproximadamente a 45-60 mg/m² en humanos, dosis que se encuentran dentro del rango utilizado en la terapéutica. Por otro lado, una dosis de 5 mg/kg p.c. en rata es comparable con una dosis de entre 1-3 mg/kg en humanos, la cual también es utilizada en la terapéutica (Bearcroft y Col., 1999; Aleksunes y Col., 2008).

1.1.8.5 Formas de prevenir la nefrotoxicidad inducida por cisplatino

1.1.8.5.1 Disminución de la nefrotoxicidad por diferentes protocolos de hidratación del paciente tratado con cisplatino

La toxicidad renal que causa el cisplatino puede ser disminuida, pero no totalmente prevenida, mediante diferentes estrategias, tales como fraccionamiento de la dosis a administrar, disminución de la velocidad de infusión y la hidratación del paciente antes, durante y después de la administración del antineoplásico. La hidratación expande el volumen posrenal, reduciendo por lo tanto la concentración del cisplatino y el tiempo de contacto con el epitelio tubular. Actualmente en la práctica clínica tres formas de hidratación se llevan a cabo: hidratación con solución salina, con solución salina y manitol o con solución salina y furosemida (Santoso y Col., 2003; Tiseo y Col., 2007; Muraki y Col., 2012).

La hidratación con solución salina y manitol se ha utilizado ampliamente. El manitol causa diuresis osmótica y disminuye la concentración de cisplatino en la orina, lo cual podría reducir la toxicidad renal, pero puede contribuir a la producción de hipomagnesemia, ya que aumenta la excreción urinaria de magnesio. Sin embargo, a pesar de que el manitol sea muy utilizado, su efecto renoprotector aún está en debate. Al respecto, Santoso y Col. (2003) han hallado que la hidratación con solución salina y manitol se asocia con una mayor nefrotoxicidad que la hidratación con solución salina sola o junto con furosemida. Por otra parte, el rol de la furosemida como agente renoprotector en los protocolos de hidratación también es controvertido. Existen trabajos que realzan el valor de la furosemida como renoprotector en los pacientes tratados con cisplatino, pero otros han hallado incluso que la administración de furosemida puede agravar la injuria renal. Al respecto, algunos autores observaron que en roedores la nefrotoxicidad inducida por cisplatino aumenta por la hidratación conjunta con furosemida, otros han hallado que la administración de este diurético

no trajo efectos beneficiosos, pero tampoco dañinos a la función renal, mientras que otros observaron un efecto renoprotector de la furosemida cuando es administrada en ratas 30 minutos antes de la infusión del cisplatino. Estudios en humanos comparando el uso de furosemida con manitol en los protocolos de hidratación no han demostrado diferencias significativas en cuanto a la nefrotoxicidad que estos compuestos producen (Santoso y Col., 2003).

Por otra parte, Muraki y Col. (2012) recientemente han propuesto un régimen de hidratación con solución salina suplementada con magnesio y manitol que disminuye la nefrotoxicidad causada por el cisplatino, con una rápida infusión del mismo.

Como puede verse entonces, en la actualidad se utilizan diferentes regímenes de hidratación para poder disminuir el daño renal que causa la administración del cisplatino. No obstante, los resultados son controvertidos, y el porcentaje de pacientes, que a pesar de recibir una hidratación previa o simultánea a la administración del antineoplásico con diferentes formulaciones, sigue siendo preocupante. Debido a esto, muchísimos compuestos han sido evaluados como agentes renoprotectores en búsqueda de nuevas alternativas. Sin embargo, la mayoría de estos estudios han sido realizados en animales (generalmente en rata o ratón) o en cultivos celulares (Miller y Col., 2010).

1.1.8.5.2 Disminución de la nefrotoxicidad inducida por cisplatino por diferentes compuestos

Los diferentes compuestos que han sido propuestos y estudiados en los últimos años para la disminución del daño renal que causa el cisplatino pueden ser clasificados de acuerdo a su sitio de acción:

- Algunos actúan a nivel de la entrada del cisplatino a la célula renal, lo cual es llevado a cabo principalmente por Oct2. La inhibición farmacológica de este transportador ha demostrado tener efectos renoprotectores (Haragsim y Col., 1994).
- Compuestos que actúan sobre el metabolismo y bioactivación del cisplatino a una nefrotoxina: son compuestos que actúan inhibiendo las enzimas γ -glutamyl transpeptidasa y la cisteína-S-conjugado β -liasa (Townsend y Hanigan, 2002).
- Compuestos que bloquean las vía de muerte celular inducidas en el proceso fisiopatológico que causa la injuria renal (Kaushal y Col., 2001).

- Compuestos que actúan disminuyendo el estrés oxidativo causado por el cisplatino. Al respecto, una gran variedad de compuestos con propiedades antioxidantes han demostrado ser renoprotectores ante la injuria renal causada por el cisplatino (Miller y Col., 2010).
- Compuestos que actúan sobre la respuesta inflamatoria causada por el cisplatino a través de la interleuquina-10 o el factor de necrosis tumoral- α (Ramesh y Reeves, 2004).
- Otros (Pabla y Dong, 2008).

1.1.8.6 Compuestos con propiedades antioxidantes

Los compuestos con propiedades antioxidantes son uno de los grupos de compuestos que ejercen efecto renoprotector ante la administración del cisplatino que cuenta con más cantidad de estudios realizados. Entre ellos se pueden encontrar una gran variedad de sustancias, tanto de origen natural como sintético, entre las que podemos hallar a un extracto etanólico del jengibre, sólo o en combinación con Vitamina E (Ajith y Col., 2007), a la tetrametilpirazina, extraída de la planta *Ligusticum wallichii*, una hierba muy utilizada en China para tratar enfermedades vasculares (Ali y Col., 2008), a la rutina, un compuesto flavonoide (Arjumand y Col., 2011), a diferentes estatinas, como ser simvastatina y pravastatina (Dashti-Khavidaki y Col. 2013), a la Vitamina C (Greggi Atunes y Col., 2000), a la eritropoyetina humana recombinante (rhEPO, Rjiba-Touati y Col., 2013), a la tioredoxina fusionada a albúmina sérica humana (HSA-Trx, Kodama y Col., 2014), a la dimetiltiourea (DMTU, Santos y Col., 2008), a la quercetina (Sanchez-Gonzalez y Col., 2011) y a la N-acetilcisteína (Nisar y Feinfeld, 2002), entre muchísimos otros.

1.1.8.6.1 N-acetilcisteína como agente renoprotector de la nefrotoxicidad inducida por cisplatino

La N-acetilcisteína (NAC) es un aminotiol (ver *Figura 1.5*) que se comporta como un precursor sintético de la cisteína intracelular y del glutatión, y se lo considera como un compuesto con importantes propiedades antioxidantes. Originalmente, fue introducido como un agente mucolítico para tratar enfermedades pulmonares, y por ello se lo utiliza actualmente en la clínica para el tratamiento de enfermedades bronquiales agudas y crónicas (Fishbane y Col., 2004; Gillissen, 2011).

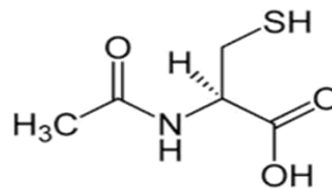


Figura 1.5 Estructura química de la N-acetilcisteína.

Las propiedades antioxidantes de la NAC se deben fundamentalmente a que actúa reponiendo las reservas de glutatión reducido, incrementa la actividad de la superóxido dismutasa, actúa como *scavenger* de radicales libres del oxígeno y es capaz de interferir con la peroxidación lipídica (Dickey y Col., 2008; Takhtfooladi y Col., 2012). Debido a esto, también se la utiliza en la clínica para el tratamiento de sobredosis por acetaminofeno, ya que ayuda a restablecer las reservas hepáticas de glutatión, y como profilaxis de la nefropatía por radiocontraste (Fishbane y Col., 2004; Poletti y Col., 2007; Gillissen, 2011; Waring, 2012).

La NAC ha mostrado ejercer efecto renoprotector en IRA tanto de origen isquémico (Di Giorno y Col., 2006; Nitescu y Col., 2006), como tóxica. Con respecto a la IRA nefrotóxica, se ha informado que resulta efectiva en disminuir el daño renal en IRAs inducidas por gentamicina (Mazzon y Col., 2001), cloruro mercuríco (Ekor y Col., 2010) y por litio (Efrati y Col., 2005), entre otras.

Numerosos trabajos han demostrado además que la NAC ejerce un efecto renoprotector sobre el daño renal que produce la administración de **cisplatino**, tanto en humanos como en roedores, sin reducir su eficacia antitumoral. Al respecto, se ha observado que lleva a cabo dicha tarea al inhibir la depleción de glutatión, la acumulación de peróxido de hidrógeno y la peroxidación lipídica en las células de túbulo proximal, como también al disminuir la inflamación del tejido renal que causa el cisplatino (Shalby y Col., 2011).

En los roedores tratados con cisplatino, la NAC tiene la capacidad de mejorar tanto la función glomerular como la función tubular. Por un lado disminuye los valores de creatinina y urea en plasma y mejora la VFG. Y por otro lado, se ha constatado que es capaz de disminuir los niveles urinarios de la N-acetil- β -glucosaminidasa y de β 2-Microglobulina, ambos marcadores de daño tubular, los cuales se hallan aumentados en ratas con IRA inducida por cisplatino (Abdelrahman y Col., 2010; Shalby y Col., 2011).

1.2 TRANSPORTADORES RENALES DE ANIONES ORGÁNICOS

1.2.1 Transporte de iones orgánicos en el riñón

El riñón tiene un rol fundamental en el mantenimiento de la homeostasis de electrolitos y fluidos en el organismo. Entre las numerosas tareas que son llevadas a cabo por este órgano, resultan de vital importancia la eliminación de sustancias tanto de carácter endógeno como exógeno, como también la reabsorción de compuestos específicos a partir del filtrado glomerular de nuevo hacia la circulación sistémica (Lee y Kim, 2004; Wang y Sweet, 2013).

Una gran cantidad de compuestos endógenos y exógenos pueden ser clasificados como cationes o aniones orgánicos, de acuerdo a su estructura química y a sus propiedades fisicoquímicas. Los procesos renales de secreción y de reabsorción de este tipo de compuestos ocurren fundamentalmente en las células de los túbulos proximales, donde una gran variedad de proteínas transportadoras de membrana se ven involucradas en su movimiento vectorial a través de las membranas biológicas. En base a la selectividad de los sustratos que transportan, pueden ser clasificados en sistemas de transporte de aniones o cationes orgánicos. A su vez, estos transportadores pertenecen a alguna de las dos grandes superfamilias de proteínas transportadoras: la familia de los transportadores con un cassette de unión de trifosfato de adenosina, **transportadores ABC** (del inglés *ATP binding cassette*) y la familia de transportadores de solutos, **SLC** (del inglés *Solute Carriers*).

Las proteínas transportadoras ABC llevan a cabo un tipo de transporte activo primario, los cuales dependen de la hidrólisis de ATP para obtener la energía necesaria para el movimiento activo unidireccional de sustratos a través de las membranas plasmáticas, generalmente en contra de un gradiente de concentración. Los transportadores ABC resultan esenciales en muchos procesos celulares. Son capaces de conferir resistencia a numerosos fármacos, ya que los expulsan de las células diana, pero también son capaces de expulsar productos xenobióticos de los tejidos sanos. En esta familia de transportadores, podemos hallar a la subfamilia de proteínas de resistencia a múltiples fármacos, Mrd (del inglés *multidrug resistance proteins*), a la subfamilia de proteínas asociadas a resistencia a múltiples fármacos, Mrp (del inglés *multidrug resistance-associated proteins*) y a la subfamilia de proteínas de resistencia al cáncer mamario, Bcrp (del inglés *breast cancer resistance proteins*), entre otras.

La superfamilia de proteínas transportadoras SLC está comprendida por transportadores facilitadores y transportadores activos secundarios y terciarios acoplados a iones. Dentro de esta superfamilia podemos encontrar a la subfamilia de polipéptidos transportadores de aniones orgánicos, Oatp (del inglés *organic anion transporting polypeptides*), la subfamilia de transportadores de cationes orgánicos, Oct (del inglés *organic cation transporters*), a los transportadores de cationes orgánicos/carnitina, Octn (del inglés *organic cation/carnitine transporters*), a los transportadores de aniones orgánicos, Oat (del inglés *organic anion transporters*), a los péptidos transportadores, Pept (del inglés *peptides transporters*), a los transportadores concentradores de nucleósidos, Cnt (del inglés *concentrative nucleoside transporters*), a los transportadores equilibradores de nucleósidos, Ent (del inglés *equilibrative nucleoside transporters*) y a los transportadores de extrusión de toxinas y multidrogas, Mate (del inglés *multidrug and toxin extrusion transporters*), entre otras (Lee y Kim, 2004; Brunton y Col., 2012; Wang y Sweet, 2013).

En este trabajo de Tesis, la atención estará centrada en los sistemas de transporte de aniones orgánicos del riñón, particularmente en el transportador de aniones orgánicos 5.

1.2.1.1 Sistema de transporte de aniones orgánicos en las células de túbulo proximal renal

Los transportadores de aniones orgánicos (Oat) pertenecen a la familia Slc22 junto con los transportadores de cationes y zwitteriones. Debido a su fundamental importancia en el mantenimiento de la homeostasis y en la excreción de numerosos compuestos de relevancia, los Oat han recibido mucha atención en los últimos años y desde 1997, muchos de ellos han sido clonados y caracterizados. Al respecto, numerosos estudios se han realizado con el objetivo de analizar sus diferentes patrones de expresión subcelulares y en las diferentes especies. También se han realizado estudios de interacción y transporte para conocer más acerca de sus especificidades de sustrato, y se han analizado sus roles en la progresión de diferentes enfermedades y en las variaciones interindividuales en la respuesta farmacológica a drogas y a toxinas.

Los Oat son capaces de transportar una gran variedad de aniones orgánicos con estructuras muy diversas y es por ello que tienen una amplia especificidad de sustrato. Muchas drogas pueden encontrarse como aniones orgánicos a pH fisiológico. Entre ellas podemos nombrar a los antibióticos β -lactámicos, antihipertensivos, diuréticos, antivirales, algunas drogas antineoplásicas, inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, etc.

Dichos compuestos pueden ser secretados activamente por los túbulos renales a través del sistema de Oat, influyendo así sobre los procesos farmacocinéticos, farmacodinámicos y propiedades tóxicas de dichas drogas. También hay que tener en cuenta que son capaces de interactuar y transportar sustancias endógenas, tales como metabolitos (como por ejemplo ácido 5-hidroxiindolacético) y hormonas esteroideas y sus metabolitos (como ser cortisol o sulfato de estrona), o toxinas naturales (micotoxinas como la ocratoxina A) o del medio (como por ejemplo herbicidas como 2,4-diclorofenoxiacetato o conjugados orgánicos del mercurio) (Rizwan y Burckhardt, 2007; VanWert y Col., 2010; Burckhardt, 2012; Wang y Sweet, 2013).

De los Oat identificados, experimentalmente sólo se ha demostrado la capacidad de transportar aniones orgánicos de Oat1 (Slc22a6), Oat2 (Slc22a7), Oat3 (Slc22a8), Oat5 (Slca19), Oat6 (Slc22a20), Oat8 (Slc22a24), Oat9 (Slc22a27) y Urat1/Rst (Slc22a12) (Burckhardt, 2012).

En riñón, podemos hallar en la membrana basolateral de las células de los túbulos proximales a los transportadores Oat1, Oat3 y a nivel apical los transportadores Urat1, Oat2, y Oat5 (Anzai y Col., 2006; VanWert y Col., 2010; Burckhardt, 2012) (ver **Figura 1.6**).

La mayoría de los Oat operan como intercambiadores de aniones y tienen la capacidad de concentrar intracelularmente aniones orgánicos (AOs) en contra de su gradiente de concentración, forzando su entrada debido a la diferencia de potencial de membrana negativo en el interior. Por ende se requiere de energía para poder lograr dicho transporte. Para ello, los Oat intercambian al AO por un dicarboxilato (tales como α -cetoglutarato o succinato) que es transportado a favor de su gradiente hacia el espacio extracelular. La mayor concentración intracelular de los dicarboxilatos es mantenida gracias al metabolismo celular y a otro tipo de transportadores de membranas, los intercambiadores Na^+ /dicarboxilato o NaDCs que captan dicarboxilatos hacia el interior celular, en un cotransporte con Na^+ . Por último, el gradiente de Na^+ a través de la membrana plasmática es generado por la Na^+/K^+ ATPasa en la membrana plasmática. Por ende, los Oat llevan a cabo un transporte activo terciario (Srimaroeng y Col., 2008; Burckhardt, 2012; Nigam y Col., 2015).

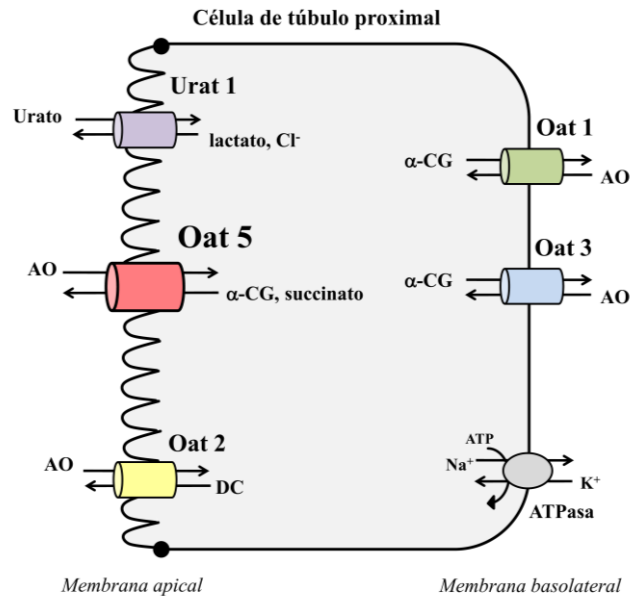


Figura 1.6 Célula de túbulo proximal renal y los diferentes transportadores de aniones orgánicos (Oat) expresados en ella. AO: anión orgánico; α -CG: α -cetoglutarato, DC: dicarboxilato.

Los Oat que han sido clonados hasta el momento constan de 536 a 556 aminoácidos. Presentan 12 dominios transmembrana helicoidales y tanto sus regiones aminoterminal como carboxiterminal se encuentran en el lado intracelular. Poseen un *loop* extracelular largo entre los dominios transmembrana 1 y 2 que constan de varios sitios de N-glicosilación, como así también de residuos conservados de tirosina que participan en la formación de puentes disulfuro. Además, poseen otro *loop* intracelular entre los dominios transmembrana 6 y 7, que poseen sitios putativos de fosforilación. Las estructuras terciarias exactas de los Oat no se conoce debido a que ninguno de ellos ha sido cristalizado aún (Srimaroeng y Col., 2008; Burckhardt, 2012).

1.2.2 Transportador de aniones orgánicos 5 (Oat5)

El transportador de aniones orgánicos 5 (Oat5), Slc22a19, pertenece a la familia de transportadores de aniones orgánicos Oat. Mediante estudios de *Northen blot* se halló que su ARNm se expresa exclusivamente en tejido renal, no observándose señal en otros tejidos (Youngblood y Sweet, 2004).

Su secuencia codificante contiene 1995 pares de bases y codifica para una proteína de 551 AA. Presenta una homología de secuencia aminoacídica del 39% con Oat1 y del 37% con

Oat2. A través del empleo de diferentes programas de modelado se realizó un análisis topológico de Oat5, con lo cual se predijo que la proteína cuenta con 12 potenciales segmentos α -hélice transmembrana y con 4 sitios potenciales de glicosilación (residuos 39, 56, 62, 102) y 5 de fosforilación (residuos 216, 272, 279, 313 y 536) (Anzai y Col., 2005).

A nivel proteico se expresa en tejido renal, particularmente en la membrana apical de las células de los túbulos proximales, con localización predominante sobre el segmento S3, en la región externa de la médula externa y en la corteza yuxtamedular (Anzai y Col., 2005).

Oat5 se comporta como un intercambiador de aniones orgánicos por dicarboxilatos de cuatro y de cinco carbonos, tal como succinato y α -cetoglutarato. Con estudios funcionales se pudo demostrar que Oat5 es capaz de mediar el transporte de sulfatos de esteroides, tales como sulfato de dehidroepiandrosterona y sulfato de estrona, con una gran afinidad por este último compuesto. También se ha observado que Oat5 transporta ocratoxina A, y que el transporte de sulfato de estrona resulta inhibido por furosemida, bumetamida, probenecid, penicilina G y sulfobromoftaleína. Algo llamativo sobre este Oat es que es incapaz de transportar al ácido p-aminohipúrico (PAH), un anión orgánico prototipo, tal como lo hacen sus congéneres (Anzai y Col., 2005; Burckhardt, 2012).

Por todo lo visto entonces, Oat5 estaría funcionando principalmente como una vía apical para la reabsorción de algunos AOs dirigido por un gradiente de dicarboxilatos.

Regulación de Oat5 por hormonas sexuales y por ocratoxina A

En el año 2010, en un trabajo donde se analizó la expresión sexodependiente de Oat5 se halló que este transportador presenta una mayor expresión en hembras que en machos. Al respecto, se encontró una sobre regulación luego de la castración a machos, en hembras ovariectomizadas su expresión se encontró poco afectada y en animales púberes se observó que existía una baja expresión de Oat5 (similar a lo hallado en animales machos adultos) y similar en ambos sexos. En base a estos resultados, los autores propusieron que luego de la pubertad, los andrógenos estarían jugando un importante rol en mantener la expresión de Oat5 baja en los machos, mientras que en las hembras factores tales como la hormona de crecimiento o algunas otras hormonas, o una combinación de éstas, estarían estimulando adicionalmente la expresión de dicho transportador (Breljak y Col., 2010). Al respecto, otro trabajo del mismo grupo de investigación describió que en ratas la región promotora de Oat5 contiene tres elementos de respuesta a andrógenos, dos elementos de respuesta a estrógenos y dos elementos de respuesta a progesterona (Sabolić y Col., 2007).

El sulfato de estrona y el sulfato de dehidroepiandrosterona forman parte de un reservorio de esteroides inactivos en sangre, donde luego pueden ser convertidos a hormonas activas, tales como estrona, estradiol y dehidroepiandrosterona por conversión enzimática. Estos sulfatos de esteroides son reabsorbidos en el riñón de los mamíferos, lo cual se llevaría a cabo en los túbulos proximales a partir del filtrado glomerular. Dichos compuestos saldrían luego hacia la sangre a través de transportadores basolaterales tales como Oat3, ya que dicho transportador presenta una gran afinidad por ambos sulfatos de esteroides. Dado que se observó una mayor expresión de Oat5 en hembras que en machos, probablemente ambos sulfatos de esteroides sean reabsorbidos a mayor velocidad en las hembras (Breljak y Col., 2010).

Por otro lado, se ha demostrado también que la administración de bajas dosis de ocratoxina A en ratas produjo una sobre regulación de Oat5 a nivel proteico, mientras que no se hallaron cambios a nivel de su ARNm. Esto podría deberse a que se produciría un aumento de la síntesis o una disminución de la degradación proteica. Además fue hallado un aumento de las expresiones de Oat1 y Oat3, los cuales también transportan a dicha toxina. Por ende, la sobre regulación observada en los transportadores de ocratoxina A estaría involucrada en el desarrollo de la nefrotoxicidad que causa dicha toxina, aumentando su captación a través de la sangre peritubular por Oat1 y Oat3, mientras que el aumento de Oat5 en la membrana apical estaría contribuyendo a un aumento de la reabsorción de esta toxina desde el filtrado glomerular (Zlender y Col., 2009).

Excreción urinaria de Oat5

Nuestro grupo de investigación ha sido pionero en la detección de Oat5 en orina de rata (Di Giusto y Col., 2009). Al respecto, en un modelo de IRA por isquemia-reperfusión se halló un importante aumento de Oat5 en orina, donde a cortos tiempos de isquemia (5 minutos) la excreción urinaria de Oat5 aumentó aún cuando no se hallaron alteraciones en parámetros tradicionales indicadores de daño renal y sólo alteraciones leves a nivel histológico. A raíz de ello, Oat5 en orina fue postulado como un potencial biomarcador temprano de disfunción renal con una posible utilidad para la detección de alteraciones menores en la integridad estructural y funcional renal.

Luego, en el año 2010, fueron realizados estudios de dosis-respuesta en ratas tratadas con cloruro mercuríco. En dichos estudios, Oat5 en orina se encontró notablemente aumentado en IRA inducida por este compuesto, y además se observó aumentada a bajas

dosis de cloruro mercuríco como ser de 0,2 mg/kg p.c., vía subcutánea, cuando aún no se hallaban modificados los parámetros tradicionales indicadores de daño renal. Estos estudios permitieron así postular a la excreción urinaria de Oat5 como un potencial biomarcador temprano de IRA inducida por cloruro mercuríco (Di Giusto y Torres, 2010).

1.3 BIOMARCADORES DE INSUFICIENCIA RENAL AGUDA

1.3.1 Definición de insuficiencia renal aguda y sus clasificaciones

La IRA es un síndrome clínico complejo, de etiologías múltiples, asociado a distintos factores de riesgos, con manifestaciones clínicas diversas y un pronóstico poco predecible. Se caracteriza por una rápida e importante disminución de la función excretora del riñón, con una marcada disminución de la VFG. Como consecuencia de ello se produce una importante acumulación de productos del metabolismo del nitrógeno, tales como la urea y la creatinina, de otros productos de desecho, y disturbios en los balances electrolíticos y ácido-base. Otra manifestación clínica que comúnmente suele aparecer es la alteración en el volumen minuto de orina, generalmente manifestándose en forma de oliguria; sin embargo un porcentaje considerable de los pacientes que presentan IRA tienen la diuresis conservada o incluso pueden presentar poliuria. Entre las diferentes causantes de los cuadros de IRA en la comunidad podemos mencionar a la isquemia renal, sepsis y diferentes fármacos y toxinas.

La IRA está ampliamente diseminada en la población y su incidencia en los últimos años se ha incrementado notablemente. Al respecto, se ha informado que se observa IRA en casi un 18% de los pacientes hospitalizados, y en alrededor de un 67% de los pacientes en cuidados intensivos, donde generalmente aparece de manera secundaria a eventos extrarenales. Las estadísticas de incidencia de este síndrome pueden variar levemente en función de la población seleccionada que se utilice para realizarlas. A pesar de los grandes avances que se han realizado en el campo de los cuidados intensivos y la nefrología, se siguen observando altas tasas de morbilidad y mortalidad asociadas a pacientes con IRA, especialmente en aquellos que están hospitalizados y en cuidados intensivos. Por ende, resulta de vital importancia un rápido diagnóstico de esta patología, para poder promover una rápida intervención y mejorar así el pronóstico del paciente (Bellomo y Col., 2012; Schifffl y Lang, 2013; Peres y Col., 2013; Wasung y Col., 2015).

Desde el punto de vista fisiopatológico pueden describirse tres mecanismos por los que puede producirse IRA:

- **IRA pre-renal**: en este tipo de insuficiencia renal se produce una disminución de la filtración glomerular producto de una disminución de la perfusión renal, lo cual puede ocurrir debido a una hipovolemia (por deshidratación o hemorragia aguda, por ejemplo), hipotensión arterial, insuficiencia cardíaca congestiva, etc. En este caso el parénquima renal se encuentra conservado. Si es detectada a tiempo, puede ser revertida luego de haberse logrado una adecuada perfusión renal.

- **IRA intrínseca**: Existe daño tisular agudo en el parénquima renal, y puede haber daño glomerular, tubular, intersticial o vascular. La manera más frecuente en que se presenta este tipo de IRA es en forma de necrosis tubular aguda (también conocido como NTA), donde el daño es producido en las células tubulares renales. La NTA puede ser causada por isquemia o por tóxicos. Entre los tóxicos que pueden causar esta patología podemos nombrar antibióticos como aminoglucósidos y cefalosporinas, líquidos de contraste y fármacos antineoplásicos, como el **cisplatino**, entre muchos otros. La NTA causada por sustancias tóxicas puede cursar con la diuresis conservada o aumentada, mientras que la NTA por isquemia generalmente cursa con oliguria o anuria.

- **IRA post-renal u obstructiva**: Se produce como consecuencia de una obstrucción en las vías urinarias, ya sea a nivel de uretra, vejiga o uréter, impidiendo así la salida de la orina formada. Debido a esto se produce un aumento de la presión que termina por comprometer al filtrado glomerular. La causa más frecuentemente asociada en hombres es la obstrucción del cuello de la vejiga por enfermedad prostática, y se caracteriza por una diuresis fluctuante.

Cada tipo de IRA presenta manifestaciones clínicas características que ayudan a su diagnóstico y permiten diferenciarlas (Miyahira Arakaki y Col., 2003; Alpers, 2005).

1.3.2 Definición de biomarcador

El término de biomarcador fue introducido por primera vez en el año 1989 y resulta del acrónimo de marcador biológico. En el año 2001, un grupo del NHI (del inglés *National Institute of Health*) definió al término biomarcador como una característica que es objetivamente medida y evaluada como indicador de un proceso biológico normal, de un proceso patológico o de una respuesta farmacológica a una intervención terapéutica (Biomarkers Definitions Working Group, 2001; Molitoris y Col., 2008). Por otro lado la FDA utiliza el término de biomarcador para describir cualquier indicador diagnóstico que pueda ser medido y utilizado para la evaluación de cualquier riesgo o enfermedad (Adiyanti y Loho, 2012).

Particularmente, un biomarcador ideal de IRA debe ser fácilmente obtenible, debe poder ser medido con una metodología fácil y rápida, debe ser sensible a pequeñas variaciones de la función renal y ser específico de riñón, debe correlacionarse con el grado de injuria renal y ser indicativo de la progresión y regresión de dicho daño (Ferguson y Col., 2008). Los mejores biomarcadores son aquellos que se obtienen de manera no invasiva, y en líneas generales, los biomarcadores de IRA se encuentran en plasma u orina.

Actualmente, se utilizan una serie de parámetros renales para el diagnóstico de la IRA, como así también para evaluar su pronóstico. Parámetros tales como la creatinina y la urea en plasma, o la VFG, entre otros, son marcadores de daño que tradicionalmente se han utilizado en la clínica. Sin embargo, en los últimos años, se ha avanzado mucho sobre el descubrimiento de nuevos biomarcadores que proveen de métodos más sensibles y específicos para la detección y pronóstico de la IRA.

1.3.3 Biomarcadores de insuficiencia renal aguda convencionales

La clínica de las diferentes formas de la IRA dependerá de las causas desencadenantes, y en muchos casos servirá para realizar un diagnóstico orientativo. Sin embargo, esto se complementa con estudios bioquímicos que permiten una valoración más precisa de la función renal.

Los marcadores que tradicionalmente se han utilizado por décadas para el diagnóstico y el pronóstico de la IRA son, como se ha mencionado anteriormente, los niveles plasmáticos de urea y de creatinina. Sin embargo, han demostrado ser poco sensibles y poco específicos

del tipo de daño renal, limitando así su uso y muchas veces su correcta interpretación (Vaidya y Col., 2008).

La creatinina plasmática es uno de los parámetros que más se utiliza en la actualidad para evaluar la función renal, particularmente la capacidad de filtración glomerular, por ser un método rápido y sencillo. La creatinina es un producto de desecho que proviene del metabolismo de la creatina muscular, y que se elimina por vía renal, mayoritariamente a través de la filtración glomerular. En caso de que se produzca una disminución de la capacidad de filtración del glomérulo por diferentes causas, la creatinina se filtrará a menor velocidad y se verá acumulada en plasma. Es por esto entonces, que los niveles plasmáticos de dicho compuesto sirven para evaluar la funcionalidad renal. Sin embargo esta medida tiene un poder diagnóstico limitado en las etapas tempranas de la IRA por varios motivos. En primer lugar, no se encuentran modificaciones en sus concentraciones plasmáticas hasta que no se altera una buena parte de la funcionalidad renal, con una reducción de al menos un 30% de la VFG. Esto conlleva a un retraso en el diagnóstico del daño renal, de hasta 72 horas luego del comienzo de la injuria. Además, puede haber daño sin que sea detectada una alteración en los niveles plasmáticos de creatinina debido a una reserva renal o a la secreción tubular que presenta la creatinina, ya que este compuesto sufre algo de secreción a nivel tubular. Tampoco hay que perder de vista que durante la fase aguda de la insuficiencia renal, donde ocurren importantes cambios en la VFG, la creatinina en plasma no resulta representativa de la función renal hasta que se haya alcanzado un estado estacionario. Por otro lado, hay que tener en cuenta que los niveles de séricos de este compuesto pueden variar con la edad, el sexo, la masa corporal y el metabolismo muscular, como también con el estado de hidratación y de nutrición del paciente, y que además no resulta útil para la distinción entre una IRA pre o post-renal de una IRA intrínseca. Por todo esto, la creatinina sérica no debe ser empleada de forma aislada para valorar la función renal (Schiffl y Lang, 2013; Peres y Col., 2013; Wasung y Col., 2015).

La urea en plasma es otra medida que es utilizada con frecuencia para analizar la función renal. Sin embargo, existen muchos factores que pueden afectar su concentración. Hay que tener en cuenta que no se genera a una velocidad constante y que sus valores en plasma pueden encontrarse aumentados en una dieta rica en proteínas, en hemorragias, trauma o tratamientos con glucocorticoides. En cambio, en una dieta baja en proteínas o en enfermedades hepáticas avanzadas se puede producir una disminución de los niveles plasmáticos de urea, sin verse afectado la VFG (Bonventre y Col., 2010; Peres y Col., 2013).

Por todo lo visto entonces, los niveles plasmáticos de urea y de creatinina presentan poca sensibilidad y especificidad para la detección de una IRA, y no son buenos marcadores tempranos de la disfunción renal.

La función renal es también comúnmente valorada mediante el *clearance* renal de creatinina (Cl_{Cr}). Debido a que la creatinina es una sustancia que se filtra libremente en los glomérulos, y se considera que no resulta secretada en cantidades significativas, ni es reabsorbida por los túbulos renales, puede ser utilizado para estimar la VFG. Para ello, se necesita conocer los valores de creatinina sérica (Crp), de creatinina en orina (Cro) y el volumen minuto de orina (Vo), para calcular su *clearance* como $Cl_{Cr} = (Cro \times Vo) / Crp$. Con esta fórmula, se elimina la variación interindividual dependiente de la masa muscular que produce la creatinina plasmática. Sin embargo, esta metodología cuenta con el problema de la recolección de la orina, generalmente de 24 horas, porque se necesita de mucha colaboración por parte del paciente y resulta aún más complicado en el caso de pacientes hospitalizados. Por todo esto, en la práctica médica, suelen emplearse fórmulas matemáticas basadas en la creatinina sérica para la estimación del *clearance* de creatinina, como ser la conocida fórmula de Cockcroft y Gault, para lo cual sólo se necesita conocer además el sexo y el peso del paciente (Di Loreto y Rigalli, 2009; Laredo y García-Arenillas, 2005).

No hay que perder de vista que la creatinina presenta algo de secreción tubular y que una fracción de la excreción de creatinina por el riñón se debe a ello. En los pacientes con insuficiencia renal crónica grave el porcentaje de creatinina urinaria que proviene de la secreción tubular aumenta con respecto a una situación normal, con lo cual el *clearance* de creatinina sobreestima la VFG. Cambios sistemáticos y progresivos en la secreción tubular de creatinina en cada paciente en particular conduce a una infra o sobreestimación de la VFG. Por todo esto entonces, la creatinina y su *clearance* no son buenos métodos para valorar la progresión de la insuficiencia renal (Calabia, 2004).

El estudio de la orina y su composición resulta una herramienta muy utilizada en nefrología para el análisis del daño renal, pero en líneas generales sirve para poder hacer un diagnóstico diferencial entre las diferentes formas clínicas de IRA.

Por un lado, el volumen urinario no tiene gran valor diagnóstico en la IRA, ya que como bien se mencionó anteriormente, las distintas formas de esta patología pueden manifestarse con diferentes variaciones en la diuresis. Sin embargo, sí resulta de utilidad a la hora de la clasificación de la IRA como oligúrica y no oligúrica.

El sedimento urinario también resulta muy útil para diferenciar una IRA pre-renal de una NTA, pero para ello, se necesita de un observador con experiencia (McMahon y Waikar, 2013).

Parámetros en orina, tales como la excreción fraccional de sodio, la osmolaridad, los niveles urinarios de proteínas y glucosa, o la actividad de fosfatasa alcalina en orina se utilizan también para diferenciar entre una IRA pre-renal, donde la integridad y capacidad reabsortiva de los túbulos y la capacidad de concentrar la orina se encuentran conservadas, de una NTA donde ambas funciones se encuentran alteradas (Thadani y Col., 1996). Sin embargo se ha demostrado que son una herramienta subóptima, ya que el estado de los fluidos corporales, y el uso de diuréticos pueden conllevar a resultados confusos y a interpretaciones erróneas (Koyner y Col., 2010).

1.3.4 Nuevos biomarcadores de insuficiencia renal aguda

Como bien se ha mencionado anteriormente, resulta crucial una detección rápida de la IRA para lograr una intervención terapéutica temprana y así reducir los índices de morbilidad y mortalidad asociados. Debido a esto, sumado al hecho de que los biomarcadores tradicionales más comúnmente empleados en la clínica se encuentran alterados de forma tardía con respecto al inicio del cuadro, en los últimos años se han realizado numerosos estudios en el campo de los biomarcadores de IRA.

Muchas proteínas han emergido como biomarcadores, tanto sensibles como específicos, capaces de detectar de manera temprana la IRA en modelos animales y humanos. Entre los más prometedores y los que cuentan con mayor cantidad de estudios que avalan su utilidad, podemos nombrar a la molécula de injuria renal 1 (Kim-1, del inglés *kidney injury molecule-1*), a la lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL, del inglés *neutrophil gelatinase-associated lipocalin*), la N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG), la interleuquina-18 (IL-18) y a proteínas de bajo peso molecular tales como la β 2-Microglobulina (β 2-M), α 1-Microglobulina (α 1-M) y la Cistatina C (Cys-C), entre otros (Han, 2012; Peres y Col., 2013).

- ***Kidney injury molecule-1 (Kim-1)***

Kim-1 es una glicoproteína de membrana. No es detectada en tejido renal normal, ni tampoco es hallada en orina en situaciones no patológicas. Sin embargo, tanto en roedores como en humanos se ha visto que la expresión de su ARNm resulta inducida y sus niveles

proteicos se encuentran notablemente aumentados luego de una injuria renal. En ratas con IRA tanto de origen isquémico, como en la causada por la administración de cisplatino, Kim-1 ha permitido una detección de la patología de manera más temprana que la creatinina o urea en plasma, o que los niveles urinarios de glucosa o proteínas. Además, la expresión de Kim-1 se correlaciona con el grado de injuria renal a través del tiempo, teniendo así también valor como un marcador del curso temporal de la patología.

Por otra parte, se ha hallado que un ectodominio de Kim-1 es volcado desde las células tubulares renales hacia la orina y puede ser detectado rápidamente luego de que se produzca una injuria renal, con lo cual Kim-1 en orina también ha sido considerado como un biomarcador no invasivo de daño en túbulo proximal (Ichimura y Col., 2004; Vaidya y Col., 2006; Peres y Col., 2013).

- ***Lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL)***

Dentro de una gran variedad de biomarcadores recientemente caracterizados, NGAL resulta uno de los más prometedores. NGAL es una proteína que pertenece a la familia de las lipocalinas. Dicha proteína puede resultar inducida en respuesta a la inflamación en células epiteliales, y se expresa en diferentes tejidos como ser estómago, colon, y células epiteliales de los túbulos proximales, entre otros.

NGAL se sobreexpresa rápidamente luego de una injuria renal y sus niveles urinarios se encuentran notablemente aumentados luego del daño renal por isquemia o nefrotóxicos, como el cisplatino. El aumento de sus niveles urinarios se observó mucho antes de que fueran hallados cambios en la creatinina sérica (Mishra y Col., 2003, 2004), y por ende, se ha propuesto a NGAL en orina como un biomarcador temprano y sensible para el diagnóstico de la IRA en sus fases tempranas.

Sin embargo, la gran producción extra-renal de NGAL en respuesta a un estrés sistémico puede producir un incremento en su excreción urinaria en ausencia de IRA, y también puede encontrarse un aumento en sus niveles urinarios no sólo en un estadio agudo de la insuficiencia renal, sino que también en falla renal crónica, lo cual puede muchas veces complicar su interpretación (Peres y Col., 2013; Han, 2012).

- ***N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG)***

La NAG es una enzima lisosomal presente en las células de los túbulos proximales. Cuando se produce una disrupción del epitelio apical de dichas células, NAG es liberada hacia la orina en formación, y su abundancia en orina puede correlacionarse directamente con el grado de injuria tubular.

Se ha observado un aumento de los niveles urinarios de NAG en IRA causada por drogas nefrotóxicas, luego de trasplante renal y cirugía cardíaca, y por ello ha sido propuesto como un biomarcador de IRA. Sin embargo, su utilidad se ha visto limitada a causa de que su excreción urinaria también se ha observado aumentada en ciertas condiciones donde no hay una manifestación clínica de IRA, como ser en artritis reumatoidea, por el uso de antiinflamatorios no esteroides, en hipertiroidismo, nefropatía diabética, etc. (Adiyanti y Loho, 2012; Peres y Col., 2013).

- ***Interleuquina-18 (IL-18)***

La IL-18 es una citoquina proinflamatoria que es producida por macrófagos y células tubulares renales, expresándose de manera constitutiva en tejido renal sano. Los niveles urinarios de IL-18 se encuentran notoriamente aumentados de manera específica en pacientes con NTA, en comparación con aquellos que presentan infección del tracto urinario o falla renal crónica. Debido a ello entonces, se lo postuló como un biomarcador de daño en túbulo proximal en IRA por NTA. Además, el aumento de IL-18 en orina se produce de manera temprana y muestra un buen grado de correlación con la severidad de la IRA. Sin embargo, su concentración puede estar influenciada por factores ajenos a la IRA en sí misma, ya que se trata de una citoquina proinflamatoria que juega un rol en diferentes situaciones donde se vea involucrada una respuesta inflamatoria, tal como ser en endotoxemia, enfermedades inflamatorias y autoinmunes. De esta manera, se ven limitadas así su especificidad, sensibilidad y su uso como biomarcador (Parikh y Col., 2006; Honoroe y Col., 2012; Adiyanti y Loho, 2012; Peres y Col., 2013).

- ***Proteínas de bajo peso molecular: β 2-Microglobulina (β 2-M), α 1-Microglobulina (α 1-M) y Cistatina C (Cys-C)***

β 2-Microglobulina (β 2-M)

La β 2-M es la cadena liviana del complejo mayor de histocompatibilidad I y se expresa en la superficie de toda célula nucleada. Cuando se disocia de la cadena pesada, entra

en circulación como un monómero y es libremente filtrada en los glomérulos, para luego ser totalmente reabsorbida y catabolizada en los túbulos proximales. Dicho proceso se encuentra alterado en el caso de IRA. Por ende, se ha observado que el incremento en la excreción urinaria de esta proteína puede servir como un marcador temprano de disfunción tubular causado por exposición a sustancias nefrotóxicas, por cirugía cardíaca y por trasplante de riñón.

Sin embargo, β 2-M en orina presenta baja estabilidad y no resulta un buen marcador para predecir la necesidad de terapia de reemplazo renal en el caso de una injuria renal severa (Ferguson y Col., 2008; Adiyanti y Loho, 2012).

α 1-Microglobulina (α 1-M)

La α 1-M es una proteína que se sintetiza en el hígado. Resulta filtrada libremente por el glomérulo en su forma libre y luego, al igual que β 2-M, es reabsorbida en los túbulos proximales. Por ende su excreción urinaria se encuentra aumentada ante una disfunción tubular, y resulta un biomarcador temprano de esta patología, aún cuando no se observan alteraciones histológicas. Al contrario que β 2-M, α 1-M sí resulta estable en orina y resulta ser un marcador temprano de necesidad de terapia de reemplazo renal en pacientes con IRA no oligúrica (Ferguson y Col., 2008; Adiyanti y Loho, 2012).

Cistatina C (Cys-C)

La Cys-C es una proteína inhibidora de la cisteinproteasa producida por todas las células con núcleo y es filtrada en los glomérulos, pero luego es completamente reabsorbida y degradada en los túbulos proximales en un riñón sano. La aparición de esta proteína en orina también es un indicador de una alteración en la capacidad reabsortiva de los túbulos, y por ende se correlaciona con el grado de la injuria tubular. En estudios realizados en humanos, la excreción urinaria de Cys-C ha mostrado ser un biomarcador prometedor de IRA, y se han desarrollado métodos para detectarlo por ELISA. Sin embargo, compete con la albúmina en la orina por la reabsorción tubular, y por ende cualquier proceso que produzca una elevación de los niveles urinarios de albúmina producirá un aumento en los niveles de Cys-C, sin que necesariamente haya daño tubular e IRA. Un ejemplo de ello es la albuminuria observada ante un cuadro de sepsis (Ferguson y Col., 2008; Sirota y Col., 2011; Martensson y Col., 2012).

1.3.5 La orina como fuente de biomarcadores

Tanto el plasma como la orina son fluidos biológicos que sirven como fuente de biomarcadores en nefrología, ya que ambos son fácilmente recolectados y su obtención no resulta tan invasiva para el paciente. Sin embargo, la orina presenta algunas ventajas sobre el plasma para la evaluación y el descubrimiento de biomarcadores de IRA (Hoorn y Col., 2005; Wu y Col., 2010; McMahon y Waikar, 2013; Konvalinka, 2014). Entre ellas podemos nombrar:

- ❖ A su método de recolección, el cual es fácil y no invasivo. Se pueden obtener grandes cantidades de muestra causando un mínimo estrés al paciente y se pueden realizar recolecciones de orina por largos períodos de tiempo de manera controlada.

- ❖ Se trata de un fluido que recorre los túbulos renales en su proceso de formación, y por ello se encuentra en íntimo contacto con el sitio de la injuria. Por esto, muchas proteínas se acumulan en orina luego de producida la injuria en el tejido renal, pudiendo ser potencialmente utilizadas como biomarcadores de dicho daño.

- ❖ La cantidad de proteínas en orina y la composición del proteoma urinario refleja directamente cambios en la funcionalidad renal y en el tracto urinario.

- ❖ En el curso temporal de la IRA, se produce un aumento de los biomarcadores urinarios en forma relativamente temprana. Por el contrario biomarcadores en plasma, como ser la creatinina plasmática, muestran un retraso entre el momento en que se produce la injuria y el aumento de sus niveles por encima de un umbral requerido para realizar un diagnóstico de la IRA (tal como se ha discutido anteriormente en el ítem 1.3.3 de esta sección).

- ❖ Los biomarcadores urinarios pueden ser clasificados entre aquellos que están presentes en el tejido renal de manera constitutiva y luego son volcados hacia la orina en formación producto del daño (como ser enzimas tubulares, como la NAG) y aquellos que resultan inducidos en respuesta al daño renal (como ser Kim-1). Los marcadores con expresión constitutiva en tejido renal suelen aparecer en orina poco tiempo después de que haya ocurrido la injuria, mientras que los que resultan inducidos como respuesta al daño suelen tardar más tiempo en aparecer.

Sin embargo, la orina también presenta algunas limitaciones a su uso como fuente de biomarcadores y ciertas cuestiones deben ser tenidas en cuenta (Hoorn y Col., 2005; Wu y Col., 2010; McMahon y Waikar, 2013; Konvalinka, 2014):

- En líneas generales los biomarcadores urinarios no suelen tener una larga estabilidad, y por ello la orina debe ser recolectada y almacenada de forma apropiada para su utilización (tubos de recolección apropiados, se debe evaluar la utilización de inhibidores de proteasas, el almacenamiento a una temperatura y pH adecuados, etc.).
- Las orinas recolectadas en diferentes momentos a lo largo del día (primer orina de la mañana, orina puntual en cualquier momento del día, etc.) arrojan diferente información, y esto debe ser tenido en cuenta a la hora de la búsqueda de biomarcadores y de la información que brindan.
- La concentración de un biomarcador en orina puede verse afectada por el estado de hidratación del paciente. Para solucionar esto, múltiples métodos se emplean para normalizar su concentración, como por ejemplo normalizarlo a las concentraciones de creatinina en orina o al flujo urinario.
- Por otro lado, el proteoma urinario puede resultar complejo a la hora de hallar y analizar una proteína con significado fisiopatológico que se encuentre en baja abundancia, y la reducción de dicha complejidad ha sido un importante reto en los últimos años.

1.3.6 Empleo de exosomas urinarios como material de partida para el descubrimiento de biomarcadores urinarios de insuficiencia renal aguda

Como bien hemos discutido anteriormente, numerosas proteínas pueden ser halladas en orina bajo condiciones fisiológicas o patológicas. Dichas proteínas pueden tener diferentes orígenes: pueden ser proteínas que se hallen circulando en el plasma y sean filtradas por el glomérulo, pueden provenir de la secreción en los túbulos renales en el caso de proteínas solubles, de la descamación celular, del desprendimiento de la membrana apical de las células tubulares, del desprendimiento de proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol (como ser la proteína Tamm-Horsfall) o mediante secreción exosomal (Hoorn y Col., 2005).

Los exosomas son pequeñas vesículas de membrana que se originan como las vesículas internas de cuerpos multivesiculares (CMV) en varios tipos de células. Los exosomas se pueden hallar en muchos tipos de fluidos biológicos, como ser orina y plasma. La excreción exosomal constituye una de las principales vías por la cual las proteínas de

membrana apical de las células de los túbulos renales son liberadas hacia la orina. Muy brevemente, en este proceso, las proteínas de membrana apical son endocitadas hacia el interior celular, y luego a través de varios procesos de señalización son dirigidas hacia los CMV. Luego, cuando los CMV se fusionan con la membrana, los exosomas son liberados hacia el espacio urinario.

La utilización de exosomas urinarios como material de partida para la búsqueda de nuevos biomarcadores ha ser de gran utilidad ya que:

- Reduce la complejidad del proteoma urinario, porque ayuda a minimizar la presencia de proteínas con gran abundancia en orina, como la Tamm-Horsfall, y también proporciona un enriquecimiento de un subproteoma que contiene a proteínas de membranas y citosólicas que son secretadas hacia orina mediante la vía exosomal.
- Los exosomas urinarios contienen proteínas provenientes de todo el epitelio renal, lo cual incluye al epitelio de podocitos glomerulares, túbulo proximal, el asa gruesa ascendente de Henle, túbulo contorneado distal, túbulo colector y el epitelio de transición de la vejiga.
- Se han hallado diferentes tipos de proteínas relacionadas con enfermedades renales en los exosomas urinarios.

Por todo lo visto entonces, en los últimos años los exosomas urinarios han ganado atención en el campo de la búsqueda de nuevos biomarcadores de daño renal, y numerosos protocolos se han presentado y refinado para su obtención, y también para el análisis de su proteoma (Esteva-Font y Col., 2010; Benito-Martin y Col., 2013).

2. OBJETIVOS

La insuficiencia renal aguda (IRA) es un síndrome clínico complejo que presenta una alta incidencia en la población. La falta de biomarcadores de daño renal que permitan un rápido diagnóstico de esta patología produce un retraso en la intervención terapéutica, aumentando así las tasas de morbilidad y mortalidad asociadas.

Es por esto entonces, que en la búsqueda de nuevos biomarcadores de daño renal que permitan una detección más temprana de la IRA, los objetivos de este trabajo de Tesis fueron los siguientes:

1. Analizar si la excreción urinaria de Oat5 podría ser utilizado como un biomarcador temprano de IRA inducida por la administración de cisplatino.

Para cumplir con este objetivo se procedió a:

- Evaluar las modificaciones en la excreción urinaria de Oat5 en ratas tratadas con una dosis nefrotóxica de cisplatino, y compararla con parámetros tradicionales indicadores de daño renal.
- Evaluar las modificaciones en la excreción urinaria de Oat5 en ratas tratadas con diferentes dosis de cisplatino y correlacionarlo con los marcadores tradicionales de daño renal.
- Realizar un seguimiento temporal de la excreción urinaria de Oat5 en ratas tratadas con cisplatino y correlacionarlo con el grado de injuria renal.
- Analizar la respuesta de la excreción urinaria de Oat5 en ratas tratadas con cisplatino cuando se les coadministra un agente renoprotector.

2. Analizar algunos de los posibles mecanismos moleculares involucrados en las modificaciones de la excreción urinaria de Oat5 en ratas tratadas con cisplatino.

Para cumplir con este objetivo se procedió a:

- Evaluar la expresión de Oat5 en tejido renal en ratas tratadas con diferentes dosis de cisplatino.
- Analizar las modificaciones de la expresión de Oat5 en tejido renal en el tiempo luego de la administración de cisplatino.

- Analizar las modificaciones en la expresión de Oat5 en tejido renal en ratas tratadas con cisplatino cuando se coadministra un compuesto renoprotector.
- Analizar si la vía de excreción exosomal es uno de los mecanismos involucrados en la eliminación de Oat5 por orina.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MÉTODOS

3.1.1 Animales de experimentación

Los experimentos fueron llevados a cabo utilizando ratas Wistar macho adultas de 110 a 130 días de edad provenientes del Bioterio de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario (U.N.R.). Las mismas tuvieron libre acceso a alimento y agua, y fueron mantenidas en condiciones constantes de temperatura (21-23 °C) y humedad, con ciclos de luz regulares (12 horas), según lo estipulado en “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” (National Research Council, 7° edición, 1996) y de acuerdo al “Reglamento sobre uso y manejo de animales de laboratorio” (Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, U.N.R.). El diseño experimental utilizado fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas U.N.R. (Resol. C.D. N° 560/2010).

Para los procedimientos quirúrgicos los animales fueron anestesiados con tiopental sódico (Pentothal® Sódico), empleando para ello una dosis de 70 mg/kg peso corporal (p.c.), intraperitoneal (i.p.). Finalizados los experimentos, la eutanasia se efectuó con una sobredosis de anestésico.

3.1.2 Grupos experimentales

3.1.2.1 Grupos experimentales para la evaluación de la excreción urinaria de Oat5 en un modelo de insuficiencia renal aguda inducida por cisplatino

Como primer parte del trabajo de Tesis, se procedió a poner a punto un modelo experimental de IRA inducida por cisplatino. Para ello se dividió a los animales al azar en dos grupos. El primer grupo (n=4) fue tratado con una dosis única nefrotóxica de cisplatino de 10 mg/kg p.c., i.p., denominado grupo **Cis10 2d**. El segundo grupo fue el grupo control (llamado **Control**, n=4), donde los animales fueron inyectados con el vehículo utilizado (10 mL solución salina /kg p.c., i.p.).

3.1.2.2 Grupos experimentales para la evaluación de la función renal, la excreción urinaria y la expresión renal de Oat5 en ratas tratadas con diferentes dosis de cisplatino

En una segunda etapa, se analizó la función renal, la excreción urinaria y la expresión renal de Oat5 en ratas tratadas con diferentes dosis de cisplatino. Para ello se incluyeron tres grupos adicionales tratados con diferentes y menores dosis del antineoplásico a los dos grupos experimentales del ítem 3.1.2.1. Los animales fueron inyectados, según correspondiera, con una única dosis de cisplatino de 1, 2 y 5 mg/kg p.c., i.p., denominados grupos **Cis1 2d** (n=4), **Cis2 2d** (n=4) y **Cis5 2d** (n=4), respectivamente.

Para todos los grupos experimentales empleados hasta aquí, la recolección de las muestras necesarias para realizar los experimentos pertinentes fue realizada dos días luego de la administración del cisplatino o del vehículo, según correspondiese.

3.1.2.3 Grupos experimentales para el seguimiento de la excreción urinaria y la expresión renal de Oat5 en el tiempo en un modelo de insuficiencia renal aguda inducida por cisplatino

Para realizar la tercera etapa de este trabajo de Tesis, se realizó un seguimiento de la excreción urinaria y la expresión renal de Oat5 en un modelo de IRA inducida por cisplatino. Para ello, al grupo tratado con la dosis de 5 mg/kg p.c., i.p. de cisplatino con dos días de tratamiento (**Cis5 2d**, n=4), se le adicionaron los grupos tratados con la misma dosis del antineoplásico, pero con cuatro (n=6), siete (n=6) y catorce (n=5) días de tratamiento, denominados grupos **Cis5 4d**, **Cis5 7d** y **Cis5 14d**, respectivamente.

La dosis empleada de cisplatino en esta parte de la Tesis fue seleccionada en base a estudios dosis-respuesta realizados previamente, de manera que se evidencie la nefrotoxicidad inducida por el cisplatino, pero sin que resulte letal en el período de estudio (Yokoo y Col., 2007; Abdelrahman y Col., 2010; Hosohata y Col., 2012; Pinches y Col., 2012a). Para cada tiempo evaluado, se procesó un correspondiente grupo control, administrándole el vehículo por la misma vía que el cisplatino (10 mL solución salina /kg p.c.).

En todos los casos, la recolección de las muestras necesarias para realizar los experimentos pertinentes fue realizada al finalizar los períodos de tratamiento indicados anteriormente.

Cabe tener en cuenta que todos los parámetros que fueron evaluados en los grupos controles (control dos días (n=4), control cuatro días (n=6), control siete días (n=3) y control catorce días (n=3)) no mostraron diferencias significativas entre sí, y por ello se decidió considerar a todos los grupos controles como un solo grupo control unificado (grupo “**Control**”, n=16), de manera de facilitar el análisis de los resultados, en forma similar a lo previamente descrito (Villar y Col., 2008).

3.1.2.4 Grupos experimentales para la evaluación del efecto de la N-acetilcisteína sobre la excreción urinaria y la expresión renal de Oat5 en ratas con nefrotoxicidad inducida por cisplatino

Con el fin de evaluar de qué manera la N-acetilcisteína (NAC) modifica a la excreción urinaria y a la expresión renal de Oat5 en ratas con nefrotoxicidad causada por el cisplatino, se procedió a trabajar con cuatro grupos experimentales. Para ello, se utilizaron los grupos experimentales **Control** (control de cuatro días, n=6) y **Cis5 4d** (n=6) descrito en el ítem 3.1.2.3 de esta sección, y se le adicionaron dos grupos: el grupo **NAC** (n=4): al cuál se le administró una única inyección del vehículo del cisplatino (10 mL de solución salina /kg p.c., i.p.) al comienzo del tratamiento y una solución de 500 mg/kg p.c., i.p. de N-acetilcisteína una vez por día, por cuatro días, y el grupo **Cis + NAC** (n=6): estos animales recibieron una única dosis de cisplatino de 5 mg/kg p.c., i.p., al comienzo del tratamiento y la dosis empleada de N-acetilcisteína una vez por día, por cuatro días. En todos los casos los animales fueron sacrificados a los cuatro días de la administración del cisplatino o del vehículo del mismo, según correspondiese.

Las dosis empleadas de cisplatino y la duración del tratamiento en esta parte del trabajo de Tesis fueron seleccionadas con el objetivo de inducir un cuadro de IRA, considerando los estudios realizados anteriormente. La dosis de NAC empleada fue elegida en base a estudios previos, con el objetivo de observar un efecto renoprotector en la IRA inducida por cisplatino (Abdelrahman y Col., 2010; Shalby y Col., 2011).

Vale la pena mencionar, que en todos los grupos experimentales (ítems 3.1.2.1, 3.1.2.2, 3.1.2.3, 3.1.2.4) se utilizaron diferentes sets de animales según los experimentos a realizar:

- Un primer set de animales fue empleado para obtención de orinas (a través del empleo de jaulas metabólicas) y para la obtención de muestras de plasma y tejido renal. Las orinas de dichos animales fueron utilizadas para realizar determinaciones bioquímicas, para la obtención de exosomas urinarios y para evaluar la abundancia de Oat5. En las muestras de plasma se realizaron determinaciones bioquímicas, y con el tejido renal se realizaron preparaciones de homogenado renal y de membranas apicales renales aisladas para estudios de expresión de Oat5.
- Un segundo set fue utilizado para estudios histopatológicos y de inmunohistoquímica.

3.1.3 Obtención de muestras y su posterior procesamiento

En todos los casos, se recolectó orina mediante el uso de jaulas metabólicas por 24 horas antes del sacrificio. Luego éstas fueron centrifugadas a 1000 x g por 10 minutos, con el fin de eliminar detritus celulares y posibles células descamadas. En los sobrenadantes se realizaron los experimentos pertinentes.

En el día del sacrificio, luego de anestesiarse a los animales, se procedió a la recolección de muestras de sangre y a la extracción de los riñones, los cuales fueron pesados y almacenados a -80°C hasta su empleo.

Las muestras de sangre se obtuvieron por punción cardíaca. A continuación fueron centrifugadas a 1000 x g por 10 min y se separó el plasma.

La obtención y procesamiento de las muestras de tejido renal fue diferente según el tipo de estudio a realizar. Los mismos serán descritos con más detalle más adelante en este trabajo junto con la descripción de cada una de las técnicas empleadas.

3.1.4 Monitoreo de la pérdida de peso con los diferentes tratamientos

Con el fin de evaluar la posible variación de peso corporal producto de los diferentes tratamientos, en todos los casos los animales fueron pesados antes de ser inyectados con el cisplatino o el vehículo, según correspondiera (día 0) y en el día del sacrificio.

La pérdida de peso en cada caso se calculó como % de peso perdido con el tratamiento, según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Peso perdido con el tratamiento} = -[(\text{Peso}_{\text{final}} - \text{Peso}_{\text{inicial}}) / \text{Peso}_{\text{inicial}}] * 100$$

3.1.5 Determinaciones analíticas

3.1.5.1 Determinación de la concentración plasmática de urea

La concentración plasmática de urea fue determinada espectrofotométricamente, empleando un método enzimático específico. Para ello se empleó un kit comercial (Uremia, Laboratorios Wiener, Rosario, Argentina), donde la ureasa descompone a la urea produciendo CO₂ y NH₃. Luego, este último compuesto reacciona con fenol e hipoclorito en un medio alcalino, generándose así el azul de indofenol, el cual se determina por espectrofotometría a una $\lambda = 540$ nm.

3.1.5.2 Determinación de la concentración de creatinina en muestras de plasma y orina

Para realizar las mediciones de los niveles de creatinina tanto en plasma como en orina, se empleó un kit comercial (Creatinina, Laboratorios Wiener, Rosario, Argentina). Se trata de un método colorimétrico donde la creatinina reacciona con picrato alcalino en un medio tamponado, obteniéndose un cromógeno que se mide a $\lambda = 510$ nm. Para la medición de creatinina en plasma, se realiza un paso previo de desproteización con ácido pícrico.

3.1.5.3 Determinación de la concentración de glucosa en orina

Los niveles de glucosa en orina fueron determinados utilizando un kit comercial (Glicemia, Laboratorios Wiener, Rosario, Argentina). Consiste en un método enzimático donde la glucosa de la muestra es convertida mediante la enzima glucosa oxidasa a ácido glucónico y H₂O₂, y luego el H₂O₂ reacciona con fenol y 4-aminofenazona para dar una quinona coloreada que es medida a $\lambda = 505$ nm.

3.1.5.4 Determinación de la concentración de proteínas totales en orina

El contenido de proteínas totales en orina se determinó espectrofotométricamente utilizando un kit comercial (Proti U/LCR, Laboratorios Wiener, Rosario, Argentina). Las proteínas en la muestra de orina reaccionan en medio ácido con el complejo Rojo de pirogalol, produciendo un compuesto coloreado que se mide a $\lambda=600$ nm.

3.1.5.5 Determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina en orina

La actividad de la fosfatasa alcalina en orina se determinó por espectrofotometría utilizando un kit comercial (Fosfatasa alcalina optimizada, Laboratorios Wiener, Rosario, Argentina). La metodología se basa en que la fosfatasa alcalina desdobra al fenilfosfato de sodio en medio alcalino tamponado. A raíz de esto, se libera fenol y éste se determina por reacción con 4-amino-antipirina y ferricianuro como agente oxidante. El color desarrollado es directamente proporcional a la actividad de la enzima y se mide a una $\lambda=520$ nm.

3.1.5.6 Determinación de la concentración de proteínas en tejido renal

La concentración de proteínas en tejido fue determinada mediante el método de Lowry con algunas modificaciones (Lowry y Col., 1951). Se trata de un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. Este método consta de dos etapas. En una primera etapa se añade un reactivo, conocido como reactivo alcalino, que contiene iones Cu^{2+} en medio alcalino, los cuales se unen a las proteínas formando complejos con los enlaces peptídicos. Luego, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de las proteínas, exponiendo así los residuos fenólicos de la tirosina y el triptófano. El Cu^{2+} se mantiene en solución alcalina en forma de su complejo con tartrato, que es otro de los componentes del reactivo alcalino. En una segunda etapa, se agrega el reactivo de Folin-Ciocalteu, donde en medio básico, se produce su reducción por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina presentes en las proteínas, actuando el cobre como catalizador. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido produce un complejo de color azul que se mide a $\lambda=600$ nm. La intensidad del color depende de la cantidad presente en las proteínas de estos aminoácidos aromáticos y será proporcional a la concentración de proteínas en la solución.

3.1.6 Estudios histopatológicos y de inmunohistoquímica

La histología permite el estudio de la anatomía microscópica de los tejidos y de las células. Dentro de los métodos histológicos podemos hallar a los que se basan en la observación directa de células y de tejidos vivos, o a los que estudian material muerto o inanimado. Sin embargo, los primeros métodos tienen aplicaciones limitadas: se torna difícil poder diferenciar los distintos componentes celulares entre sí, y en general el tejido vivo tiene un espesor que dificulta la penetración de la luz. Por esto, se utiliza tejido muerto para los estudios histológicos con mayor frecuencia.

Para realizar dicho tipo de estudios, en una primera instancia se somete al tejido a analizar al proceso de fijación, donde se ven interrumpidos los procesos de degradación que aparecen luego de la muerte celular y se intenta conservar la arquitectura tisular lo más similar a como se hallaba en el organismo vivo. Los fijadores estabilizan las proteínas al formar enlaces cruzados entre sus moléculas, como así también inactivan enzimas celulares que pueden conducir a la autodigestión y degeneración *post-mortem* del tejido. La fijación se lleva a cabo por perfusión del tejido por vía hematogena. De esta forma, se logra mantener todas las células de un órgano completo luego de interrumpir la administración de oxígeno y se obtiene una fijación más rápida y uniforme. Luego, el tejido fijado debe ser cortado en secciones delgadas para permitir así el paso de la luz. Las preparaciones para microscopía óptica suelen tener un espesor de 5-10 μm . Se necesita incluir al tejido fijado antes de cortarlo para darle una consistencia adecuada. Como medio de inclusión puede utilizarse parafina, pero como es un tipo de cera insoluble en agua, antes de incluir el tejido resulta necesario deshidratarlo. Posteriormente, la parafina junto con el tejido incluido forma un bloque sólido o “taco” que se secciona y dichas secciones se montan sobre portaobjetos.

Con el objetivo de visualizar los diferentes componentes tisulares con un microscopio óptico, se necesita tener un contraste entre ellos, para lograr diferenciarlos. Para esto, se realizan diferentes métodos de coloración, siendo el más utilizado el método de tinción con hematoxilina-eosina. La hematoxilina es un colorante básico de color azul que tiñe selectivamente los componentes ácidos, como los ácidos nucleicos y el retículo endoplasmático rugoso en el citoplasma. La eosina es un colorante de carácter ácido que colorea de color rosa a aquellos componentes básicos de la célula, como el citoplasma. Por lo tanto, la tinción con hematoxilina-eosina muestra la forma y la estructura del núcleo, y además la forma y extensión de la célula (Geneser, 2008).

Por otro lado, los métodos inmunohistoquímicos son uno de los más importantes utilizados en las investigaciones histológicas y biológicas celulares. Consisten en la identificación de un antígeno específico en un determinado tejido a través de su detección mediante el empleo de un anticuerpo específico contra dicho antígeno. Luego, la localización de dicho anticuerpo es visualizada mediante un sistema de detección enzimático o fluorescente apropiado. En la actualidad, existen numerosos protocolos disponibles, y su elección depende de la complejidad y el grado de sensibilidad requerida por el estudio. Pueden variar desde procedimientos sencillos de un solo paso, donde la marca se encuentra conjugada directamente al anticuerpo primario, o protocolos de múltiples pasos, donde la marca se encuentra en el anticuerpo secundario o a un complejo de avidina-biotina (Geneser, 2008).

Técnica experimental

Los animales pertenecientes a los diferentes grupos experimentales se anestesiaron; a continuación se perfundieron sus riñones con 20 mL de solución salina a fin de lavarlos, y luego con 10 mL de una solución de fijación compuesta por periodato-lisina-paraformaldehído (0,01 M NaIO₄, 0,075 M lisina, 0,0375 M *buffer* fosfato, con 2% de paraformaldehído, pH 6,20) a través de una cánula insertada en la aorta abdominal. Posteriormente, los riñones se extrajeron, se decapsularon, se seccionaron transversalmente y se colocaron en la solución de fijación a 4°C durante toda la noche. Al siguiente día, los mismos se deshidrataron, se embebieron en parafina y luego se cortaron para su montaje, en secciones de aproximadamente 4 a 6 µm de espesor, a fin de realizar estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos con microscopía óptica.

3.1.6.1 Estudios histopatológicos

Algunas de las secciones se desparafinizaron y procesaron con la tinción de rutina hematoxilina-eosina, con el fin de realizar los estudios de la estructura del tejido renal.

3.1.6.2 Estudios de inmunohistoquímica

Otro grupo de secciones, luego de ser también desparafinizadas, se sumergieron en una solución de H₂O₂ al 3% por 25 minutos (para inhibir la actividad de la peroxidasa endógena del tejido), y a continuación se colocaron en suero de bloqueo por 30 minutos. Posteriormente, las secciones se incubaron con un anticuerpo policlonal no comercial de conejo anti-Oat5 (diluido 1:100, Anzai y Col., 2005), toda la noche a 4°C, y luego se lavaron con *buffer* Tris salino con Tween 20 (TBST) (0,05 M Tris, 0,3 M NaCl, 0,1% Tween 20, pH 7,80). A continuación, las secciones se incubaron por 1 hora con un anticuerpo secundario comercial contra anticuerpo de conejo conjugado a peroxidasa de rabanita (Laboratorios BioRad, Hercules, CA, USA) y para su detección se empleó una solución sustrato de la peroxidasa con diaminobencidina (0,05% diaminobencidina en 0,05 M TBST con 0,05% H₂O₂). Como paso final, se realizó una contratinción con hematoxilina antes de ser examinadas con el microscopio óptico. Se procesaron en paralelo controles negativos con omisión del anticuerpo primario anti-Oat5, no observándose ninguna marcación.

3.1.7 Estimación de la velocidad de filtración glomerular mediante la determinación del *clearance* renal de creatinina

3.1.7.1 Empleo de jaulas metabólicas para estudios de *clearance* renal de creatinina

Las jaulas metabólicas comerciales son dispositivos que se utilizan para contener animales de experimentación, tales como la rata y el ratón, con el objetivo de recoger su orina libre de heces, proporcionando muestras puras y fiables. La orina es una muestra biológica de gran importancia que puede ser utilizada con el objetivo de hacer estudios bioquímicos, metabólicos, toxicológicos, nutricionales, urológicos y fisiológicos. El empleo de jaulas metabólicas permite recolectar orina pura sin contaminación de alimento o heces, obtener la muestra de manera no invasiva para el animal, y resulta además un procedimiento fácil y cómodo de realizar. En orina se pueden medir diferentes parámetros de interés, como ser niveles de proteínas, glucosa, bilirrubina, hemoglobina, urobilinógenos y creatinina, entre muchos otros. También con la ayuda de las jaulas metabólicas se puede recoger orina por un período de tiempo estipulado (como ser, por ejemplo, 12 o 24 horas), resultando de gran utilidad en los estudios de anomalías metabólicas y/o endocrinas, para la evaluación de

requerimientos nutricionales y metabólicos, como así también para la estimación de la excreción de un xenobiótico y/o de sus metabolitos. Además, esta metodología resulta útil para la investigación de la función renal en diferentes modelos de experimentación, ya que pueden realizarse estudios de la VFG a través de la estimación del *clearance* renal de creatinina (Kurien y Col., 2004).

Técnica experimental

Los animales fueron colocados individualmente en jaulas metabólicas un día antes del sacrificio, con el fin de recolectar orina, libre de heces y alimento, durante 24 horas. Durante dicho período, las ratas permanecieron en ayunas con libre acceso al agua. Se determinó el volumen de orina de 24 horas por gravimetría y luego se procedió a calcular el volumen minuto de orina (V_o), el cual se expresó como $\mu\text{L}/\text{min}/100 \text{ g p.c.}$

3.1.7.2 Estimación del *clearance* renal de creatinina

La VFG es un buen estimador del grado de funcionalidad renal y puede ser estimada a partir de técnicas de *clearance*. Para poder utilizar esta técnica, se necesita de una sustancia que sea libremente filtrada en los glomérulos, y que no resulte secretada ni reabsorbida por los túbulos renales. Por ende, la cantidad filtrada (CF) de dicha sustancia (llámese sustancia “A”) será igual a su cantidad excretada (CE). La CF es igual a la VFG multiplicada por su concentración plasmática ($[A]_p$), mientras que su CE es igual al volumen minuto de orina (V_o) por su concentración en orina ($[A]_o$):

$$CF = CE$$

$$VFG \times [A]_p = V_o \times [A]_o$$

Así:

$$VFG = (V_o \times [A]_o) / [A]_p \rightarrow Cl_A$$

Con lo cual la medida del *clearance* de la sustancia A (Cl_A) nos brindará una medida de la VFG.

Las sustancias que cumplen con estas premisas, para que puedan ser empleadas para la estimación de la VFG deberán además:

- no ser almacenadas, sintetizadas o metabolizadas por el riñón
- ser biológicamente inertes y atóxicas
- presentar un *clearance* constante en un amplio margen de concentraciones plasmáticas

La creatinina es un compuesto endógeno de desecho que se produce a una velocidad constante y que proviene del metabolismo de la creatina muscular, el cuál es eliminado por orina. Dado que la creatinina es un compuesto que resulta filtrado libremente en los glomérulos renales, que es pobremente secretado a nivel tubular y no resulta reabsorbido, su *clearance* renal resulta un buen estimador de la VFG (Di Loreto y Rigalli, 2009).

Técnica experimental

El *clearance* renal de creatinina (Cl_{cr}) fue determinado indirectamente, utilizando la fórmula convencional de *clearance*: $Cl_{cr} = (Cr_o \times V_o) / Cr_p$.

Para ello previamente, se debió calcular el V_o (ver ítem 3.1.7.1 de esta sección), determinar las concentraciones de creatinina en plasma (Cr_p) y en orina (Cr_o) (ver ítem 3.1.5.2 de esta sección).

3.1.8 Análisis de la excreción urinaria y de la expresión renal de Oat5

3.1.8.1 Preparación de homogenados y de membranas apicales de tejido renal

El riñón cumple un rol de vital importancia en la remoción de sustancias exógenas o endógenas por orina y en la reabsorción de compuestos de importancia a partir del filtrado glomerular. Los procesos de secreción y reabsorción de solutos orgánicos cargados ocurren principalmente en las células de los túbulos proximales, y su transporte es un proceso que requiere de proteínas transportadoras específicas (Wang y Sweet, 2013).

Para los estudios de expresión de proteínas transportadoras de membrana, tal como Oat5, resulta de interés poder evaluar tanto la expresión a nivel del homogenado del tejido en donde se expresa, como también en membranas aisladas donde la proteína se localiza y es funcional.

El aislamiento de de membranas renales, ya sea apicales o basolaterales, ha permitido la caracterización de una gran cantidad de sistemas de transporte bajo condiciones *in vitro* bien definidas.

La elección de un método de aislamiento de membranas dependerá de lo que quiera estudiarse en ellas. Para estudios de cinética, energética, identificaciones o modificaciones bioquímicas y para la reconstitución de un sistema de transporte en particular, se prefiere utilizar algún método de aislamiento rápido en donde se obtengan con un buen rendimiento vesículas cerradas que contengan a las membranas de interés. En este caso se aceptan pequeñas contaminaciones cruzadas, siempre y cuando éstas no contengan altas cantidades de los transportadores en estudio. Para estudios de localización de proteínas, se necesita de una metodología que separe de manera efectiva a todas las estructuras membranosas que podrían contener el sistema de transporte a analizar. En este segundo tipo de estudio la integridad de las membranas o el rendimiento no resulta de vital importancia.

A partir del tejido renal pueden hallarse una gran heterogeneidad de membranas. Por ende, es necesario tanto la correcta elección del método de aislamiento para obtener una fracción enriquecida con un tipo de membrana en particular, como también la separación anatómica de las diferentes zonas del riñón en función de la localización del sistema de transporte que se quiera analizar (Di Giusto y Torres, 2009).

Técnica experimental

Los homogenados y las membranas apicales renales se obtuvieron con el fin de evaluar la expresión de Oat5 en dichas preparaciones.

Las membranas apicales de riñón se aislaron por precipitación con Mg/EGTA según lo previamente descrito (Montagna y Col., 1998; Di Giusto y Col., 2009; Di Giusto y Torres, 2010). Para ello, los riñones se extrajeron quirúrgicamente de las ratas previamente anestesiadas, se decapsularon y lavaron con solución salina (9 g/L) a 4°C, y luego se secaron y pesaron. A continuación, se cortaron y se homogenizaron en un *buffer* compuesto por 50 mM manitol, 2mM Tris HCl (pH 7,10), 5 mM EGTA y 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), a 4°C, en una relación de 100 mL de *buffer* por cada 30 g de tejido renal. Dicho proceso se realizó en un homogenizador *Glas-Col* por un tiempo de 5 minutos a velocidad máxima. En este paso se obtuvieron los homogenados renales totales. De allí se tomó una alícuota, para analizar luego la abundancia de Oat5, y se almacenó a -80°C hasta su uso.

A continuación se agregó al homogenado $MgCl_2$ a una concentración final de 12 mM y se dejó agitando en frío durante 15 minutos. Luego se centrifugó a 3000 x g por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se centrifugó luego a 28000 x g por 40 minutos a 4°C. El *pellet* formado en este paso contiene a las membranas apicales. El mismo se resuspendió en un *buffer* “experimento” compuesto por 50 mM manitol, 10 mM Hepes Tris (pH 7,50) y 1 mM PMSF, y se centrifugó nuevamente a 800 x g por 15 minutos a 4°C. Por último, el sobrenadante fue centrifugado 28000 x g por 45 minutos a 4°C. Los *pellets* obtenidos en este paso se resuspendieron en *buffer* “experimento”, siendo la preparación de membranas apicales renales purificadas. Éstas luego se alicuotaron y conservaron a -80°C hasta ser utilizadas.

Las determinaciones de la concentración proteica en los homogenados y en las preparaciones de membranas apicales aisladas se realizaron empleando el método de Lowry con algunas modificaciones (Lowry y Col., 1951).

3.1.8.2 Aislamiento de exosomas urinarios

Existen numerosos mecanismos implicados en la liberación de proteínas de membrana hacia el espacio extracelular. Una de las principales vías descriptas a través de la cual las proteínas apicales de las células de los túbulos renales son excretadas hacia orina es la vía de excreción exosomal, que implica la liberación de dichas proteínas en exosomas hacia la orina en formación (Gonzales y Col., 2009; Esteva-Font y Col., 2010).

Los exosomas son nanovesículas de aproximadamente 40 a 100 nm de diámetro que se forman intracelularmente y se ubican dentro de cuerpos multivesiculares que luego se fusionan con la membrana plasmática, siendo así libreados al espacio extracelular. Se originan a partir de una gran variedad de células de diversos órganos y tejidos, y pueden ser hallados en fluidos biológicos, tales como orina y plasma, entre otros. En ellos, se han identificado proteínas derivadas del epitelio renal de células de todo el tracto urinario. Además, los exosomas urinarios proveen de una fracción enriquecida de la orina con proteínas que se hallan en baja abundancia en este fluido, donde muchas de ellas tienen significado fisiopatológico (Fang y Col., 2013; Alvarez y Col., 2013). Dos ejemplos de esto son las proteínas acuaporina 2 (AQP2) y el cotransportador $Na^+/K^+/2Cl^-$ (NKCC2), las cuales han sido halladas en exosomas urinarios y postuladas como potenciales biomarcadores de daño renal (en patologías como diabetes insípida nefrogénica autosómica dominante y recesiva, y el síndrome de Bartter prenatal tipo I, respectivamente) (Pisitkun y Col., 2004; Hoorn y Col., 2005).

Técnica experimental

El aislamiento de exosomas en orina se realizó siguiendo el protocolo de Pitsikun y Col. (2004), con algunas modificaciones. Luego de ser descongeladas, las orinas se agitaron vigorosamente y se les agregó como inhibidor de proteasas 100 mM PMSF. A continuación las mismas se centrifugaron a 17000 x g a 4°C, con el fin de remover células enteras y otros *debris* celulares. Luego, el sobrenadante se centrifugó a 200000 x g a 4°C por el lapso de 1 hora, utilizando para ello una ultracentrífuga Beckman Coulter Optima XL 100, con un rotor Ti 80. A continuación, el pellet obtenido se resuspendió en solución de aislamiento (10 mM trietanolamina, 250 mM sucrosa, 0,3 mM PMSF, pH 7,60).

La proteína Tamm-Horsfall es una proteína que se halla en abundancia en orina y forma complejos de un muy alto peso molecular. Estos complejos cosedimentan con los exosomas a 200000 x g si no son desnaturalizados previamente. A fin de eliminarlos, al pellet obtenido se lo incubó a 95°C por 2 minutos con el agente reductor ditioneitol (200 mg/mL DTT). Luego de esto, los pellets se colocaron en un tubo de ultracentrífuga y se agregó solución de aislamiento hasta llegar a un volumen adecuado para ser centrifugado nuevamente a 200000 x g a 4°C por una hora. Finalmente, los pellets se resuspendieron en solución de aislamiento, homogeneizando cuidadosamente, y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

3.1.8.3 Estudios de los niveles de Oat5 en tejido renal, en orina y en exosomas urinarios mediante *Western blotting*

La electroforesis en gel de poliacrilamida con el detergente dodecil sulfato sódico (SDS), también conocido como SDS-PAGE, permite la separación de una mezcla compleja de proteínas en bandas proteicas discretas, ordenadas de acuerdo a su peso molecular. Esto se debe a que las proteínas se colocan en una solución que contiene SDS. Éste se une a las regiones hidrofóbicas de las proteínas, haciendo que se desplieguen sus cadenas polipeptídicas, alterando sus conformaciones nativas, y por ello la mayoría de las proteínas tienden a adoptar formas similares. Además, las moléculas de detergente cargadas negativamente, al unirse en gran cantidad a cada molécula proteica, anulan su carga intrínseca y le confieren a todas las proteínas un cociente carga/masa similar. Por ende, si luego una mezcla proteica con SDS es colocada dentro de la matriz de poliacrilamida y se le aplica un voltaje, las proteínas se ven forzadas a migrar hacia el electrodo positivo a través de la matriz. Cuanto mayor sea el peso molecular que tenga una dada proteína, más resistencia le implicará

atravesar la matriz porosa, y es por ello que las proteínas o péptidos pequeños se desplazan más rápidamente que los de alto peso molecular.

Tras la resolución de una mezcla compleja en bandas proteicas discretas, puede resultar de interés identificar una proteína en particular. Para ello, puede emplearse la técnica conocida como *Western blotting*, donde, brevemente, en una primera instancia las proteínas presentes y separadas en el gel se transfieren a una membrana de nitrocelulosa, para luego ser incubada con un anticuerpo primario específico para la proteína de interés. A continuación, se suele exponer a la membrana a un segundo anticuerpo que se une a la región Fc del anticuerpo primario que quedó unido a la proteína blanco en la membrana. El anticuerpo secundario está acoplado a un sistema de detección, como ser una enzima fácilmente detectable, un isótopo radioactivo o una molécula fluorescente. Esta metodología no sólo permite la identificación de una proteína en particular en una muestra compleja, sino que también permite su cuantificación (Albers y Col., 2002).

Técnica experimental

Las muestras de homogenado renal total (20 µg), de membranas apicales renales (16 µg), de orinas (10 µL), y de exosomas urinarios (10 µL) se incubaron por 3 minutos a 100 °C en presencia de 2-mercaptoetanol 1% y SDS 2%. Las proteínas en dichas muestras se separaron por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (8,5%) y luego se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa por electrotransferencia por 1 hora. A continuación, las membranas se tiñeron con Rojo Ponceau para la verificación de igual carga y transferencia de proteínas, según lo que ha sido previamente descrito (Villar y Col., 2004, 2005; Brandoni y Col., 2006 a y b). A continuación, se incubaron por 1 hora en leche descremada al 5% preparada en *buffer* fosfato salino con Tween 20 (PBST) (80 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaHPO₄, 100 mM NaCl, 0,1% Tween 20, pH 7,50). Posteriormente se realizaron cuatro lavados con PBST y se incubaron durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario: anticuerpo no comercial de conejo anti-Oat5 de rata (en una dilución 1:800). La especificidad del anticuerpo anti-Oat5 ha sido descrito previamente (Anzai y Col., 2005). Posteriormente se le realizaron cuatro lavados más con PBST y se las dejó incubar por 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-inmunoglobulina de conejo, el cual se encuentra ligado a peroxidasa (Laboratorios Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

En último lugar, las membranas se revelaron utilizando para ello un *kit* comercial (ECL plus: Enhanced Chemiluminescence System plus; Amersham, Buckinghamshire, UK).

La intensidad de las bandas obtenidas se cuantificaron por densitometría utilizando para ello el programa GelPro Analyzer (media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Para esto, las muestras correspondientes a los animales con los diferentes tratamientos se corrieron en cada gel junto con las muestras de sus correspondientes animales controles. La abundancia de Oat5 en las muestras de homogenados y de membranas apicales renales de cada grupo tratado se calculó como porcentaje del valor promedio del grupo control para ese gel. Para el cálculo de la abundancia de Oat5 en orina y en exosomas urinarios, cada valor, luego de ser normalizado por la concentración de creatinina en orina correspondiente, se expresó como porcentaje del valor promedio del grupo control.

3.2 MATERIALES

Las drogas utilizadas en los experimentos, con excepción del cisplatino, son marca Sigma (St. Louis, MO, USA), de calidad analítica pura. El cisplatino empleado pertenece a los Laboratorios Filaxis (Buenos Aires, Argentina).

El anticuerpo no comercial policlonal de conejo anti-Oat5 utilizado en la técnica de inmunohistoquímica y de *Western blotting* fue gentilmente cedido por el profesor H. Endou (Kyorin University School of Medicine, Tokyo, Japón).

3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las diferencias estadísticas entre los grupos fueron evaluadas mediante el test de ANOVA plus *Newman-Keuls*, cuando más de dos grupos experimentales fueron comparados. Por otra parte, se utilizó un test *t de Student* para muestras no apareadas cuando se compararon dos grupos experimentales, y cuando las variancias no fueron homogéneas, se realizó la *corrección de Welch*. Los valores considerados significativos fueron aquellos obtenidos con p menores a 0,05. Los resultados fueron expresaron como “media \pm error estándar medio” (SEM). Para los análisis se utilizó el software GraphPad (Version3, San Diego, CA, USA).

4. RESULTADOS

4.1 EXCRECIÓN URINARIA DE OAT5 EN UN MODELO DE INSUFICIENCIA RENAL AGUDA INDUCIDA POR CISPLATINO

En trabajos previos se ha descrito un aumento de la excreción urinaria de Oat5 en modelos animales de insuficiencia renal aguda (IRA) de distintos orígenes, tales como inducidos por isquemia (Di Giusto y Col., 2009) y por nefrotoxicidad causada por cloruro mercúrico (Di Giusto y Torres, 2010). En base a estas evidencias previas, se decidió en una primera instancia, evaluar si la excreción urinaria de Oat5 también se encuentra modificada en un modelo de IRA inducido por cisplatino.

4.1.1 Caracterización del modelo de insuficiencia renal aguda inducida por cisplatino

En primer lugar, se realizó una búsqueda bibliográfica con el motivo de hallar una dosis y vía de administración de cisplatino adecuada, con el objetivo de producir un cuadro de IRA en ratas Wistar macho adultas. En base a esto, se decidió comenzar a trabajar con una única dosis de cisplatino de 10 mg/kg de peso corporal (p.c.), administrada por vía intraperitoneal (i.p.), dos días antes de que se realicen los experimentos pertinentes (grupo **Cis10 2d**) (Yokoo y Col., 2007; Ajith y Col., 2007; Morisaki y Col., 2008; Santos y Col., 2008). Por otra parte, si bien el cisplatino es administrado por vía intravenosa (i.v.) en terapias oncológicas en humanos, en nuestro modelo experimental hemos elegido como vía de administración del antineoplásico a la vía i.p., ya que ha sido previamente demostrado por Vadie y Col. (1992) que produce valores plasmáticos de cisplatino similares a los observados tras la administración i.v. en ratas. Al mismo tiempo, la vía i.p. es técnicamente más sencilla de realizar que la vía i.v. en estos animales.

Con el objetivo de caracterizar del modelo de insuficiencia renal aguda inducida por cisplatino, en primer lugar se analizó y comparó la pérdida de peso a causa del tratamiento en los animales pertenecientes al grupo **Control** y **Cis10 2d**, como así también el peso renal, la relación peso renal/peso corporal y el volumen minuto de orina en ambos grupos experimentales. Como se muestra en la **Tabla 4.1**, los animales tratados con cisplatino presentaron una mayor pérdida de peso tras dos días de su administración que los animales

controles. La disminución de peso causada por la administración de cisplatino en ratas, ya ha sido descrita por otros autores (Yokoo y Col., 2007; Ali y Col. 2008; Abdelrahman y Col., 2010; Palipoch y Punsawad, 2013).

Tanto el peso renal, como la relación peso renal/peso corporal y el volumen minuto de orina en las ratas pertenecientes al grupo **Cis10 2d** no mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo **Control**, si bien el volumen minuto de orina en los animales tratados mostró una tendencia al aumento (ver *Tabla 4.1*).

La pérdida de peso observada en los animales tratados con cisplatino podría deberse posiblemente a uno de los efectos adversos de este antineoplásico, como ser la diarrea, lo cual fue observado en los animales tratados. Al respecto, se ha descrito que los cuadros de diarrea se manifiestan en un 67% de los pacientes que reciben tratamiento con cisplatino. Por otro lado, en un trabajo llevado a cabo por Bearcroft y Col. (1999), se ha demostrado que altas dosis de cisplatino reducen la absorción neta de fluidos y electrolitos en el yeyuno en ratas. La excesiva pérdida de fluidos podría ser una de las causantes de la pérdida de peso observada en estos animales. Tampoco hay que perder de vista que el daño tubular observado en los animales tratados podría conllevar a la subsecuente pérdida de la capacidad de sus células de reabsorber agua, y producir deshidratación y pérdida de peso (Ali y Col., 2008).

Por otra parte, la disminución observada en el peso corporal en los animales controles se debió a la privación de alimento que se les produjo cuando estuvieron alojadas en jaulas metabólicas por 24 horas, tal como ya ha sido descrito por diferentes autores (Chatamra y Col., 1984; al-Awadi y al-Adnani, 1989; Claassen, 1994; Vermeulen y Col., 1997; McDuffie y Col., 2013). En relación a esto, en otros experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio, hemos corroborado que ratas inyectadas con el vehículo del cisplatino en el día 0 de los experimentos, y que luego no fueron colocadas en jaulas metabólicas (y que por ende no fueron privadas de alimento) no mostraron una disminución significativa en su peso corporal luego de dos días. Por el contrario, mostraron un pequeño incremento del mismo (+21 %) (Estos datos no se incluyen en este trabajo de Tesis).

	Control (n=4)	Cis10 2d (n=4)
Peso inicial (g)	407,5 ± 3,3	409,2 ± 3,9
Peso final (g)	383,8 ± 2,3	367,6 ± 3,7 *
% de Peso perdido con el tratamiento	5,81 ± 0,65	10,17 ± 0,12 *
Peso renal (g)	2,57 ± 0,08	2,54 ± 0,05
Peso renal / Peso corporal (x10 ⁻³)	6,70 ± 0,20	6,90 ± 0,20
Vo (μL/min/100g)	2,60 ± 0,27	3,31 ± 0,20

Tabla 4.1: *Peso inicial (g), Peso final (g), % de Peso perdido con el tratamiento, relación Peso renal / Peso corporal y volumen minuto de orina (Vo, μL/min/100g) de animales pertenecientes al grupo Control y al grupo Cis10 2d. (*) p < 0,05.*

*El % de Peso perdido con el tratamiento se calculó como: $-(Peso_{final} - Peso_{inicial}) / Peso_{inicial} * 100$.*

Tal como se ha mencionado en ítem 1.3.3 de la sección “Introducción”, los niveles plasmáticos de urea y creatinina son uno de los marcadores de daño renal más empleados en la actualidad para diagnosticar la IRA. A raíz de ello, se procedió a analizar los niveles de urea y creatinina en plasma tanto en los animales tratados como en los animales controles. Como puede observarse en las **Figuras 4.1 (A)** y **(B)**, los animales pertenecientes al grupo **Cis10 2d** mostraron un importante y significativo aumento de ambos parámetros.

Por otro lado, también fue evaluado el *clearance* renal de creatinina a modo de estimar la VFG, tal como se describe en el ítem 3.1.7.2 de la sección “Materiales y Métodos”. Los animales tratados con cisplatino mostraron una marcada disminución en este parámetro, con respecto a los valores controles (**Figura 4.1 (C)**). Estos resultados, en conjunto con el análisis de los niveles plasmáticos de urea y creatinina, estarían reflejando una disfunción renal severa dos días luego de la administración 10 mg/kg i.p. de cisplatino.

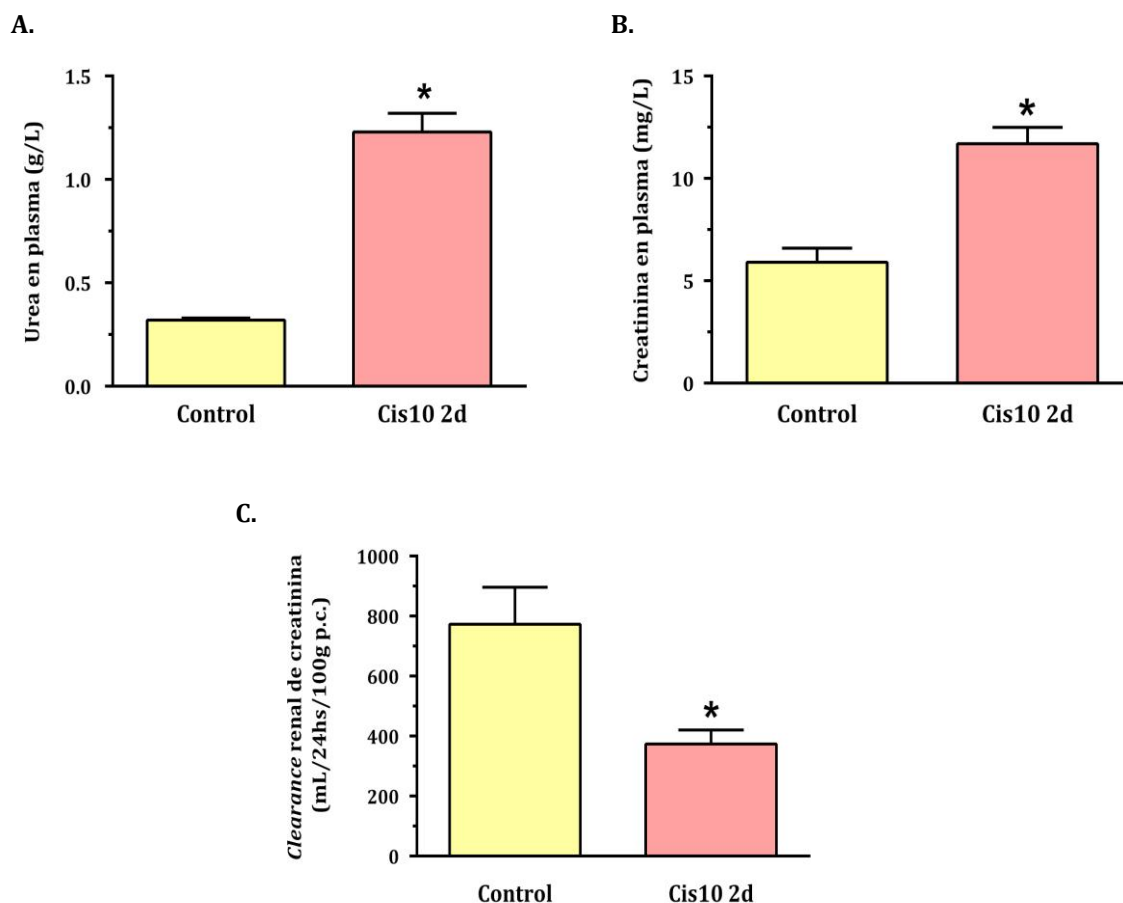


Figura 4.1: Niveles plasmáticos de (A) urea (g/L) y de (B) creatinina (mg/mL), y (C) clearance renal de creatinina (mL/24 hs/100g p.c.) en ratas pertenecientes al grupo Control y al grupo Cis10 2d. (*) $p < 0,05$.

Por otra parte, se realizaron estudios histopatológicos del tejido renal a través de la tinción de rutina con hematoxilina-eosina de cortes renales pertenecientes a ambos grupos experimentales. Como puede verse en la **Figura 4.2 (B)**, el grupo **Cis10 2d** presentó alteraciones tubulares de relevancia en los túbulos proximales, tales como una marcada dilatación tubular, descamación celular y desprendimiento de las células de la membrana basal, comparado con lo observado en la morfología renal de los animales controles (**Figura 4.2 (A)**). Dichos hallazgos concuerdan con lo descrito en la bibliografía (Yokoo y Col., 2007; Hosohata y Col., 2012; Palipoch y Punsawad, 2013).

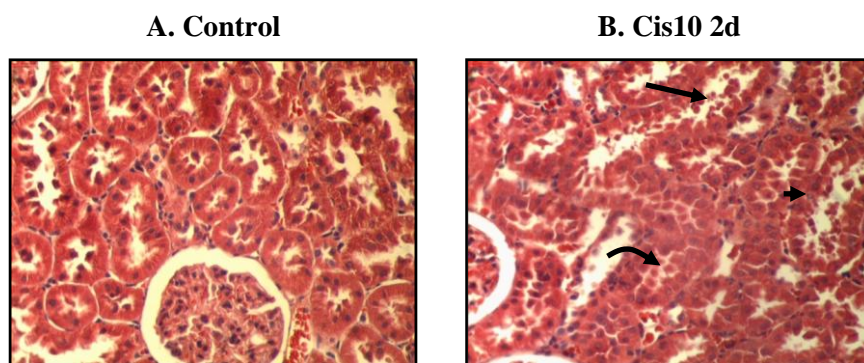


Figura 4.2: Microscopía óptica de cortes histológicos renales en los grupos (A) Control y (B) Cis10 2d. En la figura (B) se indica dilatación tubular (cabeza de flecha), descamación celular (flecha) y desprendimiento de las células de la membrana basal (flecha arqueada). Imágenes representativas de una serie de muestras de cuatro riñones por cada grupo experimental. Magnificación 200x.

A continuación, se evaluaron diferentes parámetros en orina, como ser los niveles de proteínas totales y glucosa, y la actividad de fosfatasa alcalina en orina. En la **Figura 4.3** puede apreciarse que la administración de cisplatino causó un importante incremento en los niveles urinarios de los tres parámetros, con respecto a lo observado en los animales controles.

Los valores obtenidos para estos parámetros fueron relacionados a la creatinina urinaria para corregir las variaciones en la producción de orina que pueden ser detectadas entre diferentes individuos y hasta en un mismo individuo en el tiempo. Las posibles alteraciones en la excreción urinaria de agua pueden diluir o concentrar a cualquier biomarcador en orina. La normalización basada en los niveles totales de proteínas generalmente no resulta satisfactoria, ya que la excreción de proteínas totales puede variar ampliamente bajo diferentes situaciones patológicas. Además, el método de normalización por la cantidad de creatinina en orina asume que este compuesto es excretado a velocidades relativamente constantes a través del tiempo entre los diferentes individuos, y ha sido demostrado por diferentes autores que este método de corrección introduce menos error que la corrección por el flujo urinario. Por ende, la normalización de los niveles urinarios de diferentes biomarcadores, tales como enzimas, transportadores o cantidad de proteínas totales y glucosa por la cantidad de creatinina en orina es un metodología aceptada y avalada por numerosos estudios científicos (Abdelrahman y Col., 2010; Vinken y Col., 2012; Pinches y Col., 2012c; Hosohata y Col., 2012; Sinha y Col., 2013; McDuffie y Col., 2013; Bouvet y Col., 2014).

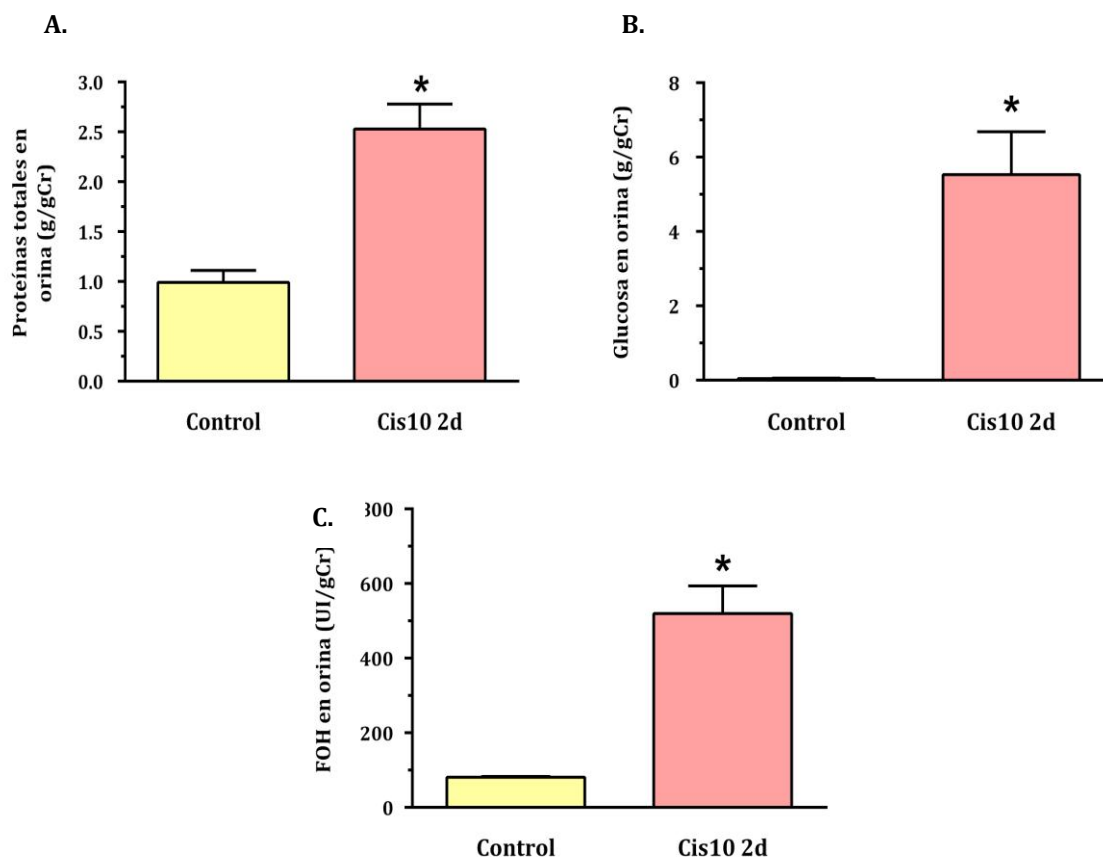


Figura 4.3: Niveles urinarios de (A) proteínas totales (g/g Cr) y (B) glucosa (g/g Cr), y (C) actividad de fosfatasa alcalina en orina (FOH, UI/g Cr), normalizados a los valores de la creatinina urinaria en ratas pertenecientes al grupo Control y Cis10 2d. (*) $p < 0,05$.

4.1.2 Evaluación de la excreción urinaria de Oat5 en el modelo de insuficiencia renal aguda inducida por cisplatino

Luego se procedió a determinar la abundancia de Oat5 en orina, lo cual se realizó mediante la técnica de *Western blotting*, utilizando para ello un anticuerpo no comercial anti-Oat5.

Una banda inmunoreactiva de aproximadamente 72 kDa fue detectada en orina, tal como ya se ha descrito previamente en la bibliografía (Di Giusto y Col., 2009; Breljak y Col., 2010; Di Giusto y Torres, 2010). Las bandas obtenidas fueron analizadas por densitometría y el resultado obtenido, expresado en unidades arbitrarias, fue corregido por las concentraciones urinarias de creatinina correspondientes en cada caso, tal como ha sido descrito en el ítem 4.1.1 de esta sección, y como ya ha sido descrito para numerosos biomarcadores en orina. Como puede entonces observarse en la **Figura 4.4**, la abundancia relativa de Oat5 en orina se encontró significativamente aumentada en los animales **Cis10 2d**, siendo este aumento de aproximadamente un 686% con respecto a los valores en el grupo **Control**.

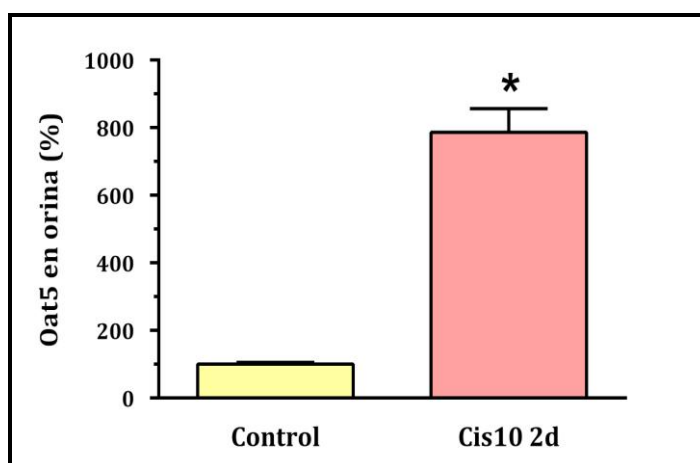


Figura 4.4: Abundancia de Oat5 en orina. Análisis densitométrico de las bandas inmunoreactivas de Oat5 normalizado con la concentración de creatinina en orina en los grupos Control y tratado Cis 10 2d. Los valores han sido expresados como porcentajes, considerándose el nivel del grupo Control como el 100%. Cada columna de la figura representa la media aritmética \pm SEM de los experimentos llevados a cabo en cuatro preparados distintos para cada grupo experimental. (*) $p < 0,05$.

Los resultados expuestos en la primera parte de este trabajo de Tesis muestran que los parámetros tradicionalmente empleados para evaluar la función renal, tales como los niveles plasmáticos de urea y creatinina, el *clearance* renal de creatinina, los niveles urinarios de proteínas totales y glucosa o actividad de fosfatasa alcalina en orina se encontraron alterados de manera significativa dos días después de que los animales recibieran una única dosis de cisplatino de 10 mg/kg p.c. por vía i.p.. Estos resultados estarían de acuerdo a lo observado mediante los estudios histopatológicos en los animales **Cis10 2d**, los cuales indicaron importantes alteraciones a nivel de la morfología renal, tal como ha sido descrito para este modelo experimental de IRA nefrotóxica.

Además, se ha podido evidenciar un importante aumento en la excreción urinaria de Oat5 en los animales con daño renal causado por el antineoplásico en cuestión. A raíz de ello, entonces nos preguntamos *si la excreción urinaria de Oat5 también se encuentra aumentada a dosis más bajas de cisplatino.*

4.2 EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN RENAL, LA EXCRECIÓN URINARIA Y LA EXPRESIÓN RENAL DE OAT5 EN RATAS TRATADAS CON DIFERENTES DOSIS DE CISPLATINO

4.2.1 Evaluación de la función renal en ratas tratadas con diferentes dosis de cisplatino

Para poder realizar estudios en función de la dosis de cisplatino se adicionaron a los grupos **Control** y **Cis10 2d** tres nuevos grupos de ratas tratadas con dosis de 1, 2 y 5 mg/kg p.c., i.p., también con 2 días de tratamiento (**Cis1 2d**, **Cis2 2d** y **Cis5 2d**, respectivamente), tal como se describe en el ítem 3.1.2.2 de la sección “Materiales y Métodos”. Estas dosis fueron seleccionadas considerando su relación con las dosis utilizadas en la clínica para la quimioterapia en humanos y su toxicidad relativa, ya que roedores y humanos desarrollan nefrotoxicidad a dosis comparables (Dobyan y Col., 1980; Vadiey y Col., 1992; Bearcroft y Col., 1999; dos Santos y Col., 2007; Aleksunes y Col., 2008 Pinches y Col., 2012 a, b, c; Hosohata y Col., 2012).

Como puede observarse en la **Tabla 4.2**, todos los animales tratados con cisplatino presentaron una disminución significativa de su peso corporal con el tratamiento (indicado como % de peso perdido con el tratamiento), lo cual es coherente con los resultados obtenidos por otros autores para las diferentes dosis del antineoplásico ensayadas aquí (Morisaki y Col., 2008; Ali y Col., 2008; Vinken y Col., 2012). Por otro lado, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la relación peso renal/peso corporal y en el volumen minuto de orina en ninguno de los grupos tratados con cisplatino, con respecto a lo observado en los animales controles.

	Control (n=4)	Cis1 2d (n=4)	Cis2 2d (n=4)	Cis5 2d (n=4)	Cis10 2d (n=4)
Peso inicial (g)	407,5 ± 3,3	397,7 ± 6,9	399,9 ± 11,9	397,3 ± 2,0	409,2 ± 3,9
Peso final (g)	383,8 ± 2,3	366 ± 7,7	363,5 ± 5,4	363,2 ± 4,9	367,6 ± 3,7
% de Peso perdido con el tratamiento	5,81 ± 0,65	7,97 ± 0,69 ^{a,e}	9,10 ± 0,27 ^a	8,58 ± 0,40 ^a	10,17 ± 0,12 ^{a,b}
Peso renal (g)	2,57 ± 0,08	2,60 ± 0,04	2,47 ± 0,07	2,47 ± 0,06	2,54 ± 0,05
Peso renal / Peso corporal (x10⁻³)	6,70 ± 0,20	7,10 ± 0,10	6,80 ± 0,10	6,80 ± 0,20	6,90 ± 0,20
Vo (μL/min/100g)	2,60 ± 0,27	2,56 ± 0,28	2,93 ± 0,28	2,92 ± 0,35	3,31 ± 0,20

Tabla 4.2: *Peso inicial (g), Peso final (g), % de Peso perdido con el tratamiento, relación Peso renal / Peso corporal y volumen minuto de orina (Vo, μL/min/100g) de animales pertenecientes a los grupos Control, Cis1 2d, Cis2 2d, Cis5 2d y Cis10 2d. (a) p < 0,05 vs Control, (b) p < 0,05 vs Cis1 2d, (c) p < 0,05 vs Cis2 2d, (d) p < 0,05 vs Cis5 2d, (e) p < 0,05 vs Cis10 2d.*

*El % de Peso perdido con el tratamiento se calculó como: $-(\text{Peso}_{\text{final}} - \text{Peso}_{\text{inicial}}) / \text{Peso}_{\text{inicial}} * 100$.*

A continuación, se analizaron parámetros de función renal en los diferentes grupos experimentales. Como se muestra en la **Figura 4.5**, los animales pertenecientes a los grupos **Cis1 2d**, **Cis2 2 d** y **Cis5 2d** no mostraron diferencias estadísticamente significativas en los valores plasmáticos de urea y de creatinina con respecto al grupo **Control**, como tampoco en el *clearance* renal de creatinina. Por el contrario, los animales tratados con la mayor dosis de cisplatino, **Cis10 2d**, sí mostraron importantes modificaciones en los tres parámetros estudiados, tal como se describió en el ítem 4.1.1 de esta sección. Estos resultados entonces estarían demostrando que luego de dos días de tratamiento sólo se evidencia un cuadro de IRA en los animales tratados con 10 mg/kg p.c., i.p. de cisplatino.

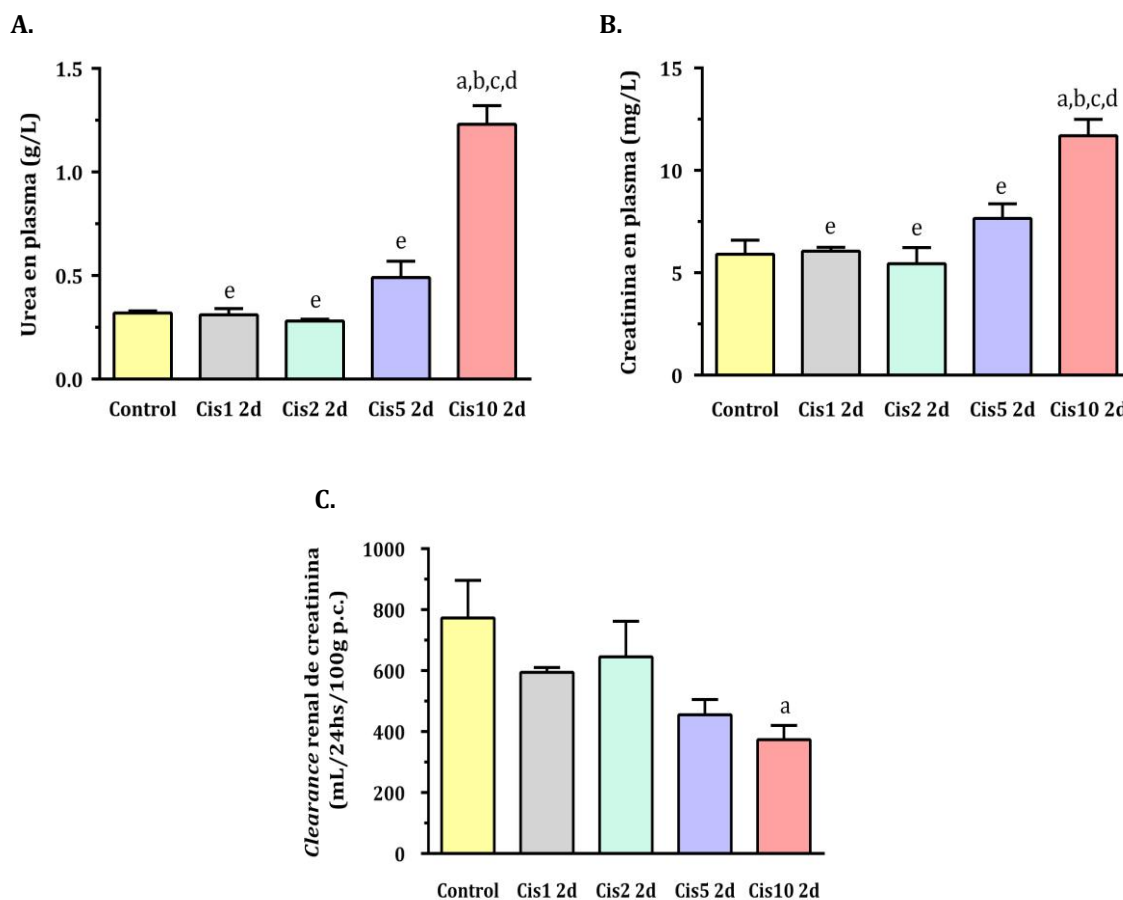


Figura 4.5: Niveles plasmáticos (A) de urea (g/L) y de (B) creatinina (mg/mL), y (C) clearance renal de creatinina (mL/24 hs/100g p.c.) en ratas pertenecientes al grupo Control y a los grupos tratados Cis1 2d, Cis2 2d, Cis5 2d y Cis10 2d. (a) $p < 0,05$ vs Control, (b) $p < 0,05$ vs Cis1 2d, (c) $p < 0,05$ vs Cis2 2d, (d) $p < 0,05$ vs Cis5 2d, (e) $p < 0,05$ vs Cis10 2d.

En todos los grupos experimentales se realizaron además estudios histopatológicos de tejido renal. En la **Figura 4.6**, se observan las fotografías de la microscopía óptica de los cortes histológicos de los diferentes grupos experimentales. Allí, puede apreciarse que sólo en el grupo **Cis10 2d** fueron halladas alteraciones histológicas de relevancia, como ser dilatación tubular, descamación celular y desprendimiento de las células de la membrana basal, tal como fue descrito en el ítem 4.1.1 de esta sección, no observándose alteraciones morfológicas de significancia en los grupos tratados con menores dosis de cisplatino, **Cis1 2d**, **Cis2 2d** y **Cis5 2d**. En la figura **Figura 4.6 (A)** puede observarse la histología renal de las ratas controles, donde la morfología se encontró conservada.

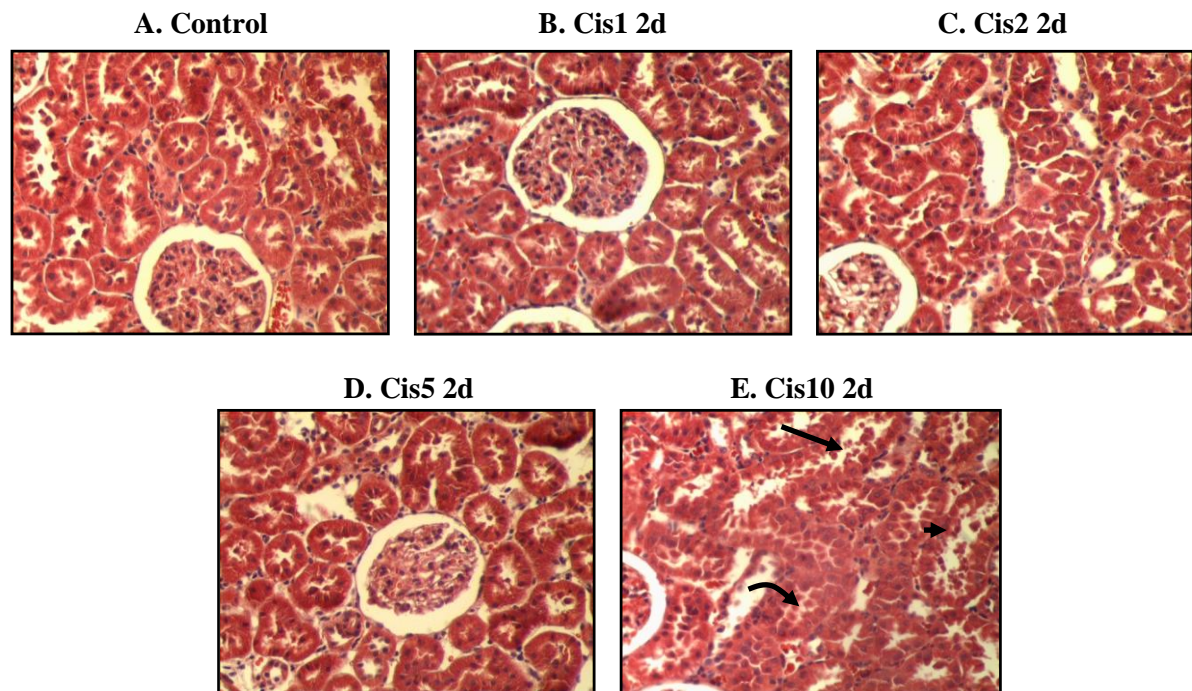


Figura 4.6: Microscopía óptica de cortes histológicos renales en los grupos (A) Control y tratados (B) Cis1 2d, (C) Cis2 2d, (D) Cis5 2d y (E) Cis10 2d. Dilatación tubular (cabeza de flecha), descamación celular (flecha) y desprendimiento de las células de la membrana basal (flecha curva). Imágenes representativas de una serie de muestras de cuatro riñones por cada grupo en estudio. Magnificación: 200x.

En los diferentes grupos tratados con dosis crecientes de cisplatino también se midieron y compararon los niveles urinarios de proteínas totales, glucosa y actividad de fosfatasa alcalina en orina. En la **Figura 4.7** se muestra que sólo en el grupo **Cis10 2d** se produjeron aumentos de relevancia estadística en los niveles urinarios de los tres parámetros.

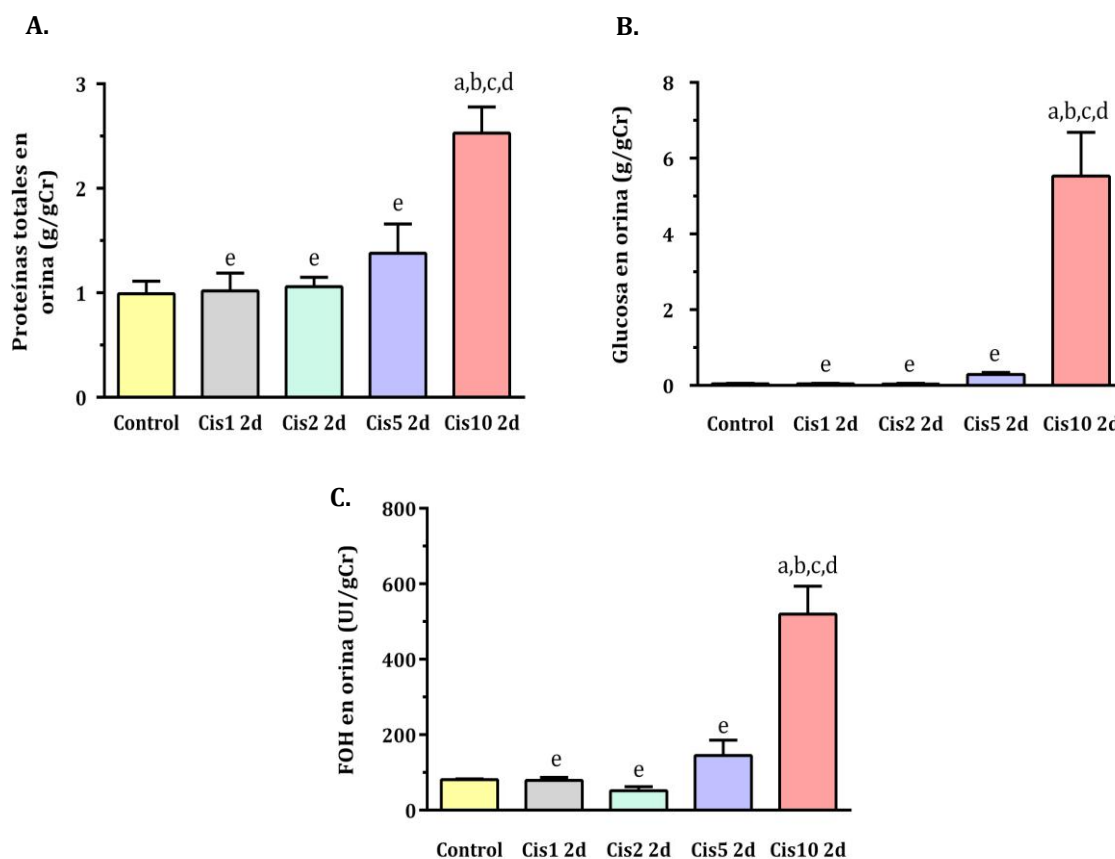


Figura 4.7: Niveles urinarios de (A) proteínas totales (g/g Cr) y (B) glucosa (g/g Cr), y (C) actividad de fosfatasa alcalina en orina (FOH, UI/g Cr), normalizados a los valores de la creatinina urinaria en ratas pertenecientes a los grupos Control y tratados con cisplatino Cis1 2d, Cis2 2d, Cis5 2d y Cis10 2d. (a) $p < 0,05$ vs Control, (b) $p < 0,05$ vs Cis1 2d, (c) $p < 0,05$ vs Cis2 2d, (d) $p < 0,05$ vs Cis5 2d, (e) $p < 0,05$ vs Cis10 2d.

4.2.2 Evaluación de la excreción urinaria de Oat5 en ratas tratadas con diferentes dosis de cisplatino

Luego, tal como se planteó, una vez analizada la función renal en ratas tratadas con dosis crecientes de cisplatino, se procedió a evaluar la excreción urinaria de Oat5 en todos los grupos experimentales. Como se puede apreciar en la **Figura 4.8**, la excreción urinaria de Oat5 aumentó significativamente en todos los animales tratados, con respecto a lo observado en los animales controles. El incremento hallado fue dosis-dependiente de cisplatino, observándose aumentos de alrededor del 165, 326, 593 y 686% en los grupos **Cis1 2d**, **Cis2 2d**, **Cis5 2d** y **Cis10 2d**, respectivamente, con respecto al valor control.

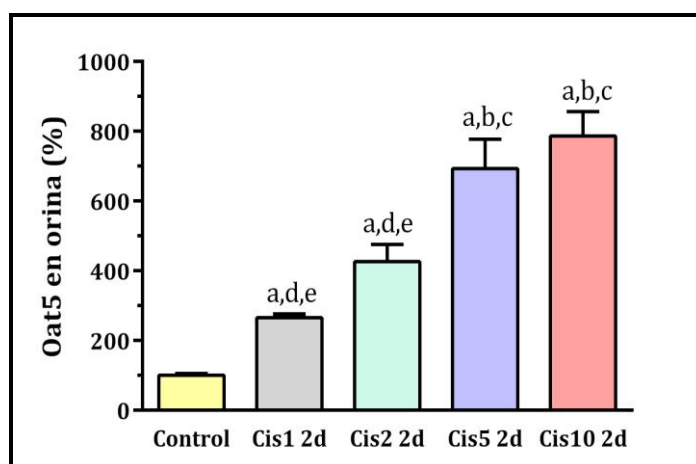


Figura 4.8: Abundancia de Oat5 en orina. Análisis densitométrico de las bandas inmunoreactivas de Oat5 corregidas por la concentración de creatinina en orina de los animales pertenecientes a los grupos Control y tratados Cis1 2d, Cis2 2d, Cis5 2d y Cis10 2d. Los valores se han expresado como porcentajes, considerándose el nivel del grupo Control como el 100%. Cada columna de la figura representa la media aritmética \pm SEM de los experimentos llevados a cabo en cuatro preparados distintos para cada grupo experimental. (a) $p < 0,05$ vs Control, (b) $p < 0,05$ vs Cis1 2d, (c) $p < 0,05$ vs Cis2 2d, (d) $p < 0,05$ vs Cis5 2d, (e) $p < 0,05$ vs Cis10 2d.

4.2.3 Expresión renal de Oat5 en ratas tratadas con diferentes dosis de cisplatino

4.2.3.1 Estudios de la expresión renal de Oat5 mediante Western blotting

Con el objetivo de indagar acerca de los mecanismos involucrados en el aumento de la excreción urinaria de Oat5 en los animales tratados con cisplatino, se procedió al análisis de la expresión renal de dicho transportador. Para ello, los homogenados de riñón total y las membranas apicales renales aisladas de los diferentes grupos experimentales fueron sujetas a *Western blotting*, y en todos los casos fue detectada una banda inmunorreactiva de 72 kDa para Oat5, tal como se describe en la bibliografía (Di Giusto y Col., 2009; Breljak y Col., 2010; Di Giusto y Torres, 2010). En la **Figura 4.9** se muestran los resultados obtenidos. Tanto a nivel de homogenado como de membranas apicales renales se halló una disminución en la expresión de Oat5 en todos los animales tratados. Esta disminución observada fue dosis-dependiente de cisplatino en ambas preparaciones. En el caso de los homogenados renales, las disminuciones halladas fueron de alrededor de un 17, 26 y un 36% para los grupos **Cis2 2d**, **Cis5 2d** y **Cis10 2d**, respectivamente, con respecto al grupo **Control**, no hallándose una

disminución significativa en el grupo tratado con la menor dosis de cisplatino (**Cis1 2d**) (ver **Figura 4.9 (A)**). La expresión de Oat5 a nivel de membrana apical disminuyó aproximadamente en un 15, 49, 52 y 63% en los grupos **Cis1 2d**, **Cis2 2d**, **Cis5 2d** y **Cis10 2d**, respectivamente (**Figura 4.9 (B)**).

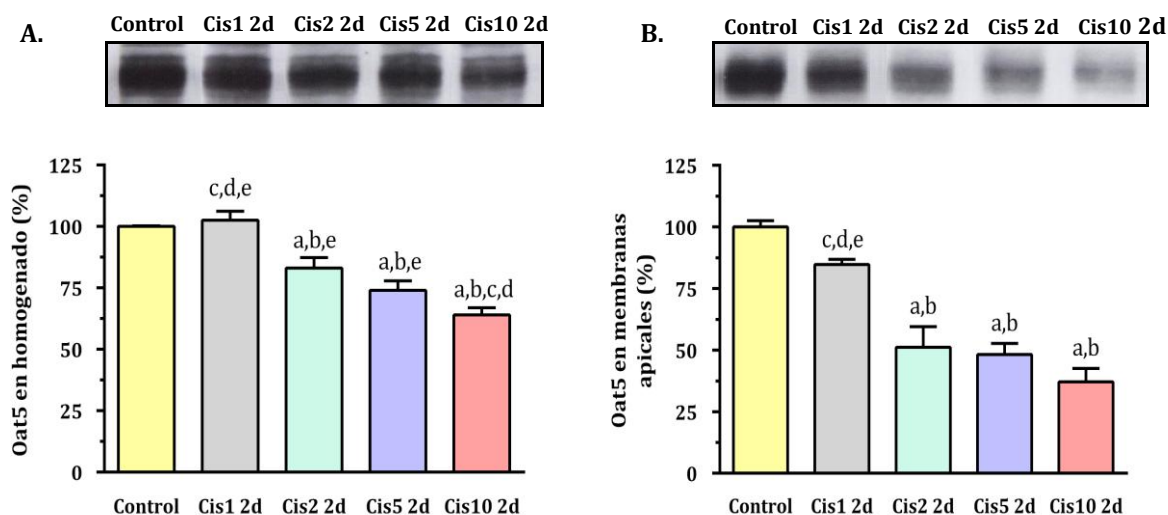


Figura 4.9: Bandas inmunorreactivas y análisis densitométrico correspondiente a la proteína Oat5 en (A) homogenados renales (20 µg) y (B) en membranas apicales renales (16 µg) de los grupos Control y tratados Cis1 2d, Cis2 2d, Cis5 2d y Cis10 2d. Los valores se han expresado como porcentajes, considerándose el nivel del grupo Control como el 100%. Cada columna de la figura representa la media aritmética \pm SEM de los experimentos llevados a cabo en cuatro preparados distintos para cada grupo experimental. (a) $p < 0,05$ vs Control, (b) $p < 0,05$ vs Cis1 2d, (c) $p < 0,05$ vs Cis2 2d, (d) $p < 0,05$ vs Cis5 2d, (e) $p < 0,05$ vs Cis10 2d.

4.2.3.2 Estudios de la expresión renal de Oat5 mediante inmunohistoquímica

Por último, se analizó la expresión de Oat5 a través de estudios comparativos de inmunohistoquímica en tejido renal perteneciente a los diferentes grupos experimentales. Para ello, un anticuerpo no comercial anti-Oat5 fue empleado, tal como se describió en el ítem 3.1.6.2 de la sección “Materiales y Métodos”. Como se indica en la **Figura 4.10 (A)**, Oat5 presenta una clara marcación a nivel de membrana apical de los túbulos proximales renales, sitio donde esta proteína es funcional, tal como ya ha sido descrito (Anzai y Col., 2005; Di Giusto y Torres, 2010). La marcación se encontró disminuida en los todos los grupos tratados con cisplatino, con respecto a lo observado para el grupo **Control (Figura 4.10)**,

corroborando así de manera cualitativa lo hallado previamente a través de *Western blotting* para la expresión renal de Oat5 (ítem 4.2.3.1 de esta sección).

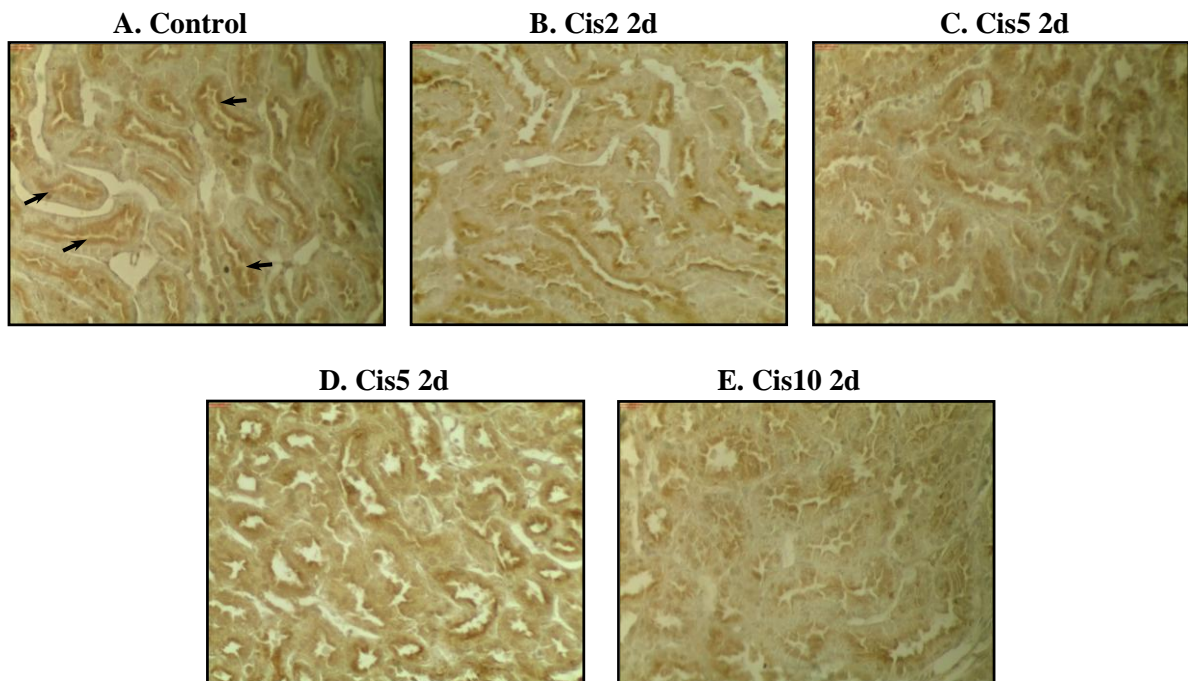


Figura 4.10: Inmunohistoquímica para la proteína Oat5 en tejido renal de ratas pertenecientes a los grupos (A) Control y tratados (B) Cis1 2d, (C) Cis2 2d, (D) Cis5 2d y (E) Cis10 2d. En la figura (A) se indica la marcación de Oat5 a nivel de la membrana apical de las células de túbulo proximal renal (flecha). Estas imágenes son representativas de una serie de cuatro muestras para cada grupo experimental. Aumentos del 200x.

En base a los resultados obtenidos, hemos entonces evidenciado que los parámetros tradicionalmente empleados para evaluar el daño renal sólo encontraron modificados de manera significativa en los animales tratados con 10 mg/kg p.c., i.p. de cisplatino, mientras que la excreción urinaria de Oat5 aumentó en todas las dosis ensayadas, manifestándose incrementada a dosis tan bajas como ser de 1 mg/kg p.c., i.p. de cisplatino.

Hasta lo que hemos llegado a evaluar aquí, la dosis de 1 mg/kg p.c., i.p. de cisplatino no estaría produciendo daño renal a los dos días de su administración. Sin embargo, en otro trabajo donde han empleado esta misma dosis del antineoplásico (administrada por la misma vía) y han realizado estudios de función renal en el tiempo en ratas, por un período de cuatro semanas, han hallado que dicha dosis es capaz de producir IRA. Al respecto, el cuadro de IRA fue puesto en evidencia por alteraciones histológicas de relevancia a nivel de los túbulos proximales renales y por incrementos en los niveles de nitrógeno ureico en sangre, tres días y una semana y media luego de la administración del cisplatino, respectivamente, como así también por importantes modificaciones en diversos biomarcadores urinarios (McDuffie y Col., 2013).

Por ende, teniendo en cuenta nuestros hallazgos, junto con evidencia aportada por otros autores, Oat5 en orina podría ser postulado como un biomarcador temprano de IRA inducida por cisplatino, ya que se encuentra aumentado a períodos tan cortos como dos días luego de la administración de una dosis tan baja como 1 mg/kg p.c. i.p., cuando aún no se evidencian otro tipo de alteraciones renales que se pondrán de manifiesto a *posteriori*.

A modo de continuar con la validación de este transportador como un novedoso y potencial biomarcador en orina de IRA, decidimos analizar la relación entre las modificaciones en la excreción urinaria de Oat5 y la progresión del daño renal en el tiempo en un modelo de IRA inducida por cisplatino.

4.3 SEGUIMIENTO DE LA EXCRECIÓN URINARIA Y EXPRESIÓN RENAL DE OAT5 EN EL TIEMPO EN UN MODELO DE INSUFICIENCIA RENAL AGUDA INDUCIDA POR CISPLATINO

4.3.1 Evolución temporal de la función renal en ratas con un cuadro de insuficiencia renal aguda inducida cisplatino

Diferentes grupos de animales fueron inyectados con 5 mg/kg p.c., i.p. de cisplatino y los experimentos fueron realizados a los cuatro, siete y catorce días de tratamiento (**Cis5 4d**, **Cis5 7d** y **Cis5 14d**, respectivamente), sumándose a los estudios a los dos días de tratamiento para esta dosis realizados en el ítem 4.2 de esta sección (**Cis5 2d**).

Vale aclarar aquí que para cada tiempo evaluado, se procesó un correspondiente grupo control y luego, como todos los parámetros que fueron evaluados en los diferentes grupos controles no mostraron diferencias significativas entre sí, se decidió unificarlos a un único grupo llamado “**Control**” (n=16), tal como ha sido descrito en ítem 3.1.2.3 de la sección “Materiales y Métodos”.

En una primera instancia se analizaron las variaciones en función del tiempo del peso corporal, del peso renal, de la relación peso renal/peso corporal y del volumen minuto de orina producto de la administración de 5 mg/kg p.c. de cisplatino. Como se observa en la **Tabla 4.3**, los animales tratados muestran una significativa y progresiva pérdida de peso conforme transcurren los días de tratamiento. La pérdida de peso causada por el cisplatino ya ha sido documentada previamente, y analizada en el ítem 4.1.1 de esta sección. Además, en la tabla puede observarse que las ratas tratadas comienzan a exhibir un aumento estadísticamente significativo de la relación peso renal/peso corporal a partir del cuarto día de tratamiento (grupo **Cis5 4d**), con respecto a lo observado en los animales controles. Dicho aumento se mantuvo hasta el día catorce (grupo **Cis5 14d**). Estos incrementos en la relación analizada podrían ser explicados por la disminución observada en el peso corporal de los animales tratados, ya que el peso renal no mostró variaciones estadísticamente significativas en todos tiempos evaluados luego de la administración del cisplatino.

Por otra parte, la **Tabla 4.3** muestra que el volumen minuto de orina se manifestó significativamente aumentado recién a partir del séptimo día de tratamiento (grupo **Cis5 7d**), y dicho aumento se mantuvo en el día catorce (grupo **Cis5 14d**). Al respecto, se conoce que una de las características más prominentes y persistentes asociadas a la IRA inducida por

cisplatino es la poliuria, donde el defecto en la capacidad de la concentración de la orina ha sido atribuido, al menos en parte, a una menor expresión de los canales de agua aquaporinas en el tubo colector (Kim y Col., 2001; Ecelbarger y Col., 2001). Este aumento en el volumen excretado de orina, junto con la pérdida de la capacidad de reabsorber agua de las células tubulares dañadas, puede conllevar a la deshidratación y ser también una de las causas que explicarían la pérdida de peso observada con el tratamiento (Ali y Col., 2008).

	Control (n=16)	Cis5 2d (n=4)	Cis5 4d (n=6)	Cis5 7d (n=6)	Cis5 14d (n=5)
Peso inicial (g)	396,6 ± 3,9	397,3 ± 2,0	397,1 ± 6,8	391,2 ± 4,8	384,3 ± 8,0
Peso final (g)	378,1 ± 5,0	363,2 ± 4,9 ^e	351,5 ± 5,5 ^e	330,5 ± 10,3 ^a	307,1 ± 18,40 ^{a,b,c}
% de Peso perdido con el tratamiento	4,66 ± 0,49	8,58 ± 0,40 ^{d,e}	11,48 ± 0,56 ^{a,e}	15,52 ± 3,59 ^{a,b}	20,09 ± 3,48 ^{a,b,c}
Peso renal (g)	2,44 ± 0,04	2,47 ± 0,06	2,62 ± 0,04	2,55 ± 0,13	2,49 ± 0,04
Peso renal / Peso corporal (x10 ⁻³)	6,45 ± 0,09	6,80 ± 0,20 ^e	7,45 ± 0,11 ^a	7,72 ± 0,69 ^a	8,11 ± 0,50 ^{a,b}
Vo (μL/min/100g)	2,23 ± 0,21	2,92 ± 0,35 ^e	2,32 ± 0,79 ^e	4,18 ± 0,83 ^a	4,94 ± 0,55 ^{a,b,c}

Tabla 4.3: *Peso inicial (g), Peso final (g), % de Peso perdido con el tratamiento, relación Peso renal / Peso corporal y volumen minuto de orina (Vo, μL/min/100g) de animales pertenecientes a los grupos Control y a los grupos tratados con 5 mg/kg p.c., i.p. de cisplatino con 2, 4, 7 y 14 días de tratamiento, Cis5 2d, Cis5 4d, Cis5 7d y Cis5 14d, respectivamente. (a) p < 0,05 vs Control, (b) p < 0,05 vs Cis5 2d, (c) Cis5 4 d, (d) vs Cis5 7d, (e) p < 0,05 vs Cis5 14d.*

*El % de Peso perdido con el tratamiento se calculó como: $-(\text{Peso}_{\text{final}} - \text{Peso}_{\text{inicial}}) / \text{Peso}_{\text{inicial}} * 100$.*

Luego, la función renal fue evaluada en los diferentes grupos experimentales. Como se puede evidenciar en la **Figura 4.11 (A)** y **(B)** las ratas inyectadas con 5 mg/kg p.c., i.p. de cisplatino no mostraron alteraciones significativas en los valores plasmáticos de urea y creatinina durante los primeros dos días de tratamiento (**Cis5 2d**), mientras que se pudo observar un aumento en sus valores a partir del cuarto día (**Cis5 4d**). Ambos parámetros mostraron un pico en sus concentraciones plasmáticas hacia el séptimo día de tratamiento (**Cis5 7d**), y hacia el día catorce mostraron una clara tendencia a retornar a sus niveles basales (**Cis5 14 d**). En trabajos recientes, donde fueron empleadas dosis similares de cisplatino a la que utilizamos aquí, se han obtenidos patrones de urea y creatinina en plasma en el tiempo muy similares a lo observado en este trabajo (Zhou y Col., 2006; Hosohata y Col., 2012; Sinha y Col., 2013).

En cuanto al *clearance* renal de creatinina, éste ya se comenzó a manifestar disminuido a partir del segundo día de tratamiento, mostrando su alteración más significativa, con respecto a los valores controles, en el cuarto día de tratamiento y luego, a partir de allí se observó una tendencia a retornar hacia sus niveles basales (**Figura 4.11 (C)**). Sin embargo, en el día catorce de tratamiento este parámetro siguió observándose significativamente disminuido con respecto al valor control.

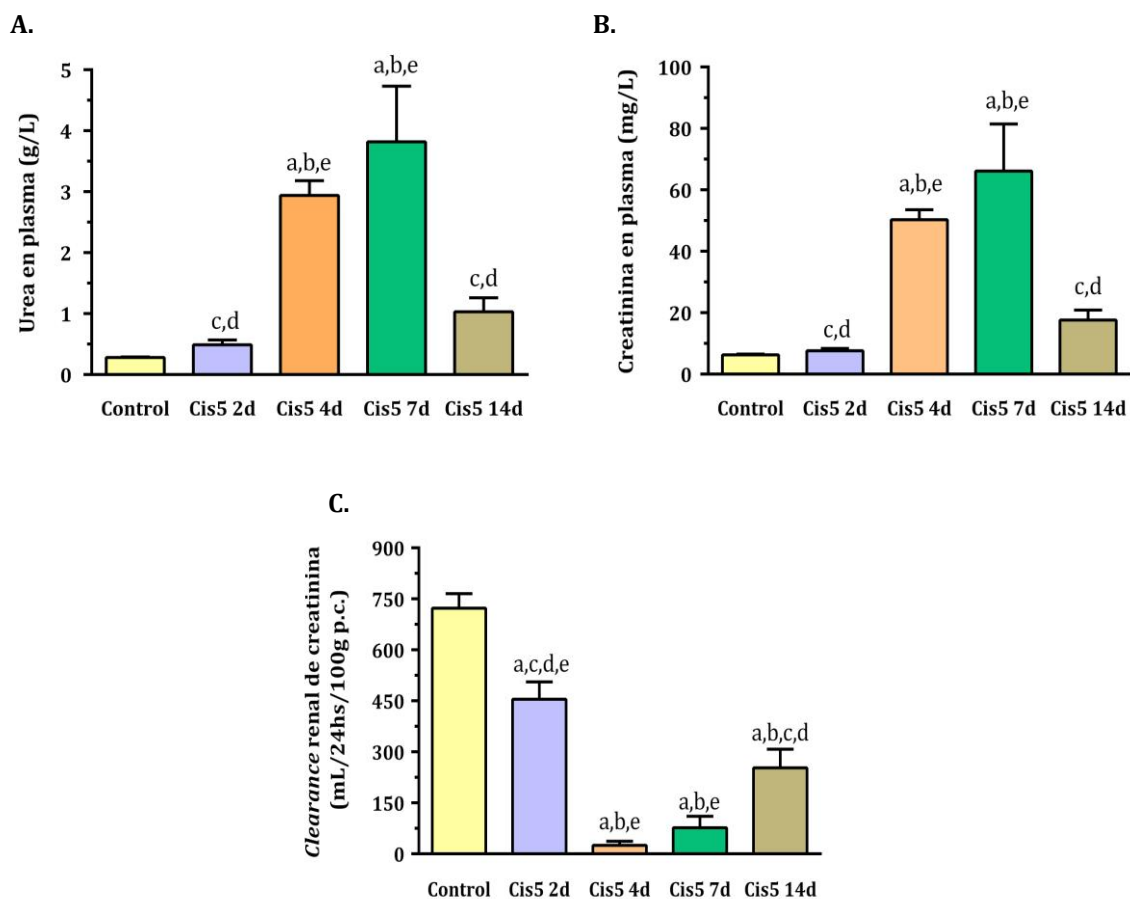


Figura 4.11: Niveles plasmáticos de (A) urea (g/L) y de (B) creatinina (mg/mL), y (C) clearance renal de creatinina (mL/24 hs/100g p.c.) en ratas pertenecientes al grupo Control y a los grupos tratados con 5 mg/kg p.c., i.p. de cisplatino con 2, 4, 7 y 14 días de tratamiento, Cis5 2d, Cis5 4d, Cis5 7d y Cis5 14d, respectivamente. (a) $p < 0,05$ vs Control, (b) $p < 0,05$ vs Cis5 2d, (c) $p < 0,05$ vs Cis5 4d, (d) $p < 0,05$ vs Cis5 7d, (e) $p < 0,05$ vs Cis5 14d.

A continuación, se realizaron estudios histopatológicos en cortes de riñón correspondiente a los diferentes grupos experimentales. Las fotografías de la **Figura 4.12** muestran que a los dos días de la administración del cisplatino (**Cis5 2d**) no se produjeron alteraciones morfológicas de relevancia (tal como se describió en el ítem 4.2.1 de esta sección). Por el contrario, a los cuatro días de tratamiento (**Cis5 4d**) se comenzaron a evidenciar alteraciones típicas asociadas a la administración de cisplatino en los túbulos renales, las cuales se volvieron más acentuadas hacia el séptimo día de tratamiento (**Cis5 7d**) (**Figura 4.12 (C)** y **(D)**). Las modificaciones halladas más destacadas fueron dilatación tubular, descamación celular y desprendimiento de las células de la membrana basal. Por otra parte, en el día catorce (**Cis5 14d**) pudo observarse una notable mejoría a nivel global de la morfología tubular (**Figura 4.12 (E)**). Los hallazgos histológicos observados concuerdan con

lo informado en la bibliografía en modelos similares de injuria renal causado por la administración de cisplatino en ratas (Zhou y Col., 2006; Yao y Col., 2007; Vinken y Col., 2012; Pinches y Col., 2012 a, b; McDuffie y Col., 2013; Sinha y Col. 2013; Nishihara y Col., 2013).

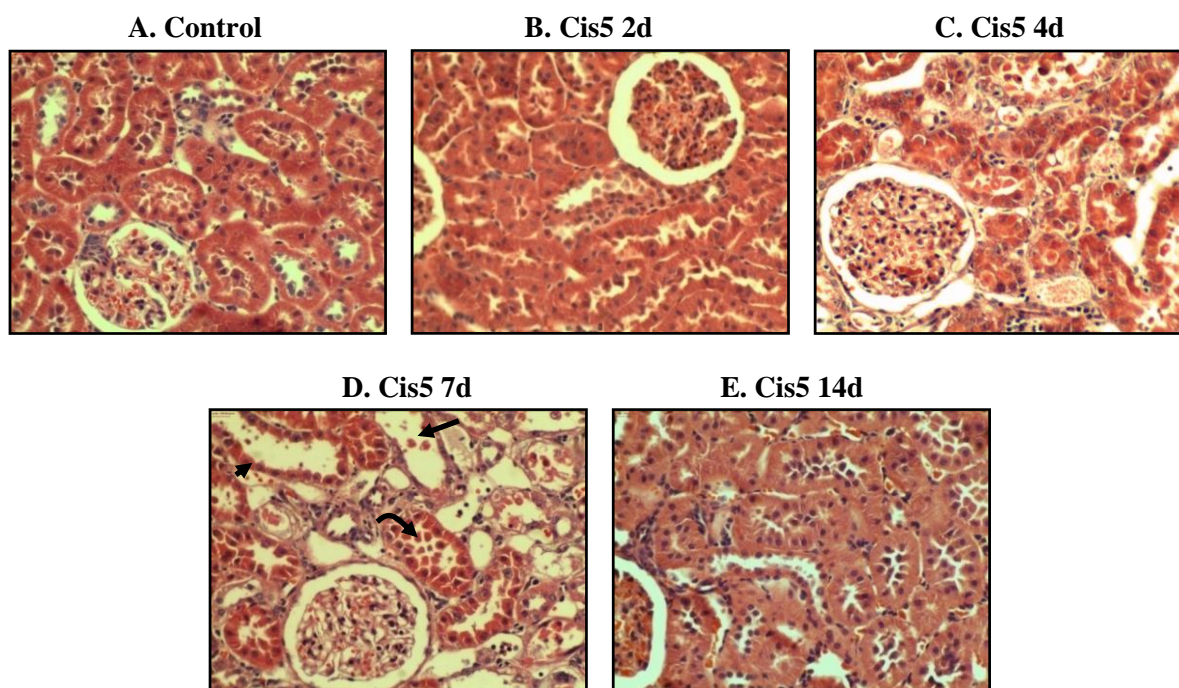


Figura 4.12: Microscopía óptica de histología renal de los animales pertenecientes al grupo (A) Control y a los grupos tratados con 5 mg/kg p.c., i.p. de cisplatino con 2, 4, 7 y 14 días de tratamiento, (B) Cis5 2d, (C) Cis5 4d, (D) Cis5 7d y (E) Cis5 14d, respectivamente. Dilatación tubular (cabeza de flecha), descamación celular (flecha) y desprendimiento de las células de la membrana basal (flecha curva). Imágenes representativas de una serie de muestras de cuatro riñones por cada grupo en estudio. Magnificación: 200x.

La progresión del daño renal en los animales tratados con 5 mg/kg p.c., i.p. se evaluó también mediante el análisis de los niveles urinarios de proteínas totales y glucosa y actividad de fosfatasa alcalina en orina. Como bien se explicó en el ítem 4.1.1 de esta sección, sus valores fueron relativizados a los niveles de creatinina en orina correspondientes. En la **Figura 4.13** puede observarse que los tres parámetros urinarios evaluados no mostraron alteraciones significativas a los dos días de tratamiento (**Cis5 2d**). Sin embargo, se hallaron notablemente aumentados en el cuarto día (**Cis5 4d**), donde se evidenció un pico en sus niveles, y a partir de allí mostraron una tendencia a retornar a sus niveles basales hacia el día catorce de tratamiento (**Cis5 14d**). Estos resultados entonces estarían indicando que el daño tubular comienza a manifestarse a partir del cuarto día de tratamiento y que hacia el día

catorce se observa una recuperación. Por lo tanto, dichos hallazgos estarían coincidiendo con lo observado en la morfología tubular mediante los estudios histopatológicos de tejido renal en los diferentes grupos experimentales.

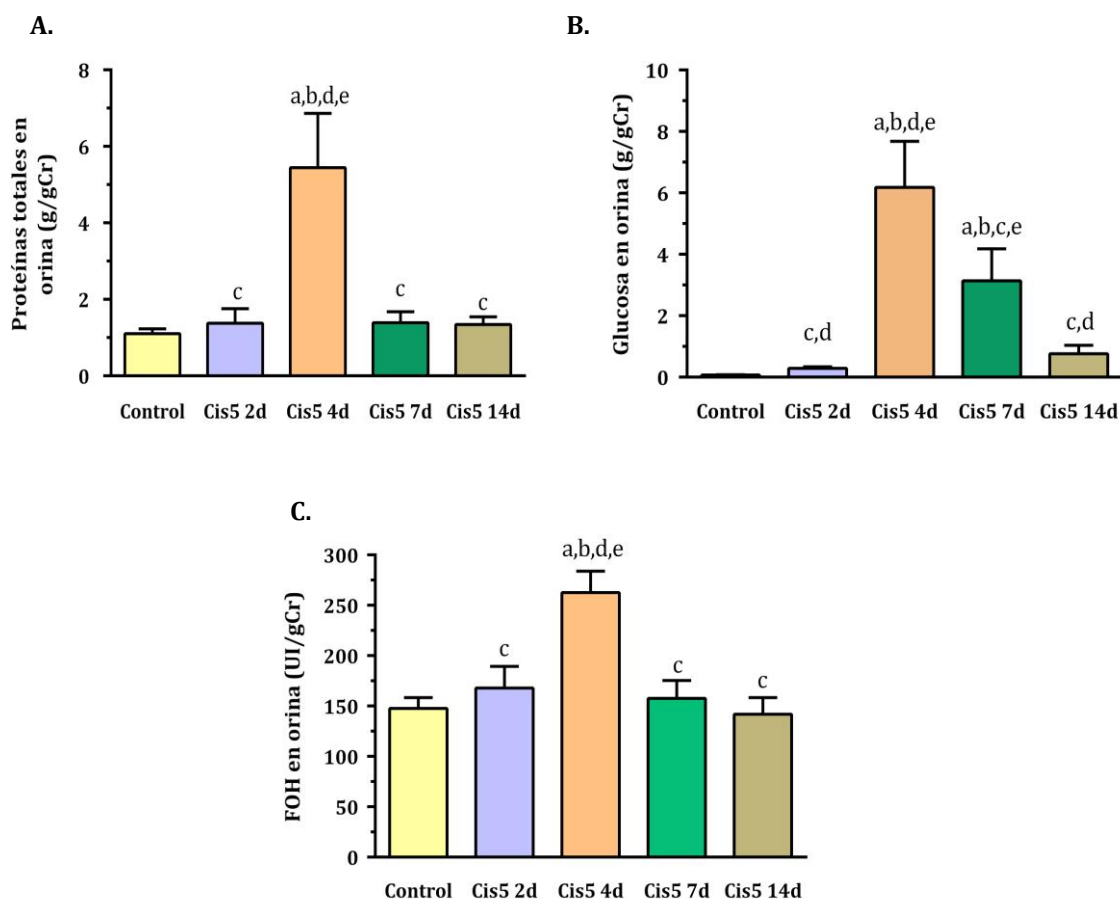


Figura 4.13: Niveles urinarios de (A) proteínas totales (g/g Cr) y (B) glucosa (g/g Cr) y (C) actividad de fosfatasa alcalina en orina (FOH, UI/g Cr), normalizados a los valores de la creatinina urinaria en ratas pertenecientes al grupo Control y a los grupos tratados con cisplatino con 2, 4, 7 y 14 días de tratamiento, Cis5 2d, Cis5 4d, Cis5 7d y Cis5 14d, respectivamente. (a) $p < 0,05$ vs Control, (b) $p < 0,05$ vs Cis5 2d, (c) $p < 0,05$ vs Cis5 4d, (d) $p < 0,05$ vs Cis5 7d, (e) $p < 0,05$ vs Cis5 14d.

Por ende, se pudo comprobar que el cuadro de IRA producto de la administración de 5 mg/kg p.c., i.p. de cisplatino se instaura a partir del cuarto día de tratamiento (constatado por los aumentos de los niveles plasmáticos de urea y creatinina y la disminución del clearance renal de creatina), prosigue hacia el día siete, y luego, ya en el día catorce de tratamiento se observa una reversión del daño renal.

4.3.2 Evolución temporal de la excreción urinaria de Oat5 en ratas con insuficiencia renal aguda inducida por cisplatino

Una vez que fue analizada la función renal de las ratas tratadas con 5 mg/kg p.c., i.p. de cisplatino en el tiempo, se procedió a evaluar el comportamiento de la excreción urinaria de Oat5, para así analizar su evolución temporal. En la **Figura 4.14** podemos observar que la abundancia de Oat5 en orina se encontró notable y significativamente aumentada a los dos días de tratamiento (**Cis5 2d**), siendo este aumento de casi un 600% (como ya había sido descrito en el ítem 4.2.2 de esta sección). Hacia el cuarto día de tratamiento (**Cis5 4d**), la excreción urinaria de Oat5 siguió mostrándose aumentada con respecto al grupo **Control**, pero significativamente disminuida con respecto a los valores hallados en el grupo **Cis5 2d** (en este punto se evidenció un aumento de alrededor de un 220% con respecto al valor control). Luego, a partir del séptimo día de tratamiento (**Cis5 7d**), en cambio, la abundancia de Oat5 en orina no mostró diferencias significativas con respecto a sus niveles basales.

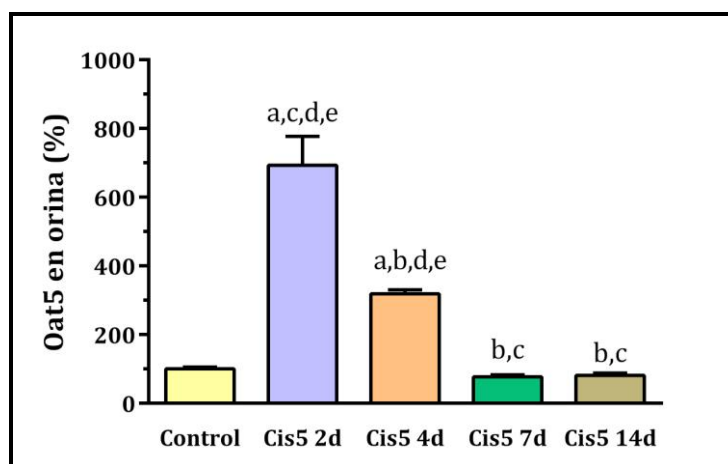


Figura 4.14: Abundancia de Oat5 en orina. Análisis densitométrico de las bandas inmunoreactivas de Oat5 normalizadas a la concentración de creatinina en orina de los animales pertenecientes a los grupos Control y tratados con 5 mg /kg p.c. i.p. de cisplatino con 2, 4, 7 y 14 días de tratamiento, Cis5 2d, Cis5 4d, Cis5 7d y Cis5 14d, respectivamente. Los valores se han expresado como porcentajes, considerándose el nivel del grupo Control como el 100%. Cada columna de la figura representa la media aritmética \pm SEM de los experimentos llevados a cabo en cuatro preparados distintos para cada grupo experimental. (a) $p < 0,05$ vs Control, (b) $p < 0,05$ vs Cis5 2d, (c) $p < 0,05$ vs Cis5 4d, (d) $p < 0,05$ vs Cis5 7d, (e) $p < 0,05$ vs Cis5 14d.

4.3.3 Evolución temporal de la expresión renal de Oat5 en ratas con insuficiencia renal aguda inducida por cisplatino

4.3.3.1 Análisis de la expresión renal de Oat5 mediante Western blotting

Por otra parte, se realizaron estudios de la expresión renal de Oat5 mediante *Western blotting*, con el objetivo de analizar los posibles mecanismos involucrados en las modificaciones del comportamiento de la excreción urinaria de Oat5 en el tiempo. Como puede apreciarse en la **Figura 4.15 (A)**, la abundancia de Oat5 en homogenado renal se halló disminuida en los todos animales tratados con cisplatino. La disminución observada fue progresiva conforme avanzaran los días de tratamiento, llegando a disminuir en el día catorce hasta un 91% con respecto a la expresión en los animales controles.

Por otra parte, se evaluó la abundancia de Oat5 a nivel de membranas apicales aisladas. La **Figura 4.15 (B)** muestra que la expresión del transportador en cuestión en dichas membranas se encontró también disminuida en todos los animales tratados. Al respecto, luego de dos y cuatro días de tratamiento (**Cis5 2d** y **Cis5 4d**, respectivamente), se observó una disminución de alrededor del 50%, mientras que luego de siete y catorce días de tratamiento (**Cis5 7d** y **Cis5 14d**, respectivamente) la disminución hallada fue de casi un 77%, con respecto a los animales controles.

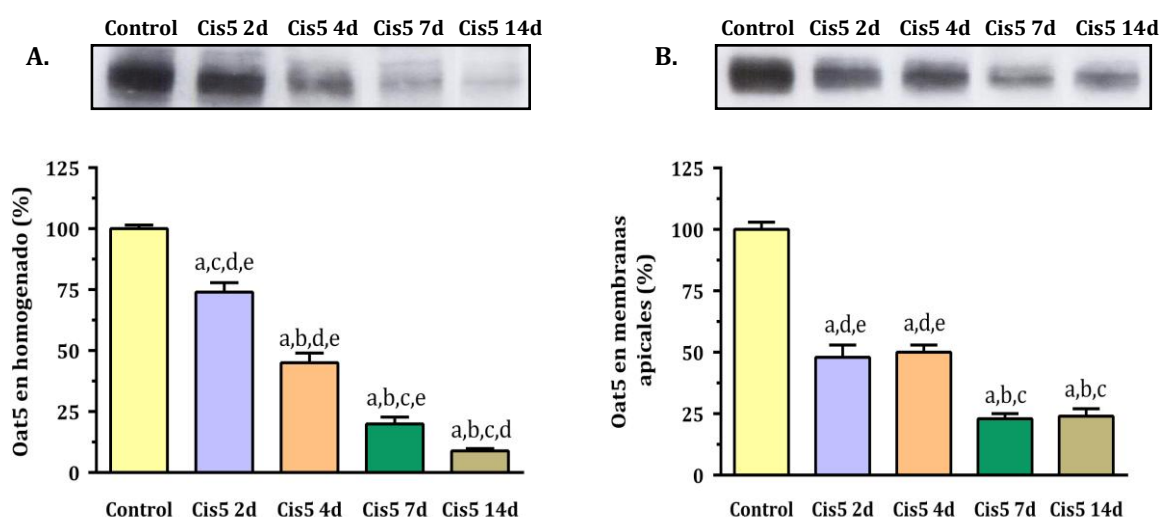


Figura 4.15: Bandas inmunorreactivas y análisis densitométrico correspondiente a la proteína Oat5 en (A) homogenados renales (20 μ g) y (B) en membranas apicales renales (16 μ g) de los grupos Control y tratados con 5mg/kg p.c., i.p. de cisplatino con 2, 4, 7 y 14 días de tratamiento, Cis5 2d, Cis5 4d, Cis5 7d y Cis5 14d, respectivamente. Los valores se han expresado como porcentajes, considerándose el nivel del grupo Control como el 100%. Cada columna de la figura representa la media aritmética \pm SEM de los experimentos llevados a cabo en cuatro preparados distintos para cada grupo experimental. (a) $p < 0,05$ vs Control, (b) $p < 0,05$ vs Cis5 2d, (c) $p < 0,05$ vs Cis5 4d, (d) $p < 0,05$ vs Cis5 7d, (e) $p < 0,05$ vs Cis5 14d.

4.3.3.2 Análisis de la expresión renal de Oat5 mediante inmunohistoquímica

A modo de corroborar lo observado para la expresión de Oat5 en ítem 4.3.3.1 de esta sección, se realizaron estudios de inmunohistoquímica para dicha proteína en cortes de tejido renal pertenecientes a animales controles y tratados. En la **Figura 4.16** se observa una disminución en la marcación de Oat5 a nivel apical en los tejidos de los animales con diferentes tiempos de tratamiento con cisplatino, con respecto a lo que se observó para los animales controles (**Figura 4.16 (A)**). De este modo, estos resultados estarían en concordancia con lo hallado mediante *Western blotting*.

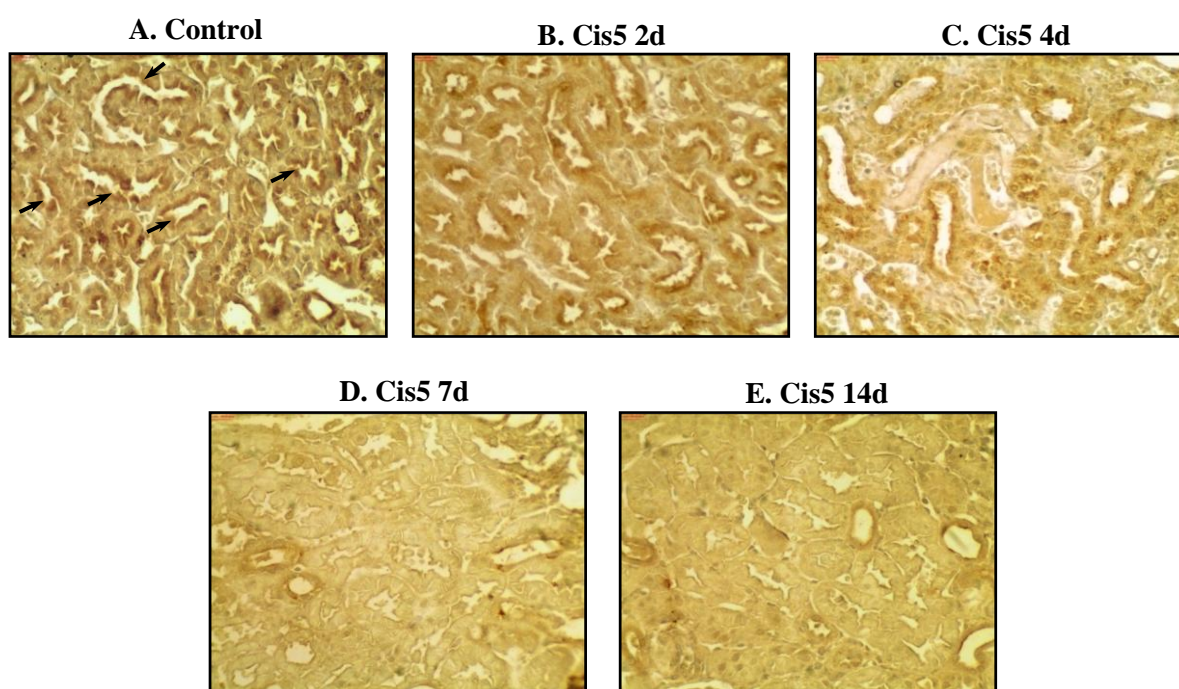


Figura 4.16: Inmunohistoquímica para la proteína Oat5 en tejido renal de ratas pertenecientes al grupo (A) Control y tratados con 5mg/kg p.c., i.p. de cisplatino con 2, 4, 7 y 14 días de tratamiento, (B) Cis5 2d, (C) Cis5 4d, (D) Cis5 7d y (E) Cis5 14d, respectivamente. En la figura (A) se indica la marcación de Oat5 a nivel de la membrana apical de las células de túbulo proximal renal (flecha). Estas imágenes son representativas de una serie de cuatro muestras para cada grupo experimental. Aumentos del 200x.

A través de los estudios realizados hasta aquí se pudo constatar que la excreción urinaria de Oat5 se encuentra modificada antes en el tiempo (a los dos días de tratamiento con cisplatino) de que se hallen modificaciones en parámetros tradicionales indicadores de daño renal, y de que sean detectadas alteraciones morfológicas renales mediante estudios histológicos.

4.4 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA N-ACETILCISTEÍNA SOBRE LA EXCRECIÓN URINARIA Y EXPRESIÓN RENAL DE OAT5 EN RATAS CON NEFROTOXICIDAD INDUCIDA POR CISPLATINO

4.4.1 Caracterización del efecto renoprotector de la N-acetilcisteína sobre la nefrotoxicidad inducida por cisplatino

En una primera instancia se intentó corroborar el efecto renoprotector de la NAC sobre el daño renal causado por cisplatino (lo cual ya ha sido descrito previamente por numerosos autores: Sheikh-Hamad y Col. 1997; Appenroth y Col., 1993; Dickey y Col., 2005, 2008; Nisar y Feinfeld, 2002; Abdelrahman y Col., 2010) para luego evaluar si la excreción urinaria de Oat5 es sensible a las modificaciones del estrés oxidativo y/o restauración de la función renal en forma independiente de la presencia de cisplatino. Para ello, se trabajó con cuatro grupos experimentales: grupo **Control** (n=6), grupo **Cis5 4d** (el cual se utilizó en la sección anterior, n=6), grupo **NAC** (n=4) y el grupo **Cis5 + NAC** (n=6). El grupo **Control** y los demás grupos tratados utilizados en esta sección son descriptos en ítem 3.1.2.4 de la sección “Materiales y Métodos”.

En la **Tabla 4.4** se puede observar las variaciones de peso producto de los diferentes tratamientos, el peso renal, la relación peso renal/peso corporal y del volumen minuto de orina en los cuatro grupos experimentales. El grupo de animales con cuatro días de tratamiento con 5 mg/kg p.c., i.p. de cisplatino (**Cis5 4d**) mostró una significativa pérdida de peso, una relación peso renal/peso corporal aumentada y un volumen minuto de orina sin cambios, con respecto a lo observado en el grupo **Control**. La pérdida de peso observada en los animales tratados con el cisplatino (**Cis5 4d**) fue evitada sólo parcialmente por la coadministración de NAC (grupo **Cis5 + NAC**), mientras que el cociente peso renal/peso corporal en este grupo se observó normalizado con respecto a los valores controles. Sin embargo, en los animales pertenecientes al grupo **Cis5 + NAC**, el volumen minuto de orina se halló aumentado tanto con respecto al grupo **Control**, como al grupo **Cis5 4d** (aunque este aumento no resultó estadísticamente significativo). Una posible explicación a estos últimos resultados, podría ser que en el grupo **Cis5 + NAC**, la NAC estaría previniendo en gran medida el desarrollo de la injuria renal causada por el cisplatino (evidenciado luego por el análisis de la función renal y por los estudios histopatológicos; ver **Figuras 4.17** y **4.18**). Por ende, los riñones de estos animales al no encontrarse tan afectados, tanto funcional como estructuralmente, podrían haber manifestado una especie de respuesta adaptativa al daño renal que causa el cisplatino

aumentando su eliminación por orina. Esto entonces incrementaría el pasaje de agua hacia la orina en formación y explicaría de este modo el mayor volumen minuto urinario observado en este grupo experimental. En cambio, los animales que sólo fueron tratados con cisplatino (**Cis5 4d**), no habrían desarrollado dicha respuesta adaptativa por el extenso daño renal que presentaban las células tubulares y así su volumen minuto de orina no aumentó. La administración de NAC sola no causó variaciones en ninguno de los parámetros analizados en la **Tabla 4.4**.

	Control (n=6)	Cis5 4d (n=6)	NAC (n=4)	Cis5 + NAC (n=6)
Peso inicial (g)	394,7 ± 7,1	397,1 ± 6,8	379,5 ± 6,4	405,9 ± 4,1
Peso final (g)	373,3 ± 5,8	351,5 ± 5,5 ^a	360,3 ± 6,2	368,8 ± 3,8
% de Peso perdido con el tratamiento	5,32 ± 0,30	11,48 ± 0,56 ^{a,c,d}	5,06 ± 1,33 ^{b,d}	9,14 ± 0,59 ^{a,b,c}
Peso renal (g)	2,46 ± 0,06	2,62 ± 0,04	2,42 ± 0,09	2,46 ± 0,06
Peso renal / Peso corporal (x10⁻³)	6,58 ± 0,12	7,45 ± 0,11 ^{a,c,d}	6,72 ± 0,30 ^b	6,67 ± 0,17 ^b
Vo (μL/min/100g)	2,71 ± 0,51	2,32 ± 0,79	2,37 ± 0,19	4,55 ± 0,76

Tabla 4.4: *Peso inicial (g), Peso final (g), % de Peso perdido con el tratamiento, relación Peso renal / Peso corporal y volumen minuto de orina (Vo, μL/min/100g) de animales pertenecientes a los grupos Control y a los grupos tratados Cis 4d, NAC y Cis5 + NAC. (a) p < 0,05 vs Control, (b) p < 0,05 vs Cis5 4d, (c) p < 0,05 vs NAC, (d) p < 0,05 vs Cis5 +NAC.*

*El % de Peso perdido con el tratamiento se calculó como: $-\frac{(\text{Peso}_{\text{final}} - \text{Peso}_{\text{inicial}})}{\text{Peso}_{\text{inicial}}} * 100$.*

Luego se evaluó el efecto de la NAC sobre la función renal en ratas con nefrotoxicidad inducida por cisplatino. Para ello se analizaron, en primer lugar, los niveles plasmáticos de urea y de creatinina en todos los grupos experimentales. Como se observa entonces en las **Figuras 4.17 (A) y (B)**, el cotratamiento con NAC (grupo **Cis5 + NAC**) previno en gran medida el importante aumento de dichos parámetros que produce la administración del cisplatino (lo cual quedó evidenciado en el grupo **Cis5 4d**). Asimismo, se halló una notable mejoría en el *clearance* renal de creatinina en el grupo **Cis5 + NAC** producto de la

coadministración de la NAC, con respecto a lo observado en el grupo **Cis5 4d**, el cual presenta una muy significativa disminución de este parámetro (**Figura 4.17 (C)**). A modo de control, se analizaron los tres parámetros arriba discutidos en ratas que sólo recibieron NAC (grupo **NAC**), mostrando que dicho antioxidante no modifica ninguno de los parámetros evaluados cuando no hay una injuria renal previa (**Figura 4.17**).

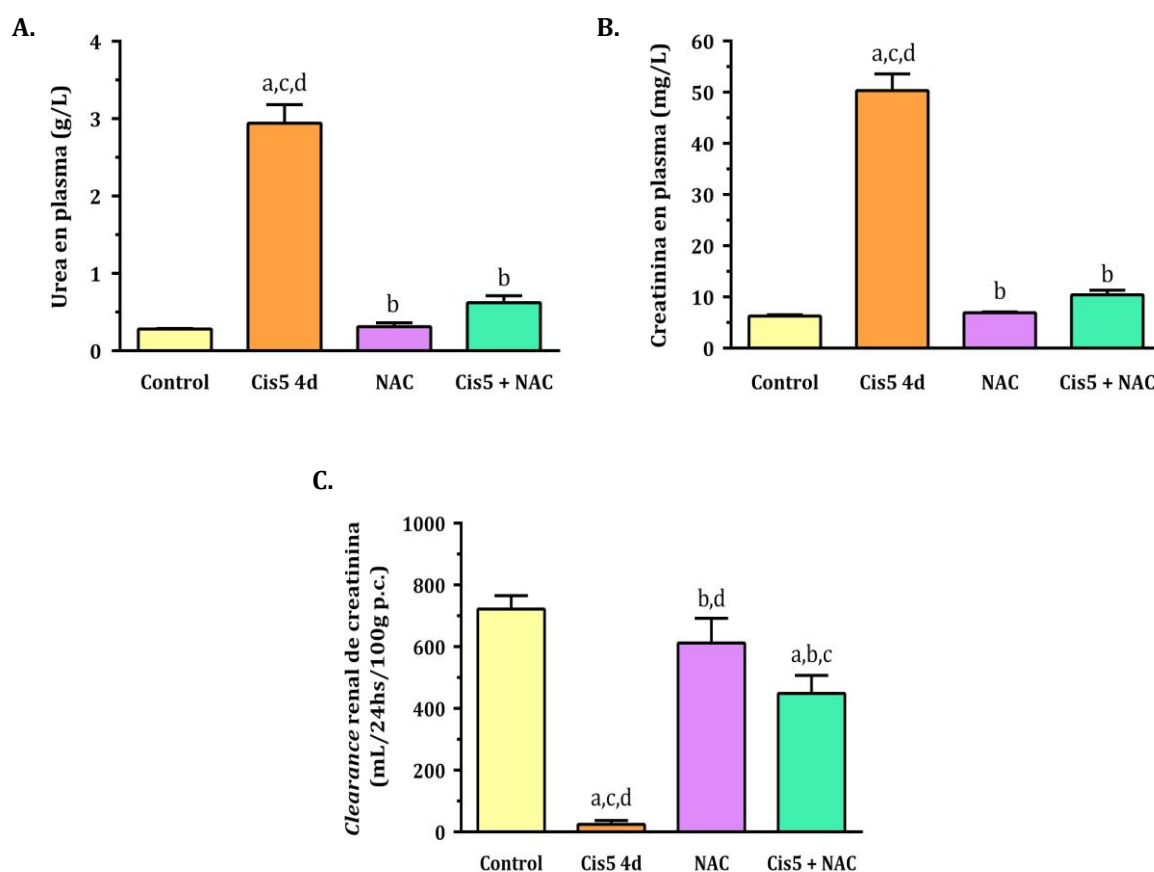


Figura 4.17: Niveles plasmáticos de (A) urea (g/L) y (B) de creatinina (mg/mL), y (C) clearance renal de creatinina (mL/24 hs/100g p.c.) de ratas pertenecientes al grupo Control y a los grupos tratados Cis5 4d, NAC y Cis5 + NAC. (a) $p < 0,05$ vs Control, (b) $p < 0,05$ vs Cis5 4d, (c) $p < 0,05$ vs NAC, (d) $p < 0,05$ vs Cis5 +NAC.

A continuación, se realizaron estudios histopatológicos de tejido renal en los cuatro grupos experimentales, a través de la tinción de rutina con hematoxilina-eosina. La **Figura 4.18 (D)** muestra que la coadministración de la NAC produjo una disminución del daño tubular causado por el cisplatino (el cuál puede ser evidenciado en la **Figura 4.18 (B)** en el

grupo **Cis5 4d**). El daño causado luego de cuatro días de la administración de 5 mg/kg p.c., i.p. de cisplatino ya ha sido descrito en ítem 4.3.1 de esta sección. Por otra parte, la administración de NAC por sí sola no produjo alteraciones a nivel histológico (**Figura 4.18 (C)**). Todos los hallazgos aquí descritos son similares a lo informado en la bibliografía (Abdelrahman y Col., 2010).

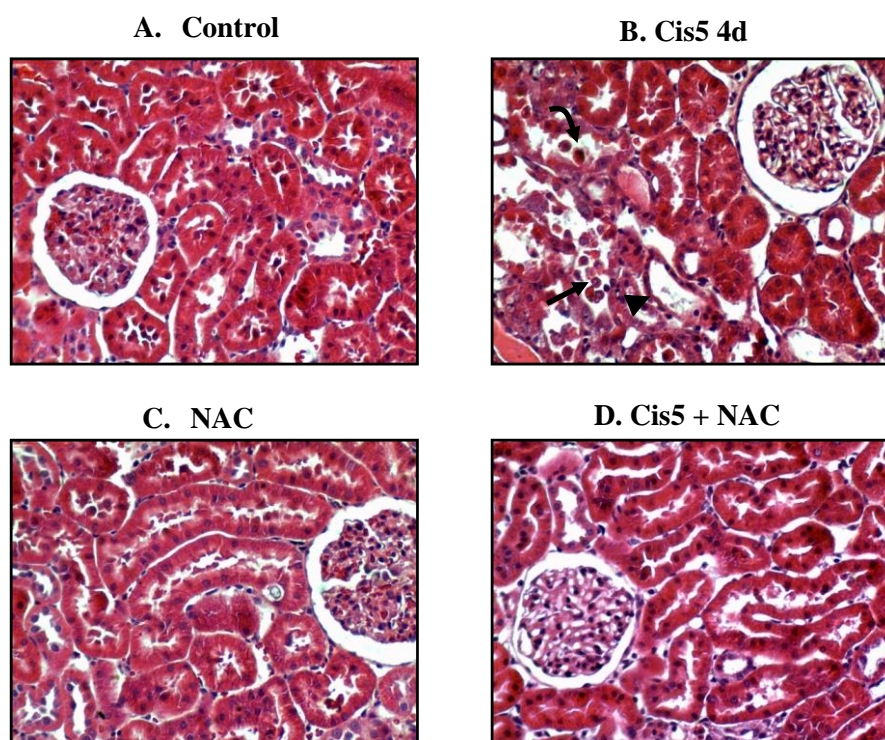


Figura 4.18: Microscopía óptica de histología renal los animales pertenecientes al (A) grupo Control y a los grupos tratados (B) Cis5 4d, (C) NAC y (D) Cis5 + NAC. Dilatación tubular (cabeza de flecha), descamación celular (flecha) y desprendimiento de las células de la membrana basal (flecha curva, B). Imágenes representativas de una serie de muestras de cuatro riñones por cada grupo en estudio. Magnificación: 200x.

Luego se midieron los niveles urinarios de proteínas totales y glucosa, como también la actividad de la fosfatasa alcalina en orina en los cuatro grupos experimentales, y los valores obtenidos fueron normalizados a los valores de creatinina en orina. La **Figura 4.19** muestra que la coadministración de NAC (grupo **Cis5 + NAC**) evitó el significativo aumento de estos tres parámetros que produce la administración del cisplatino (observado en el grupo **Cis5 4d**).

Esto probablemente se deba a que la NAC esté reduciendo o previniendo el daño tubular que causa el cisplatino, como ya ha sido descrito por Abdelrahman y Col. (2010). A modo de control, se corroboró que la administración de NAC por sí sola no produce variaciones en ninguno de los parámetros urinarios evaluados.

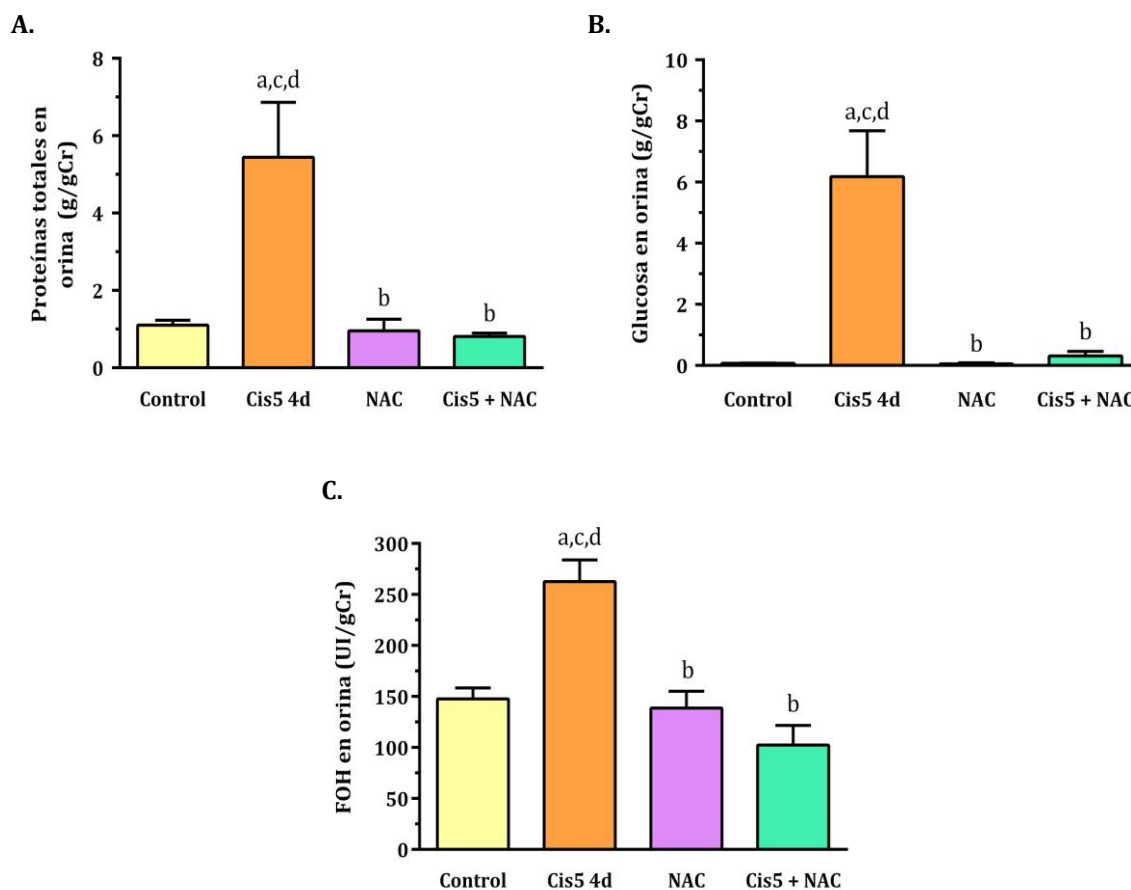


Figura 4.19: Niveles urinarios de (A) proteínas totales en orina (g/g Cr) y (B) glucosa (g/g Cr), y (C) actividad de fosfatasa alcalina en orina (FOH, UI/g Cr), relativizados a la creatinina urinaria en ratas pertenecientes al grupo Control y a los grupos tratados Cis5 4d, NAC y Cis5 + NAC. (a) $p < 0,05$ vs Control, (b) $p < 0,05$ vs Cis5 4d, (c) $p < 0,05$ vs NAC, (d) $p < 0,05$ vs Cis5 + NAC.

Entonces, hasta aquí pudo corroborarse el efecto renoprotector de la NAC, tanto a nivel funcional como histológico, cuando es coadministrada en animales tratados con cisplatino.

4.4.2 Efecto de la de la N-acetilcisteína sobre la excreción urinaria de Oat5 en ratas con nefrotoxicidad inducida por cisplatino

Una vez corroborado el efecto renoprotector de la NAC, se procedió a analizar de qué manera su administración afecta a la excreción urinaria de Oat5 en ratas tratadas con cisplatino, con la intención de indagar acerca de los mecanismos moleculares involucrados en dicha respuesta. La abundancia de Oat5 fue analizada tanto en orina total, como en la fracción exosomal de la orina.

4.4.2.1 Análisis de la abundancia de Oat5 en orina total

Como ya fue descrito en el ítem 4.3.2 de esta sección, la excreción urinaria de Oat5 se halló notablemente aumentada luego de 4 días de tratamiento con cisplatino (**Cis5 4d**). En la **Figura 4.20** se puede observar que dicho incremento no se observó cuando se les coadministró NAC (**Cis5 + NAC**), donde por el contrario, se produjo una disminución en la abundancia de Oat5 en orina con respecto al grupo **Control**. Los niveles hallados en el grupo **Cis5 + NAC** para esta proteína en orina fueron alrededor de un 56% más bajos que en las ratas controles. Por otro lado, la NAC por sí misma (grupo **NAC**) sí produjo modificaciones en la excreción urinaria de Oat5, causando una disminución del 88% con respecto al valor **Control**.

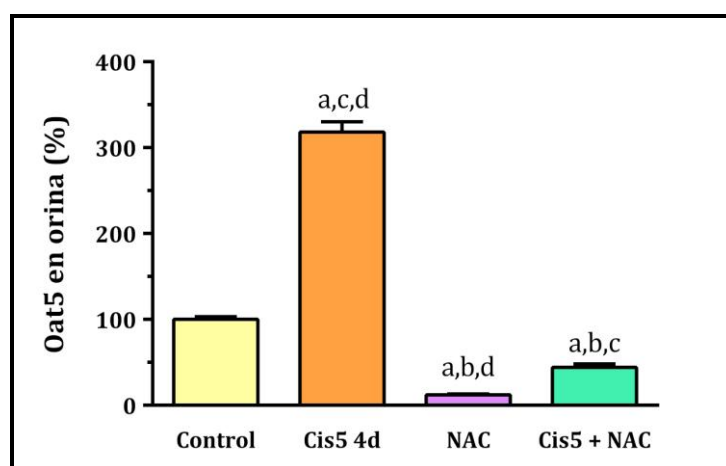


Figura 4.20: Abundancia de Oat5 en orina total. Análisis densitométrico de las bandas inmunorreactivas normalizadas a la concentración de creatinina en orina, en ratas pertenecientes a los grupos Control y tratados Cis5 4d, NAC y Cis5 + NAC. Los valores se han expresado como porcentajes, considerándose el valor del grupo Control como el 100%. Cada columna de la figura representa la media aritmética \pm la SEM de los experimentos llevados a cabo en cuatro preparaciones distintas para cada grupo experimental. (a) $p < 0,05$ vs Control; (b) $p < 0,05$ vs Cis5; (c) $p < 0,05$ vs NAC; (d) $p < 0,05$ vs Cis5+NAC.

4.4.2.2 Análisis de la abundancia de Oat5 en exosomas urinarios

Como se ha expuesto en la introducción de este trabajo de Tesis, la excreción exosomal constituye una de las principales vías por la cual las proteínas de membrana apical de las células tubulares renales son liberadas hacia la orina. Es por este motivo que nos preguntamos entonces si dicha vía de excreción estaría involucrada en la excreción de Oat5 hacia orina, ya que hasta la fecha no ha sido descrita la presencia de dicha proteína en exosomas urinarios (Base de datos de Proteínas en Exosomas Urinarios, *National Institutes of Health*: <http://dir.nhlbi.nih.gov/papers/lkem/exosome/>).

En una primera instancia, se comprobó la presencia de Oat5 en exosomas urinarios aislados a partir de orina total y una banda inmunoreactiva de alrededor de 72 kDa fue hallada tanto en animales controles como tratados con cisplatino (coincidiendo su peso molecular con la banda hallada tanto en orina total, como en homogenado renal y membranas apicales renales aisladas, **Figura 4.21**).



Figura 4.21: Imagen representativa de la banda inmunoreactiva de Oat5 hallada en exosomas urinarios de animales tratados con cisplatino. Su peso molecular estimado fue de alrededor de 72 kDa, tal como su congéneres en orina y tejido renal.

Una vez que pudo comprobarse la presencia de Oat5 en exosomas urinarios, se procedió al análisis de la abundancia de esta proteína en dichos exosomas en los cuatro grupos experimentales utilizados en esta parte del Trabajo de Tesis.

Como puede observarse entonces en la **Figura 4.22**, la abundancia de Oat5 en exosomas urinarios mostró un comportamiento similar al que manifestó en orina total en los diferentes grupos tratados. Al respecto, se halló significativamente aumentada (alrededor de un 200% con respecto al valor control) luego de cuatro días de tratamiento con cisplatino (**Cis5 4d**), mientras que en el grupo que recibió el cotratamiento con la NAC (**Cis5 + NAC**), dicho aumento no fue evidenciado, observándose en cambio una disminución en su abundancia con respecto al grupo control (de alrededor del 40%). Los animales tratados sólo con NAC (grupo **NAC**) también mostraron, al igual que en orina total, una disminución de los

niveles de Oat5 en exosomas urinarios con respecto al valor control, siendo de alrededor del 40% en este caso. La disminución hallada en este último grupo fue mucho menor que la evidenciada en el mismo grupo en orina total (la cual había sido de alrededor del 88%).

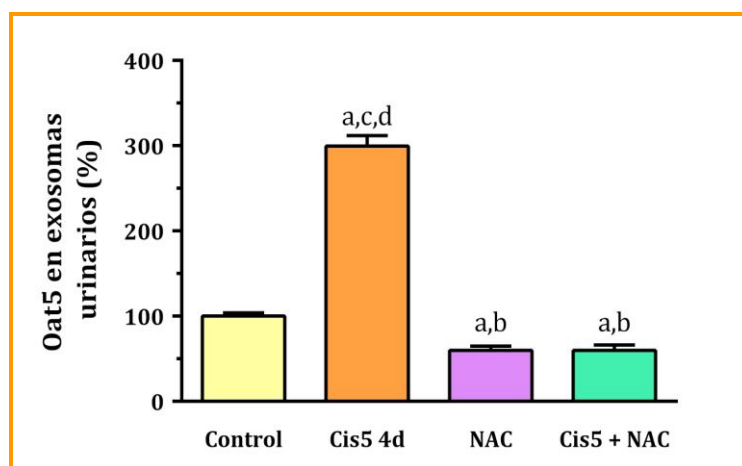


Figura 4.22: Abundancia de Oat5 en exosomas urinarios. Análisis densitométrico de las bandas inmunorreactivas normalizadas a la concentración de creatinina en orina, en ratas pertenecientes a los grupos Control y tratados Cis5 4d, NAC y Cis5 + NAC. Los valores se han expresado como porcentajes, considerándose el valor del grupo Control como el 100%. Cada columna de la figura representa la media aritmética \pm la SEM de los experimentos llevados a cabo en cuatro preparaciones distintas para cada grupo experimental. (a) $p < 0,05$ vs Control; (b) $p < 0,05$ vs Cis5; (c) $p < 0,05$ vs NAC; (d) $p < 0,05$ vs Cis5+NAC.

En esta sección hemos podido comprobar entonces que la vía de excreción exosomal estaría implicada en los mecanismos de excreción de Oat5 hacia orina, y por otra parte hemos constatado que la coadministración de NAC en animales tratados con cisplatino evita el incremento de la excreción urinaria de Oat5 observado tras la injuria renal causada por la administración del cisplatino.

4.4.3 Efecto de la de la N-acetilcisteína sobre la expresión renal de Oat5 en ratas con nefrotoxicidad inducida por cisplatino

4.4.3.1 Análisis de la expresión renal de Oat5 mediante *Western blotting*

Por último, se analizó la expresión de Oat5 en tejido renal (*Figura 4.23*). Como ya se había constatado en el ítem 4.3.3.1 de esta sección, la expresión renal del transportador en estudio se halló significativamente disminuida luego de cuatro días de tratamiento con cisplatino (**Cis5 4d**), tanto a nivel de homogenados como en membranas apicales aisladas (de aproximadamente un 50% en cada caso, con respecto a los valores controles). Por otra parte, en los animales que fueron cotratados con la NAC (**Cis5 + NAC**) también se observó una disminución en los valores de Oat5 en ambas muestras renales del 24% y 59% para homogenados y membranas apicales, respectivamente. En el grupo **NAC**, en cambio, se observó un aumento en la expresión de Oat5 a nivel de homogenado renal (de casi un 50% con respecto a los valores controles), no observándose modificaciones de significancia a nivel de membrana apical.

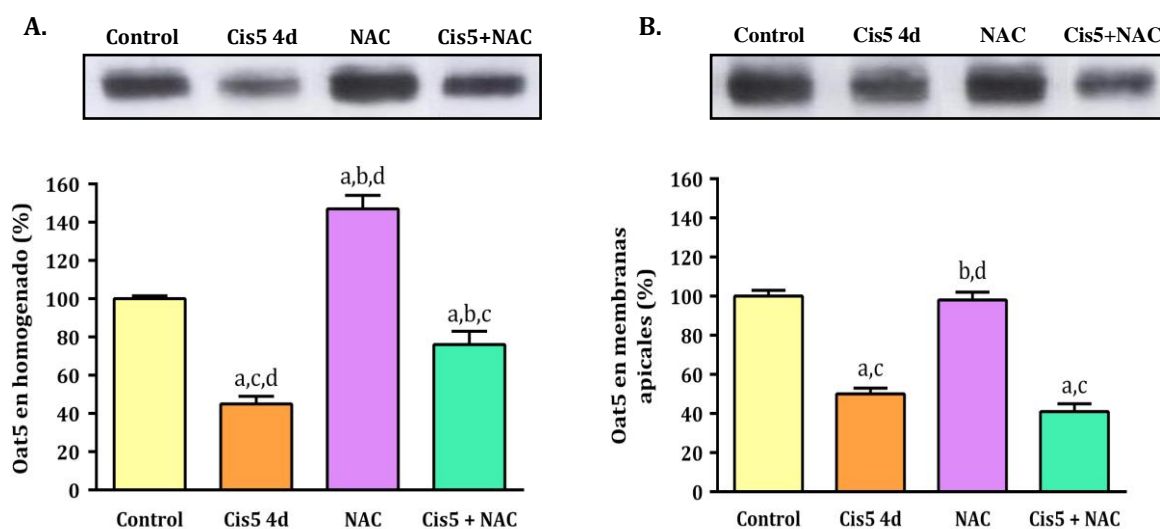


Figura 4.23: Bandas inmunorreactivas y análisis densitométrico correspondiente a la proteína Oat5 en (A) homogenados renales (20 μ g) y (B) en membranas apicales renales (16 μ g) de los grupos Control y tratados Cis5, NAC y Cis5 + NAC. Los valores se han expresado como porcentajes, considerándose el nivel del grupo Control como el 100%. Cada columna de la figura representa la media aritmética \pm SEM de los experimentos llevados a cabo en cuatro preparados distintos para cada grupo experimental. (a) $p < 0,05$ vs Control, (b) $p < 0,05$ vs Cis5 4d, (c) $p < 0,05$ vs NAC, (d) $p < 0,05$ vs Cis5 + NAC.

4.4.3.2 Análisis de la expresión renal de Oat5 mediante inmunohistoquímica

En la **Figura 4.24** se pueden observar los estudios de inmunohistoquímica para Oat5 en tejido renal de los diferentes grupos experimentales. Allí, puede observarse que la expresión de Oat5 a nivel de membrana apical se encontró disminuida en los animales tratados con cisplatino (**Cis5 4d**) como también en el grupo que recibe el cotratamiento con la NAC (**Cis5 + NAC**). En el grupo **NAC** no se observan diferencias en cuanto a la marcación de Oat5 a nivel apical con respecto a lo observado en el grupo **Control**. Estos experimentos entonces estarían de acuerdo con lo evidenciado para la expresión renal de Oat5 mediante *Western blotting*.

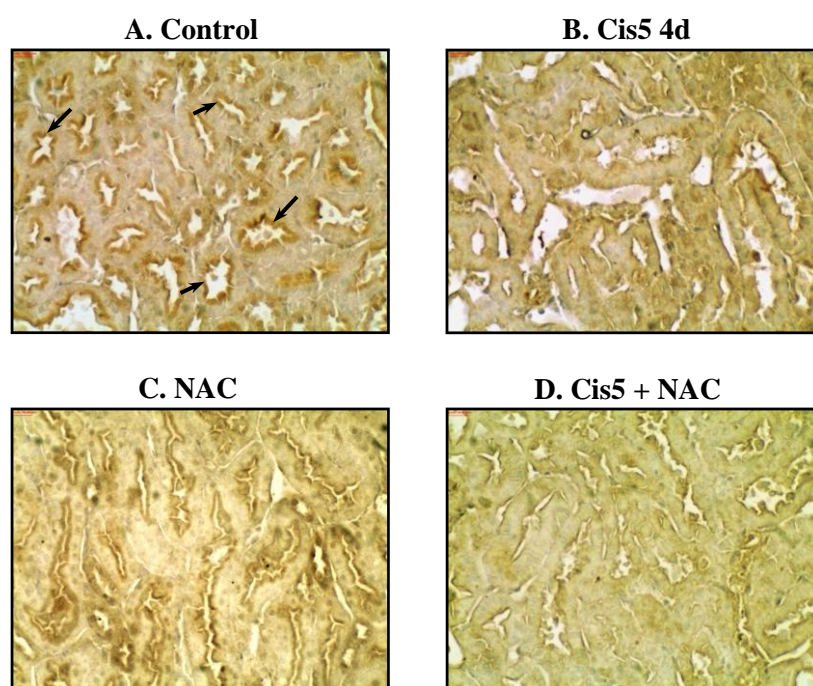


Figura 4.24: Inmunohistoquímica para la proteína Oat5 en tejido renal de ratas pertenecientes a los grupos (A) Control y tratados (B) Cis5 4d, (C) NAC y (D) Cis5+NAC. En la figura (A) se indica la marcación de Oat5 a nivel de la membrana apical de las células de túbulo proximal renal (flecha). Estas imágenes son representativas de una serie de cuatro muestras para cada grupo experimental. Aumentos del 200x.

5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

5.1 EXCRECIÓN URINARIA DE OAT5 EN UN MODELO DE INSUFICIENCIA RENAL AGUDA INDUCIDA POR CISPLATINO

El riñón es un órgano muy complejo que cumple una gran variedad de funciones y tiene un rol fundamental en el mantenimiento de la homeostasis del organismo. Constituye una de las principales vías de excreción de sustancias de desecho endógenas, como también de xenobióticos, entre ellos fármacos y sus metabolitos, y de metales pesados. Sin embargo, debido al gran flujo sanguíneo que recibe este órgano en relación a su masa, y también a la subsecuente exposición a la orina concentrada que contiene los xenobióticos eliminados por esta vía, resulta uno de los principales blancos donde se desarrolla injuria inducida por drogas (Pavkovic y Col., 2014). La nefrotoxicidad por exposición a drogas contribuye a alrededor de un 20% de los episodios de insuficiencia renal aguda (IRA). Las células de los túbulos proximales renales son particularmente susceptibles a los efectos tóxicos de estos compuestos, ya que juegan un rol fundamental en concentrar y reabsorber el filtrado glomerular, y al hacerlo, quedan expuestas a altas concentraciones de estas toxinas. Diversas drogas pueden causar injuria en estas células a través de diferentes mecanismos, como ser por aumento del estrés oxidativo, aumento de especies reactivas del oxígeno (ERO), por alteraciones de la función mitocondrial o por interferir con el transporte tubular, entre otros mecanismos. Dentro del grupo de las drogas que presentan una mayor incidencia de nefrotoxicidad podemos hallar a los aminoglucósidos, antivirales, drogas antineoplásicas y líquidos de contraste (Naughton, 2008).

El cisplatino es una de las drogas antineoplásicas más utilizada en la actualidad para el tratamiento de una gran variedad de tumores sólidos, como ser de testículo, de cabeza y cuello, de vejiga, de ovarios, etc. A pesar de resultar muy efectivo, sólo o en combinación con otras drogas antineoplásicas, su efectividad se ve limitada por la nefrotoxicidad que este fármaco produce, manifestándose principalmente en forma de IRA. Los riñones son capaces de acumular cisplatino más que cualquier otro órgano. Se sabe que el principal sitio de injuria renal es a nivel de las células de los túbulos proximales, a las cuales ingresa principalmente a través del transportador de cationes orgánicos 2, Oct2, a partir de la circulación. Allí puede ser convertido enzimáticamente a una potente nefrotoxina, la cual induce diferentes mecanismos que generan apoptosis y necrosis celular. A pesar de que en los últimos años se han desarrollado numerosas estrategias para prevenir el daño renal tras la administración del

cisplatino, el porcentaje de pacientes donde se ve afectada la función renal sigue siendo preocupantemente alto.

Los análisis histopatológicos resultan muy precisos en cuanto al diagnóstico de la IRA, pero requieren de una biopsia de tejido renal previa claramente invasiva, o constituyen un procedimiento terminal en el caso de analizar el riñón completo cuando se realizan investigaciones preclínicas. La función renal también es generalmente evaluada a través de los niveles plasmáticos de urea y creatinina, en conjunto con parámetros de orina tradicionales como concentración de glucosa y proteínas totales y el análisis del sedimento urinario. Sin embargo, los parámetros recién mencionados resultan poco específicos y relativamente insensibles a pequeñas variaciones de la función renal, ya que se detectan modificaciones en sus valores cuando ya ha ocurrido un extenso daño. Todo esto en conjunto resulta entonces una barrera para la detección temprana del daño renal, lo cual claramente produce un retraso en las intervenciones terapéuticas que permitirían evitar complicaciones mayores (Star y Col., 1998; Wadey y Col., 2014).

En la última década, se han realizado numerosos estudios en busca de biomarcadores que resulten más específicos del daño renal, que permitan realizar un diagnóstico más temprano de la IRA y mejorar así la prognosis de esta patología (Bonventre y Col., 2010). Un biomarcador de daño renal novedoso debe permitir detectar el daño de manera temprana (antes de que se produzcan alteraciones en marcadores de daño tradicionales), debe permitir localizar el sitio donde se produjo la injuria y debe además reflejar el grado de daño producido. La orina ha sido una de las principales fuentes para la búsqueda de biomarcadores debido a que resulta un fluido biológico fácilmente obtenible, no resulta un método invasivo para el paciente y presenta una matriz menos compleja que el plasma. Además, facilita realizar medidas repetidas en el mismo individuo (ya sea animal o humano), permitiendo así monitorear el comienzo, la progresión y la recuperación del daño renal (Wadey y Col., 2014). Al respecto, muchos tipos de proteínas han sido analizadas en orina y propuestas como biomarcadores no invasivos de IRA de diferentes etiologías. Proteínas tales como NAG, Kim-1 y NGAL son las que cuentan con mayor cantidad de estudios, tanto en humanos como en animales, que avalan su utilidad. Sin embargo, la lista es mucho más extensa.

Particularmente, el modelo de IRA inducida por cisplatino constituye uno de los principales modelos establecidos de IRA, y resulta muy empleado para la búsqueda y el estudio de biomarcadores en orina de esta patología (Safirstein, 1999; Vaidya y Col., 2006; Pinches y Col., 2012a; Nishihara y Col., 2013; Pavkovic y Col., 2014).

El transportador de aniones orgánicos 5, Oat5 (Slc22a19), se expresa exclusivamente en riñón en la membrana apical de las células de los túbulos proximales, principalmente en la región S3. Ha sido caracterizado como un intercambiador de aniones orgánicos por dicarboxilatos de 4 y 5 carbonos, y es capaz de transportar ocratoxina A y sulfatos de esteroides, tales como sulfato de dehidroepiandrosterona y sulfato de estrona. También se ha observado que puede interactuar con una gran variedad de compuestos aniónicos químicamente heterogéneos tales como diuréticos, antibióticos β -lactámicos y sulfobromoftaleína. Una característica que lo distingue de los demás miembros de su familia es que es incapaz de transportar el anión paraaminohipurato (PAH), un anión orgánico modelo que es transportado por los otros Oat (Youngblood y Sweet 2004; Anzai y Col., 2005; Kwak y Col., 2005).

Oat5 fue hallado por primera vez en orina por nuestro grupo de investigación (Di Giusto y Col., 2009) y a raíz de ello, posteriores estudios demostraron que podría ser considerado como un novedoso biomarcador temprano de IRA en modelos de IRA isquémica e inducida por cloruro mercuríco (Di Giusto y Col., 2009; Di Giusto y Torres, 2010).

En base a todo lo expuesto, entonces nos preguntamos si Oat5 en orina también podría tener utilidad como un biomarcador de daño renal en IRA inducida por cisplatino. Para ello, en una primera instancia, se analizó el comportamiento de la excreción urinaria de Oat5 en ratas con IRA inducida por dicho antineoplásico. Con el objetivo de producir un cuadro de IRA en un tiempo adecuado y práctico para realizar los experimentos, se consultó la bibliografía disponible y se decidió trabajar con una única dosis de cisplatino administrada por vía i.p. de 10 mg/kg p.c. en ratas Wistar macho adultas. Las ratas constituyen la especie más utilizada en investigaciones de nefrotoxicidad y dentro de la familia de los roedores resulta la especie más utilizada en estudios preclínicos (Gautier y Col., 2010). La dosis seleccionada es considerada una dosis alta de cisplatino en la rata, de manera de que permita apreciar de manera clara toxicidad renal, sin que resulte letal en el tiempo en estudio (Yokoo y Col., 2007; Ajith y Col., 2007; Morisaki y Col., 2008).

Los aumentos significativos hallados en los niveles plasmáticos de urea y de creatinina, como también la importante disminución observada en el *clearance* renal de creatinina dos días luego de la administración de 10 mg/kg p.c., i.p. de cisplatino (grupo **Cis10 2d**), permitieron corroborar el desarrollo de un cuadro de IRA, tal como había sido descrito por otros autores (Yokoo y Col., 2007; Ajith y Col., 2007; Morisaki y Col., 2008). Estos resultados además se vieron acompañados de importantes aumentos en los niveles

urinarios de proteínas totales y glucosa, como también en la actividad de la fosfatasa alcalina en orina. El aumento observado de los niveles urinarios de glucosa en este caso se debe, principalmente, al daño a nivel tubular ocasionado por el cisplatino. Dicho daño conlleva a alteraciones en los transportadores encargados de reabsorber este metabolito y a deficiencias en los mecanismos de reabsorción de la glucosa del filtrado glomerular, produciendo así un aumento de la excreción urinaria de este compuesto. Un aumento de la cantidad de proteínas excretadas por orina tiene valor tanto diagnóstico como pronóstico en la detección inicial y en la confirmación de una enfermedad renal, y es un parámetro que puede ser utilizado para evaluar la progresión del daño en dicho órgano. Cuando los niveles urinarios de proteínas totales se encuentran elevados generalmente se lo asocia con daño a nivel glomerular, lo cual permite que sean filtradas una mayor cantidad de proteínas que lo habitual. Sin embargo, también pueden hallarse niveles urinarios de proteínas elevados aún en ausencia de daño glomerular, como producto de una injuria a nivel tubular y una posterior deficiencia en la capacidad de reabsorber proteínas de la orina en formación. Esto último puede observarse en el daño renal ocasionado por el cisplatino, donde en general se producen alteraciones tubulares de relevancia antes de que se encuentre afectada la función glomerular (Price y Col., 2005; Gautier y Col., 2010). Por otra parte, la fosfatasa alcalina es una enzima que, a nivel renal, se halla en la membrana apical de las células de los túbulos proximales. Su aumento en orina luego de una injuria nefrotóxica, tal como la que produce la administración del cisplatino, se atribuye a un desprendimiento de esta enzima desde las células epiteliales hacia el lumen tubular, de manera secundaria al daño celular.

Las alteraciones observadas en los parámetros urinarios fueron avaladas por los estudios de histopatología renal, en donde el daño ocasionado por el cisplatino se hizo visible a nivel de la parte externa de la médula externa, sitio donde se localizan principalmente los segmentos S3 de los túbulos proximales. En dichos segmentos se acumula preferentemente el cisplatino por haber una mayor expresión de su transportador basolateral, Oct2. Allí pudo constatarse dilatación tubular, desprendimiento de las células tubulares de la membrana basal y descamación celular.

Por otra parte, se observó una importante disminución del peso corporal luego de dos días de la administración del antineoplásico, también como ha sido descrito previamente (Morisaki y Col., 2008). La pérdida de peso observada en los animales tratados con cisplatino podría deberse posiblemente a la diarrea que presentaron los animales y a la pérdida de fluidos por este medio, como también al daño tubular observado y a la subsecuente pérdida de

la capacidad de sus células de reabsorber agua, producir deshidratación y pérdida de peso (Bearcroft y Col., 1999; Yokoo y Col., 2007; Ali y Col., 2008).

Una vez corroborado el modelo de IRA inducida por la dosis administrada de cisplatino, se procedió al principal objetivo de esta primera parte el cual fue evaluar si se producían alteraciones en la excreción urinaria del transportador Oat5.

La abundancia de **Oat5 en orina** fue hallada aumentada de manera muy significativa en el grupo de animales tratados **Cis10 2d**, lo cual, hasta el momento no había sido descrito por ningún otro autor en un modelo animal de IRA inducida por cisplatino.

Al respecto, numerosas proteínas en orina han mostrado un aumento en su excreción urinaria en IRA inducida por cisplatino, tanto en modelos animales como en humanos. Algunas de ellas cuentan con numerosos estudios que avalan su utilidad como marcadores urinarios de daño, entre las cuales podemos nombrar a Kim-1, β_2 -M, NAG, NGAL y Cys-C. Sin embargo, la lista es mucho más extensa, e incluye a las enzimas α -glutación-S-transferasa, a la Lipocalina-2, la Osteopontina, el Antígeno Papilar Renal 1, la Clusterina, la proteína Vanina-1, a la Fetuina-A, a la Proteína Quimioatrayentes de Monocitos 1, entre muchas otras. A estos últimos se los suelen encontrar bajo el término de *nuevos o novedosos biomarcadores de IRA*, y algunos de ellos ya cuentan con estudios realizados en humanos.

Como bien se mencionó anteriormente, Oat5 fue hallado por primera vez en orina por nuestro grupo de trabajo (Di Giusto y Col, 2009). Además, la excreción urinaria de dicho transportador fue propuesta como un novedoso biomarcador temprano y no invasivo en IRA inducida por isquemia o por la administración de cloruro mercúrico. *En base a estos hallazgos previos y en vistas de haber hallado que Oat5 en orina se encuentra aumentado en ratas con IRA inducida por cisplatino, nos preguntamos si también podría comportarse como un biomarcador temprano de IRA inducida por cisplatino. Para ello fueron realizados estudios dosis-respuesta de la excreción urinaria de Oat5 y se realizó un seguimiento de las variaciones de dicho transportador en orina en el tiempo.*

5.2 EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN RENAL, LA EXCRECIÓN URINARIA Y LA EXPRESIÓN RENAL DE OAT5 EN RATAS TRATADAS CON DIFERENTES DOSIS DE CISPLATINO

Para realizar los estudios dosis-respuesta de la excreción urinaria de Oat5 se evaluó el efecto, sobre este parámetro, de diferentes dosis crecientes de cisplatino, como ser 1, 2, 5 y 10 mg/kg p.c., i.p. A las dosis de 1 y de 2 mg/kg p.c. se las considera dosis bajas de cisplatino en la rata, 5 mg/kg p.c. es considerada una dosis intermedia y la dosis de 10 mg/kg p.c. una dosis alta. Todas ellas fueron seleccionadas por varios motivos. Por un lado, se conoce que el daño renal que produce el cisplatino es dependiente de la dosis empleada, tanto en roedores como en humanos (Yao y Col., 2007). Por otra parte, todas las dosis mencionadas han sido utilizadas previamente en modelos de nefrotoxicidad inducida por cisplatino en ratas (Ecelbarger y Col., 2001; Vaidya y Col., 2006; Yokoo y Col., 2007; Hosohata y Col.; 2012; Vinken y Col., 2012). Como bien se explicó anteriormente, la dosis alta de cisplatino (10 mg/kg p.c., i.p.) fue elegida con el objetivo de producir injuria renal de manera evidente, sin que se produzca la muerte de los animales en el tiempo en estudio, mientras que las dosis intermedias y bajas fueron seleccionadas con el fin de poder establecer una relación del tipo dosis-respuesta con la excreción urinaria de Oat5.

Luego de dos días de tratamiento sólo fueron detectadas alteraciones funcionales y estructurales a nivel renal con la dosis de 10 mg/kg p.c., i.p., lo cual fue discutido en el ítem 5.1 de esta sección. Al respecto, en los grupos **Cis1 2d**, **Cis2 2d** y **Cis5 2d** no se hallaron modificaciones en los niveles de urea y de creatinina en plasma, como tampoco en el *clearance* renal de creatinina. En estos tres grupos experimentales tampoco fueron halladas alteraciones histológicas de relevancia en el tejido renal. Además, en dichos grupos no se observaron modificaciones en los parámetros medidos en orina, indicando esto, junto con los estudios histopatológicos, que los riñones de estos animales no presentaban alteraciones a nivel tubular. Por ende, las dosis de 1, 2 y 5 mg/kg p.c., i.p. no fueron capaces de producir daño renal, tanto funcional como estructuralmente, **por lo menos a los dos días de tratamiento**, mientras que en el grupo **Cis10 2d** se evidenció un claro cuadro de IRA producto de la administración del cisplatino.

Por otra parte, la excreción urinaria de Oat5 fue evaluada en los diferentes grupos experimentales antes mencionados, con lo cual se pudo evidenciar que tanto en los grupos **Cis1 2d**, **Cis2 2d**, **Cis5 2d** como en el grupo **Cis10 2d** se produjo un significativo incremento

de la abundancia de Oat5 en orina (con respecto al grupo **Control**), donde el incremento observado *fue de tipo dosis-dependiente*.

Como bien se ha mencionado en la introducción, las proteínas halladas en orina incluyen a las proteínas solubles o al componente proteico de los elementos de la fase sólida. Por un lado, las *proteínas solubles de la orina* pueden provenir de la filtración glomerular de proteínas o péptidos del plasma de bajo peso molecular, de la secreción de proteínas solubles a partir de células epiteliales, ya sea vía exocitosis (como por ejemplo el factor de crecimiento epidérmico) o por desprendimiento de proteínas ancladas a membrana a través de glicosilfosfatidilinositol (como ser por ejemplo la proteína Tamm-Horsfall, la cual resulta de su escisión a partir de la membrana apical del asa gruesa ascendente de Henle). Por otra parte, los *componentes de la fase sólida de la orina* pueden tener tres posibles orígenes: descamación de células epiteliales (constituyen sedimentos de alta densidad y pueden ser precipitados por centrifugación a bajas velocidades), pequeños fragmentos de membranas o componentes intracelulares que han sido volcados hacia el espacio urinario por el desprendimiento del *microvilli* o por mecanismos de apoptosis (pueden ser aislados por centrifugación a velocidades moderadas) y los **exosomas urinarios**. Estos últimos pueden provenir virtualmente de cualquier epitelio que recubra el tracto urinario, como ser podocitos glomerulares, células de los túbulos proximales y distales, y células epiteliales de la vejiga (Pisitkun y Col., 2004).

De todas las posibles fuentes de proteínas en orina recién mencionadas, Oat5 puede ser hallada en la fase soluble por secreción a partir de las células epiteliales vía exocitosis, en células de los túbulos proximales descamadas, en pequeños fragmentos de membranas volcados al espacio urinario o en exosomas urinarios. Como ha sido descrito en el ítem 3.1.3 de la sección “Materiales y Métodos”, previo a la determinación de la abundancia de Oat5, las muestras de orina fueron centrifugadas con el objetivo de eliminar posibles células descamadas y detritus celulares. Por ende, la aparición de Oat5 en orina queda reducida a la fase soluble por exocitosis o a la fase sólida constituida por los exosomas urinarios. Al respecto, se ha postulado que la excreción por la vía exosomal constituye una de las principales vías por las cuales las proteínas de membrana apical de las células de túbulos renales son liberados hacia la orina (Gonzales y Col., 2009; Esteva-Font y Col., 2010). Por todo esto, dicha vía de excreción podría ser postulada como una de las principales vías responsables de la aparición de Oat5 en orina.

Los exosomas son pequeñas vesículas, que no superan los 80 nm de diámetro, que se originan como vesículas internas en cuerpos multivesiculares (CMV) y que luego son

excretados de la célula a partir de la cual se originan, cuando la membrana externa de los CMV se fusiona con la membrana plasmática. El mecanismo de formación de los exosomas urinarios y su posterior excreción (ver **Figura 5.1**) comienza cuando las proteínas de la membrana apical son endocitadas, donde luego son marcadas para ser incorporadas a los CMV, lo cual sucede a través de un proceso de monoubiquitinación. Luego de esto, los endosomas se fusionan con la membrana externa de los CMV, quedando las proteínas apicales insertadas en ella, a través de un proceso dependiente de proteínas adaptadoras. A continuación, son internalizadas por invaginación de la membrana de los CMV, con lo cual la orientación de las proteínas de la membrana apical se invierte, donde su lado citosólico ahora queda orientado hacia el lado externo de las vesículas internas. En este proceso además, quedan encapsuladas proteínas citosólicas. Por último, la membrana externa de los CMV se fusiona con la membrana apical, liberando así las vesículas internas que contienen, los exosomas, hacia el espacio urinario, y todo su contenido en ellos (Pisitkun y Col., 2004, 2006; Hoorn y Col., 2005).

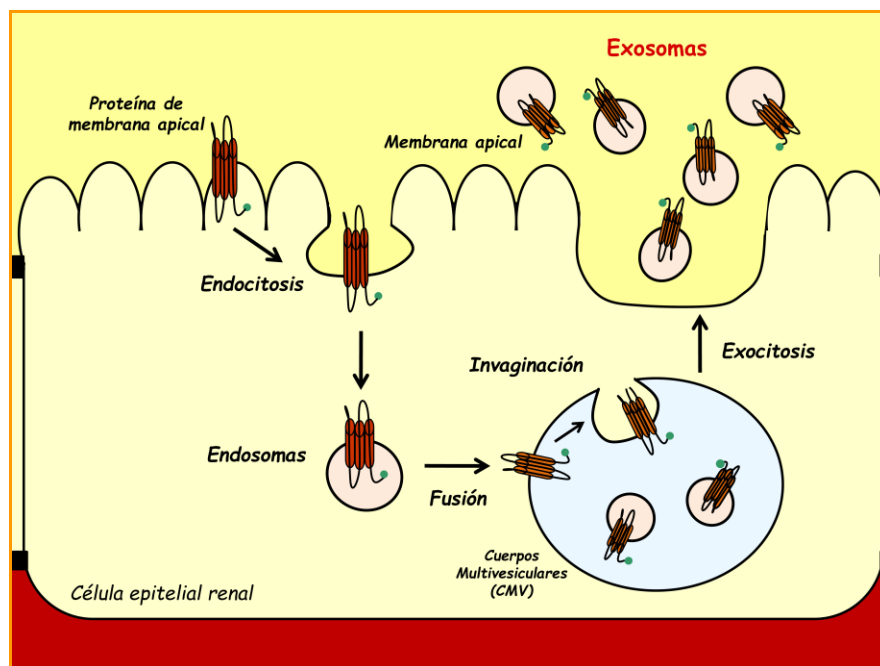


Figura 5.1 Mecanismo de formación y excreción de exosomas urinarios.

Debido a que en los animales tratados con cisplatino se observó un significativo aumento de la excreción urinaria de Oat5 y a que la vía de excreción exosomal podría ser postulada como una posible vía de eliminación del transportador en cuestión por orina, podríamos inferir que en estos animales la velocidad de los diferentes procesos involucrados en la vía exosomal podría encontrarse aumentada, ya sea producto de la injuria renal *per se* o por algún efecto que tenga el cisplatino sobre esta vía (una vez que ingresó a las células de los túbulos proximales), justificando así la mayor eliminación de Oat5 por orina.

Las lesiones que se observan a nivel de túbulo proximal por la administración del cisplatino son dependientes de la dosis empleada (Yao y Col., 2007). Al respecto, diferentes biomarcadores urinarios han demostrado tener, **al igual que Oat5 en orina**, un aumento de su excreción urinaria del tipo **dosis-dependiente** en modelos de IRA inducida por cisplatino. Entre los biomarcadores urinarios que demostraron dicho comportamiento podemos nombrar a NAG, Kim-1, NGAL y otros biomarcadores urinarios considerados más novedosos, como por ejemplo Lipocalina-2, Clusterina, Antígeno Papilar Renal 1 y la Vanina-1 (Gautier y Col., 2010; Pinches y Col., 2012a; Hosohata y Col., 2012).

A modo de indagar un poco más acerca de los posibles mecanismos responsables del incremento de la excreción urinaria de Oat5, se evaluó la expresión de dicho transportador en tejido renal, tanto en homogenados como en membranas apicales aisladas, las cuales constituyen el sitio donde este transportador se expresa a nivel de túbulo proximal y es funcional. En este modelo de IRA inducida por cisplatino, **la abundancia de Oat5 en homogenados renales** se encontró significativamente disminuida en todos los animales tratados, observándose una **disminución dosis-dependiente** de cisplatino. Esto estaría sugiriendo una disminución en la síntesis o aumento de la degradación de Oat5 como consecuencia del daño ocasionado por el antineoplásico. Al respecto, algunos autores han sugerido que la inhibición de la síntesis proteica resulta una de las primeras manifestaciones de la toxicidad del cisplatino en las células de los túbulos proximales. Algunos de ellos proponen que esto se produciría a causa de que el antineoplásico produce una disrupción de la estructura del nucleolo, afectando la síntesis de los ribosomas y por ende luego a la síntesis proteica, mientras que otros postulan que dicha disminución se produce en respuesta a una disminución del ensamblaje de los ribosomas (Kuhlmann y Col., 1997).

Por otro lado, al igual que lo que sucede con Oat5, se han informado disminuciones en la expresión de otros transportadores renales en ratas tratadas con cisplatino. Oat1 y Oat3, dos transportadores pertenecientes a la misma familia que Oat5, mostraron una expresión disminuida en homogenado renal en ratas tratadas con 9 y 10 mg/kg p.c., i.p. de cisplatino a

las 72 horas del tratamiento (Morisaki y Col., 2008; Liu y Col., 2012). También fue hallada una disminución en la expresión de las acuaporinas 1, 2 y 3 en ratas tratadas con 8 mg/kg p.c., i.p. del antineoplásico (Kim y Col., 2001).

Del mismo modo, también hemos hallado una **disminución dosis-dependiente** de cisplatino en la **expresión de Oat5 a nivel de membranas apicales aisladas**. Esto, junto con las evidencias de que la eliminación de Oat5 por orina se encuentra incrementada también de manera dosis-dependiente, permitirían suponer que la abundancia de este transportador en las membranas apicales disminuye a causa de un aumento de la velocidad de remoción del transportador desde dicha membrana, probablemente a través de la vía exosomal, hacia la orina en formación.

Por otra parte, el hecho de que Oat5 podría ser excretado a través de la vía exosomal también explicaría que se observe, para todas las dosis ensayadas, una disminución de mayor magnitud en la expresión de Oat5 a nivel de membranas apicales que a nivel de homogenado (el cociente entre la abundancia de Oat5 en membrana y la abundancia en homogenado fue menor a la unidad, para todas las dosis ensayadas de cisplatino). Entonces, en el momento donde se realizaron los estudios de expresión, parte de las moléculas de Oat5 que se hallaban en la membrana apical y que irían a ser excretadas hacia orina a través de la vía exosomal, podrían hallarse a nivel intracelular en los endosomas o dentro de los CMV (ver la descripción de la vía exosomal y *Figura 5.1*), formando momentáneamente parte del homogenado total, lo cual explicaría así la mayor abundancia en homogenado que en membranas apicales.

A través de los resultados obtenidos en esta parte del trabajo de Tesis, hemos podido evidenciar que la excreción urinaria de Oat5 se encuentra aumentada dos días luego de la administración de cisplatino, a dosis tan bajas como ser de 1 mg/kg p.c., i.p., cuando aún no se evidencia daño renal, ya sea a través de estudios histopatológicos o a través de alteraciones en marcadores de daño renal tradicionales. Sin embargo, tal como ha sido discutido en la sección “Resultados” al finalizar el ítem 4.2, dicha dosis de cisplatino es capaz de desarrollar IRA a mayores tiempos de tratamiento (Gautier y Col., 2010; McDuffie y Col., 2013).

Por ende, la excreción urinaria de Oat5 en orina podría ser postulada como un biomarcador temprano de IRA inducida por cisplatino, ya que se encuentra aumentada a períodos tan cortos como ser dos días luego de la administración de una dosis tan baja como 1 mg/kg p.c., i.p., aún cuando no se evidencian otro tipo de alteraciones renales que se pondrán de manifiesto a posteriori.

5.3 SEGUIMIENTO DE LA EXCRECIÓN URINARIA Y LA EXPRESIÓN RENAL DE OAT5 EN EL TIEMPO EN UN MODELO DE INSUFICIENCIA RENAL AGUDA INDUCIDA POR CISPLATINO

Alrededor de un 20 a un 30% de los pacientes que reciben tratamiento antineoplásico con cisplatino desarrollan IRA, aún utilizando diferentes protocolos de hidratación y estimulación de la diuresis (Miller y Col., 2010). Tanto en la práctica clínica como en los estudios preclínicos en ratas, el comienzo de la IRA pasa desapercibido por alteraciones en marcadores de daño renal tradicionales como ser la urea y creatinina en plasma, ya que como se discutió anteriormente, son poco sensibles y específicos para detectar cambios menores en la función renal. Por ende, resulta de especial interés la caracterización de nuevos biomarcadores que permitan una **detección más temprana del daño renal**, a tiempos cortos luego de la administración del cisplatino, donde los disturbios son mínimos. Con ello se lograría realizar una intervención temprana de la patología y lograr así una mejor recuperación de la función renal y un mejor pronóstico del paciente.

Entonces, con el objetivo de continuar con la validación de Oat5 en orina como un novedoso y potencial biomarcador temprano de IRA, decidimos analizar la relación entre las modificaciones en la excreción urinaria de Oat5 en el tiempo y la progresión del daño renal en un modelo de IRA inducida por cisplatino.

Como se comentó en el ítem 4.3.1 de la sección “Resultados”, se trabajó con una dosis de 5 mg/kg p.c., i.p. y se analizó la función y estructura renal, como también la excreción urinaria y la expresión renal de Oat5 a los dos, cuatro, siete y catorce días de tratamiento. Al respecto, se ha podido constatar que la función renal comienza a verse afectada a partir del segundo día de tratamiento, ya que se observó una disminución significativa de la VFG, estimada a través del *clearance* renal de creatinina, en los animales tratados. Dicha alteración no se evidenció en los otros marcadores tradicionales de daño renal que fueron evaluados. En cambio, la excreción urinaria de Oat5 sí se halló notablemente aumentada a los dos días de tratamiento, con lo cual se estaría *demonstrando que Oat5 en orina serviría como un biomarcador temprano de daño renal inducido por cisplatino, cuando aún marcadores tradicionales o estudios histopatológicos no estarían alertando sobre un incipiente daño renal.*

La excreción urinaria de Oat5 responde de manera temprana al daño renal causado por el cisplatino al igual que otros biomarcadores en orina estudiados en modelos de IRA nefrotóxica que utilizan la misma dosis de cisplatino a la utilizada en esta parte del trabajo de

Tesis (5 mg/kg p.c., i.p.). Al respecto, se ha observado que tanto Kim-1, NAG, NGAL, Vanina-1 como la Proteína Quimioatrayente de Monocitos 1 se encuentran aumentados en orina entre el primer y el segundo día de tratamiento con cisplatino, y todos ellos lo hacen antes de que sean detectadas alteraciones a nivel renal por diferentes marcadores tradicionales de daño (Vaidya y Col., 2006; Sinha y Col., 2013; Nishihara y Col., 2013). Por lo tanto, Oat5 en orina podría formar parte de un panel de biomarcadores que alerten de manera temprana sobre una inminente alteración de la función renal en IRA nefrotóxica inducida por la administración de cisplatino.

Por otra parte, entre el cuarto y séptimo día de tratamiento se observó el mayor grado de daño renal, tanto funcional como estructuralmente, ya que a dichos tiempos luego de la administración del cisplatino se hallaron las alteraciones más significativas en cuanto los niveles de urea y creatinina en plasma, *clearance* renal de creatinina, histología renal, valores urinarios de proteínas totales y glucosa y actividad de fosfatasa alcalina en orina. Sin embargo, ya hacia el día catorce de tratamiento, se comenzó a evidenciar una clara tendencia hacia la recuperación del daño renal, tanto a nivel funcional como estructural.

Los niveles de Oat5 en orina, se observaron aumentados con respecto a los valores controles aún a los cuatro días de tratamiento, aunque significativamente disminuidos con respecto al día dos (aumentos del 218% y del 593%, respectivamente). A los siete y catorce días de tratamiento, por el contrario, los niveles urinarios de Oat5 no mostraron diferencias significativas con respecto al grupo **Control**. Por ende, la excreción urinaria de Oat5 se halló incrementada al comienzo del cuadro de IRA, donde las alteraciones renales fueron incipientes, anticipándose a cambios en marcadores tradicionales, pero no acompañó a la progresión de la injuria renal, ya que no mostró un pico en sus valores cuando el daño renal mostró ser de mayor magnitud (a través de estudios histopatológicos y marcadores bioquímicos, lo cual fue evidenciado entre los cuatro y siete días de tratamiento).

La progresión temporal de otros biomarcadores de daño renal también fue evaluada en modelos de IRA inducida por diferentes dosis de cisplatino. Al respecto, en un trabajo donde se analizaron numerosos biomarcadores en orina en el tiempo en ratas tratadas con cisplatino, tales como NAG, Lipocalina-2, Osteopontina, Kim-1, α -glutación-S-transferasa y Antígeno Papilar Renal 1, se observó que los valores de Kim-1 y Osteopontina en orina se correlacionaban con el grado de injuria renal, seguida a través de las alteraciones histopatológicas halladas luego de la administración del antineoplásico. Dichos biomarcadores urinarios se mostraron aumentados de manera temprana luego de la administración del cisplatino y continuaron incrementándose en magnitud, mostrando un pico

en sus valores en asociación con las mayores manifestaciones de la patología renal, y luego sus valores comenzaron a declinar hacia sus niveles basales en tanto que la injuria renal se vio revertida. Por ende, Kim-1 y Osteopontina en orina servirían como biomarcadores útiles para el seguimiento del comienzo, la progresión y la reversión del daño renal (Pinches y Col., 2012a; Vinken y Col., 2012), mientras que los **niveles urinarios de Oat5** sólo serían **útiles para detectar de manera temprana el daño renal en la IRA inducida por cisplatino**.

La excreción urinaria de Oat5 no sería un biomarcador de la IRA inducida específicamente por la administración del cisplatino, ya que, como bien mencionamos anteriormente, en trabajos previos nuestro grupo de investigación ha postulado a la excreción urinaria de dicho transportador como un biomarcador temprano de IRA inducida por isquemia y por cloruro mercúrico (Di Giusto y Col., 2009; Di Giusto y Torres, 2010). Al respecto, en la isquemia bilateral subclínica, se halló un importante aumento en la abundancia de Oat5 en orina, cuando aún no se habían hallado alteraciones en marcadores de daño renal tradicionales (Di Giusto y Col., 2009). Además, en un estudio dosis-respuesta de cloruro mercúrico, la excreción urinaria de Oat5 se encontró aumentada a una dosis tan baja como ser de 0,2 mg/kg p.c., s.c., cuando aún no se habían observado ningunas alteraciones renales de relevancia (Di Giusto y Torres, 2010). Es importante remarcar en este punto que tanto el mercurio inorgánico como el platino, usualmente en la forma de cisplatino, y muchos otros metales, tales como cadmio, cromo, plomo y vanadio, comparten al proceso de estrés oxidativo, con lipoperoxidación, apoptosis y necrosis, como fenómeno en común en el mecanismo nefrotóxico de estos metales. El estrés oxidativo ocurre principalmente en las células de los túbulos proximales y se manifiesta principalmente con depleción de los niveles de glutatión reducido, aumento de la producción de ERO e inhibición de sus enzimas detoxificadoras, entre otros fenómenos que se ven estimulados. Además, la mayoría de dichos eventos también ocurren en la injuria renal ocasionada por hipoxia. Se ha demostrado además, que otros fenómenos, tales como alteraciones en el reciclado de vesículas, pérdida selectiva de transportadores tanto de la membrana basolateral como de la membrana apical de las células de los túbulos proximales y daño a nivel mitocondrial forman parte del mecanismo de acción de la nefrotoxicidad que inducen el mercurio, cisplatino y cadmio (Zalups, 2000; Sabolić, 2006; Miller y Col., 2010). Por lo tanto, luego de los resultados obtenidos hasta aquí en este trabajo de Tesis, junto con lo evidenciado anteriormente por nuestro grupo de trabajo (Di Giusto y Col., 2009; Di Giusto y Torres 2010), podemos proponer que la excreción urinaria de Oat5 podría servir como un potencial biomarcador temprano no invasivo de IRA inducida por isquemia, cloruro mercúrico y cisplatino. Probablemente, fenómenos comunes a los tres

modelos de IRA que ocurren a nivel intracelular en los túbulos proximales sean responsables del aumento observado en la liberación de Oat5 de las membranas apicales hacia la orina luego de que ocurra una injuria de origen tóxico.

Se analizaron del mismo modo los cambios en la expresión renal de Oat5 en el tiempo luego de la administración de 5 mg/kg p.c., i.p. de cisplatino, con el objetivo de relacionarlo con las alteraciones en la excreción urinaria de dicho transportador. La expresión de Oat5 a nivel de homogenado renal, se encontró significativamente disminuida, donde la disminución fue en aumento a medida que transcurrieron los días de tratamiento. Por otra parte, la expresión a nivel de membranas apicales renales aisladas también se halló disminuida en todos los tiempos evaluados, pero en este caso se observó una disminución de magnitud similar a los dos y cuatro días de tratamiento (de casi el 50%) y a los siete y catorce días de tratamiento (de alrededor del 77%), con respecto al valor control.

Entonces, estableciendo una relación entre la excreción urinaria y la expresión renal de Oat5 para los diferentes tiempos evaluados podríamos decir que:

❖ A los dos días de tratamiento se observa un pico en la excreción urinaria de Oat5 en los animales tratados (un aumento del 593%) y una disminución de su expresión, tanto en homogenados (del 26%) como en membranas apicales (de alrededor del 50%). Esto podría ser explicado por un aumento de la velocidad de remoción del transportador desde la membrana apical hacia la luz tubular, probablemente mediante la vía de excreción exosomal, explicando así su abrupto aumento en orina y su importante disminución en membranas apicales. Tampoco se puede descartar que se encuentren disminuidos los procesos de tráfico del transportador sintetizado en el citosol hacia la membrana, o aumentados los procesos de reinternalización, producto del daño ocasionado en las células tubulares por el cisplatino, lo cual también contribuiría a disminuir la expresión de Oat5 sobre las membranas apicales. Para esto, serían necesarios más experimentos que permitan analizar la abundancia de Oat5 en la fracción citosólica de las células tubulares o membranas internas. La disminución de la abundancia del transportador en cuestión a nivel de homogenado probablemente se deba, como se discutió más arriba a una disminución de la síntesis del transportador o a un aumento de su degradación.

❖ A los cuatro días de tratamiento, cuando comienza a evidenciarse el daño renal, la excreción urinaria de Oat5, si bien siguió hallándose aumentada con respecto al valor control (un aumento del 218%), comienza a disminuir con respecto al segundo día de tratamiento, hasta que en el séptimo día de tratamiento retorna a sus valores basales. La abundancia de Oat5 en las membranas apicales no varió en el cuarto día con respecto al día dos de tratamiento (la disminución observada sigue siendo de alrededor del 50% con respecto al valor control), mientras que la expresión a nivel de homogenado continuó disminuyendo (disminución observada: alrededor del 55% con respecto al valor control). Por ende, probablemente los mecanismos implicados en la excreción de Oat5 desde la membrana apical hacia la orina comiencen a verse disminuidos, haciendo que, si bien la abundancia en orina continua estando aumentada con respecto al valor control, comienza a disminuir con respecto al pico observado en el día dos, y por ende esto produciría que la abundancia en membrana apical no siga disminuyendo con respecto al segundo día de tratamiento. Por otra parte, la expresión de Oat5 en homogenado continuó disminuyendo con respecto al día dos, ya que el daño ocasionado por el cisplatino se hace más severo (evidenciado por histología y marcadores en plasma y orina) y por ende podría estar más afectada su síntesis proteica.

❖ Ya hacia el séptimo día de tratamiento, los niveles urinarios de Oat5 retornan a sus valores basales. En cambio, la abundancia a nivel de membrana apical se halló significativamente disminuida con respecto al segundo y cuarto día de tratamiento (una disminución de alrededor del 77% con respecto al valor control), como también la expresión a nivel de homogenado (una disminución de alrededor del 80% con respecto al **Control**). Por ende, la disminución observada a nivel de membrana apical podría ser explicada en este punto por la disminución de la síntesis del transportador y por posibles alteraciones en el tráfico del Oat5 sintetizado en el citosol hacia la membrana.

❖ Por último, en el día catorce de tratamiento, se pudo observar una mejoría a nivel renal, tanto a nivel funcional como estructural, lo cual podría hablar de una regeneración tubular. Sin embargo, la expresión en homogenado de Oat5 continuó disminuyendo con respecto al día siete (una disminución del 91% con respecto al valor control), mientras que a nivel de membrana apical, si bien se observó una significativa disminución con respecto al valor control, no se halló disminuida con respecto al séptimo día de tratamiento (disminución de alrededor del 77%). Entonces, si bien los procesos de síntesis o degradación podrían seguir estando afectados en este punto por el cisplatino, probablemente los procesos de tráfico de

Oat5 desde el citosol hacia la membrana hayan comenzado a restaurarse, de manera que la abundancia del transportador en la membrana apical no continúe disminuyendo a pesar de que su síntesis todavía lo siga haciendo.

Por ende, como conclusión parcial de esta parte de trabajo de Tesis, los resultados obtenidos aquí estarían demostrando que la excreción urinaria de Oat5 sería un biomarcador altamente sensible y temprano de disfunción renal ocasionado por la administración de cisplatino, resultando de gran utilidad para la detección de alteraciones menores tanto estructurales como funcionales a nivel renal, ya que se encuentra significativamente aumentado cuando aún otros parámetros tradicionales de daño renal se hallan normales. Sin embargo, no resultaría un biomarcador útil para realizar un seguimiento de las modificaciones de la función renal en el tiempo en la IRA inducida por cisplatino.

5.4 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA N-ACETILCISTEÍNA SOBRE LA EXCRECIÓN URINARIA Y LA EXPRESIÓN RENAL DE OAT5 EN RATAS CON NEFROTOXICIDAD INDUCIDA POR CISPLATINO

Como última parte del trabajo de Tesis, con el objetivo de continuar caracterizando el comportamiento de la excreción urinaria de Oat5 en respuesta al daño renal inducido por el cisplatino, se evaluó si los niveles de dicho transportador en orina son sensibles a las modificaciones del estrés oxidativo y/o a la restauración de la función renal en forma independiente del cisplatino. En base a ello, se evaluó el efecto antioxidante de la NAC sobre la excreción urinaria y la expresión renal de Oat5 en ratas tratadas con cisplatino. La NAC ha demostrado tener un efecto renoprotector sobre el daño renal ocasionado por este antineoplásico y por el mercurio, entre muchas otras sustancias o compuestos nefrotóxicos (Girardi y Elias, 1991; Abdelrahman y Col., 2010; Shalby y Col., 2011).

Se trabajó con cuatro grupos experimentales, tal como se describió en el ítem 3.1.2.4 de la sección “Materiales y Métodos”: **Control**, **Cis5 4d**, **NAC** y el grupo **Cis + NAC**. En una primera instancia pudo comprobarse el efecto renoprotector de la NAC, ya que se observó una notable mejoría en la función renal en el grupo **Cis5 + NAC** con respecto a lo observado en los animales pertenecientes al grupo **Cis5 4d**, en los cuales se pudo apreciar el extenso daño renal que causa el cisplatino en forma de IRA (tal como se describió en los ítems 4.3.1 y 4.4.1 de la sección “Resultados”). Dicha mejoría quedó en evidencia ya que parámetros tales como la urea y la creatinina en plasma o el *clearance* renal de creatinina mostraron una importante tendencia a retornar a sus niveles basales, con respecto a lo observado en los animales que fueron tratados sólo con el cisplatino, en los cuales se encontraron valores significativamente alterados. Estos resultados se vieron acompañados por los estudios de histología renal, donde también se evidenció una notable mejoría en la morfología renal en el grupo **Cis5 + NAC** con respecto al grupo **Cis5 4d**, particularmente a nivel de los túbulos proximales, sitio donde el cisplatino se acumula en el riñón y dispara los mecanismos de injuria renal. Del mismo modo, los parámetros de función renal evaluados en orina en el grupo que recibió el cotratamiento con NAC no mostraron diferencias en sus valores con respecto a los valores controles. Al respecto, se sabe que la NAC tiene la capacidad de mejorar tanto a las funciones glomerulares como tubulares. Se ha hallado una significativa correlación entre el contenido renal del factor de necrosis tumoral α y las concentraciones en sangre de urea y creatinina (Mishima y Col., 2006). La NAC a través de sus efectos antiinflamatorios disminuiría los niveles elevados del factor de necrosis tumoral α inducidos por el cisplatino, y por ende ayudaría a mejorar la

función renal. Además, las importantes disminuciones observadas tras la administración de NAC en los niveles urinarios de proteínas tales como NAG y β 2-M en ratas tratadas con cisplatino, estarían demostrando que la NAC tiene la capacidad de mejorar la función tubular (Shalby y Col., 2011).

Por otra parte, la NAC no sólo disminuyó el importante aumento que causa la administración del cisplatino en la excreción urinaria de Oat5, sino que además produjo una disminución por debajo de los valores controles (una disminución del 56% con respecto al valor control, grupo **Cis5 + NAC**). Esto puede estar relacionado a que la NAC sola (grupo **NAC**) produjo que la abundancia de Oat5 en orina se vea disminuida de manera muy notable con respecto al grupo **Control** (una disminución del 88%). Por ende, la NAC puede no sólo estar evitando que se vea aumentada la eliminación de Oat5 por orina, como respuesta al daño ocasionado por el cisplatino al evitar el deterioro de la función y estructura renal, sino que además tenga un efecto *per se*, independientemente de su efecto renoprotector, que esté interfiriendo en los mecanismos de excreción de Oat5, haciendo que su excreción desde la membrana apical hacia la orina en formación se vea disminuida.

Lo que sí queda en claro a partir de los resultados obtenidos en esta parte del trabajo de Tesis es que cuando el daño renal que ocasiona el cisplatino es prevenido por la administración de un compuesto renoprotector como lo es la NAC, el aumento de la excreción urinaria de Oat5 no se observa.

Para indagar un poco más sobre el efecto de la NAC sobre los mecanismos de excreción urinaria de Oat5, y, por sobre todas las cosas dilucidar efectivamente si la vía de excreción exosomal se encuentra involucrada en la eliminación de Oat5 por orina (tal como se postuló anteriormente), se analizó la presencia del transportador en cuestión en exosomas urinarios aislados a partir de la orina total.

Como bien se pudo observar en el ítem 4.4.2.1 de la sección “Resultados”, *este trabajo de Tesis ha sido pionero en la detección de Oat5 en exosomas urinarios*. En base a esto entonces, se comparó luego la abundancia de Oat5 en exosomas urinarios en los diferentes grupos experimentales. Por un lado, se observó un aumento significativo de Oat5 en dichos exosomas en los animales tratados con el cisplatino (**Cis5 4d**), en un porcentaje similar a lo hallado en orina total (se observó un aumento de casi un 200%).

Por ende, la vía de excreción exosomal sería posiblemente el principal mecanismo por el cual Oat5 es excretado hacia orina.

Estos resultados son de relevancia, ya que hasta la fecha no se contaba con estudios que analicen las vías involucradas en la excreción urinaria de Oat5 y proveen de nuevos aportes que contribuyen a la caracterización de este transportador.

Por otra parte, se pudo observar que la administración de la NAC sola también produjo una disminución de la abundancia de Oat5 en los exosomas urinarios, al igual que lo observado en orina total. Sin embargo, la disminución en este caso fue de menor magnitud que la evidenciada en orina total (una disminución de alrededor del 40%). En los animales cotratados con cisplatino y NAC también se observó que la coadministración de la NAC previno el aumento de los niveles de Oat5 en exosomas urinarios, donde nuevamente, al igual que en orina total, no sólo previno el importante aumento hallado, sino que además produjo una disminución por debajo de los niveles de los animales controles (una disminución del 40% con respecto al valor control).

En base a las últimas observaciones podemos decir que la excreción urinaria de Oat5 se produce principalmente por la vía de excreción exosomal, y que la NAC estaría, de alguna manera, interfiriendo en alguno de los procesos involucrados en dicha vía. Qué punto específico de la cadena de acontecimientos que se ponen en marcha en la maquinaria exosomal estaría alterando la NAC se desconoce, y más experimentos son necesarios para dilucidar este interrogante.

Otros biomarcadores urinarios han demostrado tener un comportamiento diferente a la excreción de Oat5 en orina en modelos similares de animales cotratados con cisplatino y con NAC. Al respecto, se ha evidenciado un importante aumento en la excreción urinaria de β_2 -M y NAG tras la injuria renal causada por el cisplatino, al igual que lo observado para Oat5 en orina. Pero, a diferencia de Oat5, estos dos biomarcadores urinarios sí han retornado a sus valores basales cuando se les coadministró la NAC (Shalby y Col., 2011).

Por otra parte, en modelos de nefrotoxicidad inducida por cisplatino, el notable aumento observado en los niveles de NAG en orina se halló parcialmente disminuida cuando se les coadministró tetrametilpirazina, un compuesto renoprotector en diferentes tipos de enfermedades renales (Ali y Col., 2008). Por ende, diferentes biomarcadores urinarios pueden responder de manera distinta ante la prevención de la injuria renal por diferentes compuestos antioxidantes.

Por otra parte, la significativa disminución observada en los niveles de Oat5 en orina, como también en los niveles urinarios de β_2 -M y NAG (Shalby y Col., 2011) hallados en animales cotratados con cisplatino y NAC, con respecto a los tratados solamente con cisplatino, estarían indicando la eficiencia que tiene la NAC en mejorar las funciones tubulares del riñón. Como bien se expuso en la introducción, la NAG en orina es un indicador de daño tubular y la β_2 -M de daño en túbulo proximal, ya que es libremente filtrado en los glomérulos y luego reabsorbido en los túbulos proximales. Los estudios histológicos realizados en este trabajo y por otros autores (Shalby y Col., 2011), corroboran la mejoría tubular que produce la NAC en el daño renal causado por el cisplatino.

La disminución observada en la expresión de Oat5 a nivel de homogenado renal producto de la administración del cisplatino (de aproximadamente del 55%) se halló aminorada parcialmente cuando los animales fueron cotratados con NAC (se observó en dicho grupo una disminución del 24% con respecto a los valores controles). Esto puede deberse a que la NAC estaría mejorando la función de síntesis o disminuyendo la velocidad de degradación de Oat5 producto de su efecto antioxidante, lo cual quedó en evidencia en el grupo que sólo fue tratado con la NAC, en donde la expresión de dicho transportador a nivel de homogenado se halló significativamente aumentado con respecto al grupo **Control** (un aumento de alrededor del 50%). Que la coadministración de la NAC no haya prevenido totalmente la disminución en la expresión de Oat5 observada en los animales tratados con cisplatino, puede ser sólo una cuestión de tiempo: tal vez si la expresión hubiera sido evaluada a mayores tiempos luego de la coadministración de la NAC, ésta podría haberse encontrado normalizada con respecto a la expresión en los animales controles.

La disminución en la expresión de Oat5 a nivel de membranas apicales observada tras la administración del cisplatino (de alrededor de un 50%) no se halló, por el contrario, aminorada por la coadministración de la NAC. Esto podría ser explicado porque a nivel de membrana apical la administración de NAC por sí sola no produjo ningún cambio en la abundancia de Oat5 con respecto a los animales controles, ya que probablemente la NAC no estaría produciendo por sí misma modificaciones en el tráfico de Oat5 desde el citoplasma hacia la membrana apical.

5.5 CONCLUSIONES FINALES

La IRA es un síndrome clínico complejo, con múltiples etiologías y factores de riesgos, con diferentes manifestaciones clínicas y un pronóstico poco predecible. La falta de marcadores de daño renal con la capacidad de detectar de manera temprana el comienzo de la injuria, y que sean altamente específicos y sensibles al tipo de daño ha representado un obstáculo difícil de sortear en la clínica médica. Como bien ha sido discutido extensamente en este trabajo de Tesis, los marcadores que tradicionalmente se han utilizado para evaluar el daño renal son poco precisos, y muestran alteraciones en sus valores de manera tardía con respecto al comienzo del daño. Debido a ello, la IRA es diagnosticada recién cuando un número significativo de nefronas se encuentran dañadas. Todo esto entonces estaría retrasando así el diagnóstico del cuadro y la intervención terapéutica, lo cual empeora el pronóstico del paciente. Biomarcadores que permitan una detección temprana y precisa mejorarían significativamente las tasas de morbilidad y mortalidad al permitir un diagnóstico precoz de la IRA (Khan y Col., 2010; Schifffl y Lang, 2013; Ronco, 2014).

En base a esto, la identificación de nuevos biomarcadores de IRA ha sido declarado de primera prioridad por la Sociedad Americana de Nefrología (Nguyen y Col., 2008). Numerosos trabajos han sido realizados en los últimos años con el objetivo de hallar nuevos biomarcadores de IRA, tanto en orina como en plasma. Sin embargo, la orina ha proveído de los candidatos más promisorios (Ferguson y Col., 2008).

En este trabajo de Tesis se intentó realzar la importancia de los niveles urinarios de Oat5 como un novedoso biomarcador temprano de IRA, empleándose para ello un modelo de IRA inducida por cisplatino. Los distintos experimentos realizados aquí permitieron la **caracterización** del comportamiento de la excreción urinaria de Oat5, y pueden ser resumidos de la siguiente manera:

- La excreción de Oat5 por orina podría ser utilizado como un **biomarcador temprano de IRA** inducida por cisplatino, ya que se encontró aumentado cuando todavía no se habían hallado alteraciones en parámetros tradicionalmente utilizados para evaluar daño renal, tanto a bajas dosis como a altas dosis del antineoplásico.

- Además, si bien la abundancia de Oat5 en orina podría servir como un biomarcador temprano de daño renal, alertando sobre el comienzo de la injuria, **ésta no resultaría útil para monitorear el progreso y la reversión de la función renal en un cuadro de IRA inducida por cisplatino.**

- Por otra parte, la excreción urinaria de Oat5 se encuentra significativamente aumentada **en respuesta a la producción de daño renal**, ya que cuando dicho daño es aminorado por la coadministración de un compuesto con efecto renoprotector como la NAC, dicho aumento no se produce.

- **Oat5 fue detectado por primera vez en la fracción exosomal de la orina**, con lo cual se plantea que **la excreción urinaria de Oat5 se produciría principalmente mediante la vía de excreción exosomal**, la cual es una de las principales vías propuestas como vía de eliminación por orina de las proteínas de membrana apical de las células de los túbulos proximales.

- No hay que perder de vista que la excreción urinaria de Oat5 se encuentra **aumentada en respuesta al daño renal en distintos tipos de IRA**, ya que se ha hallado aumentada, también de manera temprana, en modelos de IRA inducidas por isquemia y por cloruro mercuríco (Di Giusto y Col., 2009; Di Giusto y Torres, 2010).

Por ende, Oat5 en orina podría ser utilizado como un novedoso biomarcador temprano y no invasivo de IRA de diferentes etiologías.

El descubrimiento de nuevos biomarcadores de daño renal mucho más precisos y sensibles que los marcadores que se utilizan actualmente, y su posterior incorporación a la práctica médica como test de rutina, permitirá en un futuro contar con numerosas ventajas para el diagnóstico de la IRA. Dichos biomarcadores permitirán diferenciar las etiologías de la IRA, predecir la severidad del cuadro (lo cual a su vez ayudará a establecer el pronóstico

del paciente), monitorear la efectividad de una terapia dada y determinar con exactitud el sitio donde se produce la injuria, con lo cual se podrá dirigir específicamente las terapias que ayuden a paliar y aminorar dicho daño (Molitoris y Col., 2008).

Sin embargo, las características que son requeridas para que un dado biomarcador tenga el estatus necesario para que pueda ser empleado como test de rutina en la práctica clínica son muchas. Debe poder ser medido con un método rápido y fácil, y la metodología empleada para hacerlo debe tener un costo razonable; tiene que poder ser medido en un fluido fácilmente accesible; debe presentar reproducibilidad ante medidas repetidas; debe presentar valores umbrales bien definidos y documentados por estudios previos y sus valores deben correlacionarse con el desarrollo y severidad de la enfermedad. **Que un único biomarcador en particular sea capaz de reunir todas estas condiciones y permita así definir de manera clara un estado patológico en particular resulta difícil de lograr** (Ronco, 2014).

Hay que tener en cuenta que diferentes biomarcadores pueden proporcionar diferentes tipos de información: algunos reflejarán influencias sistémicas, otros hablarán sobre la extensión y el sitio del daño renal, mientras que otros reflejarán las consecuencias funcionales del daño tubular, por ejemplo. Además, no todos presentan los mismos patrones de sus niveles en el tiempo a lo largo del desarrollo y progresión del cuadro de IRA, ya que algunos, como es el caso de la excreción urinaria de Oat5 se encuentran elevados de manera rápida luego de que se produce la injuria renal y luego sus valores declinan rápidamente, mientras que otros se correlacionan en todo momento con el grado de injuria renal en el curso de la instauración, progresión y reversión de una IRA, tal como es el caso de Kim-1 en orina.

Por ende, debido a la gran heterogeneidad en las manifestaciones de las distintas enfermedades renales y los diferentes marcos en donde se desarrolla un cuadro de IRA, un conjunto o “panel” de biomarcadores cuidadosamente seleccionados podría resultar más apropiado para caracterizar apropiadamente una IRA en un paciente en particular. Sin embargo, el poder establecer dicho conjunto de biomarcadores requiere de estudios complejos y correctamente diseñados, de manera de que permitan comparar diferentes biomarcadores en los mismos sets de orinas a lo largo del tiempo. Esto permitiría establecer patrones temporales que sean específicos del mecanismo de la injuria renal producida, de una dada población de interés y que tengan en cuenta enfermedades coexistentes. Dichos estudios ayudarán no sólo a definir la utilidad de los diferentes biomarcadores no tradicionales, sino que también contribuirán a aumentar el conocimiento de la fisiopatología de la IRA y ayudar así al desarrollo de intervenciones para disminuir la injuria renal, y mejorar los pronósticos de los pacientes (Fergusson y Col., 2008).

Perspectivas a futuro

El siguiente paso en nuestro trabajo de investigación será pasar de la etapa preclínica con animales a la etapa de investigación clínica, donde se pueda evaluar la utilidad de la excreción urinaria de Oat5 como biomarcador temprano de IRA en humanos. Sin embargo, como bien mencionamos anteriormente, las características requeridas para que un dado biomarcador tenga el estatus necesario para ser empleado como test de rutina en la práctica clínica son muchas, y todavía falta mucho camino por recorrer del camino de la instalación de la excreción de Oat5 en orina como un biomarcador de rutina útil en la clínica para detectar de manera temprana la IRA. Sin embargo, los resultados aportados en este trabajo de Tesis, junto a trabajos previos (Di Giusto y Col., 2009; Di Giusto y Torres, 2010) resultan promisorios y realzan la utilidad de los niveles urinarios de Oat5 como un potencial y novedoso biomarcador temprano de IRA de diferentes etiologías.

6. BIBLIOGRAFÍA

- 1. Abdelrahman A.L., Al Salam S., AlMahruqui A.S., Al husseni I.S., Mansour M.A., Ali B.H.** (2010) N-acetylcysteine improves renal hemodynamics in rats with cisplatin-induced nephrotoxicity. *J. Appl. Toxicol.* 30, 15-21
- 2. Adiyanti S.S., Loho T.** (2012) Acute Kidney Injury (AKI) biomarker. *Acta Med. Indones.* 44, 246-255
- 3. Ajith T.A., Nivitha V., Usha S.** (2007) Zingiber officinale Roscoe alone and in combination with alpha-tocopherol protect the kidney against cisplatin-induced acute renal failure. *Food. Chem. Toxicol.* 45, 921-927
- 4. al-Awadi F.M., al-Adnani M.S.** (1989) Structural changes in glomeruli and proteinuria in streptozotocin diabetic rats. *Histol. Histopathol.* 4, 129-135
- 5. Albers B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.** (2002) *Biología Molecular de la Célula*; 3° Ed., Omega, Barcelona, España
- 6. Albers J.W., Chaudhry V., Cavaletti G., Donehower R.C.** (2011) Interventions for preventing neuropathy caused by cisplatin and related compounds. *Cochrane Database Syst. Rev.* 16, CD005228
- 7. Alderden R.A., Hall M.D., Hambley T.W.** (2006) The Discovery and Development of Cisplatin. *J. Chem. Educ.* 83, 728-734
- 8. Aleksunes L.M., Augustine L.M., Scheffer G.L., Cherrington N.J., Manautou J.E.** (2008) Renal xenobiotic transporters are differentially expressed in mice following cisplatin treatment. *Toxicology* 250, 82-88
- 9. Ali B.H., Al-Moundhri M., Eldin M.T., Nemmar A., Al-Siyabi S., Annamalai K.** (2008) Amelioration of cisplatin-induced nephrotoxicity in rats by tetramethylpyrazine, a major constituent of the Chinese herb *Ligusticum wallichii*. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 233, 891-896
- 10. Alpers C.E.** (2005) El riñón. En: Robbins y Coltran. *Patología Estructural y Funcional*. 7° Ed.; Editores: Kumar V. Abbas A.K., Fausto N.; Elsevier España S.L.; Barcelona, España, pp: 959-1024
- 11. Alvarez S., Suazo C., Boltansky A., Ursu M., Carvajal D., Innocenti G., Vukusich A., Hurtado M., Villanueva S., Carreño J.E., Rogelio A., Irarrazabal C.E.** (2013) Urinary exosomes as a source of kidney dysfunction biomarker in renal transplantation. *Transplant. Proc.* 45, 3719-3723

12. **Anzai N., Jutabha P., Enomoto A., Yokoyama H., Nonoguchi H., Hirata T., Shiraya K., He X., Cha S.H., Takeda M., Miyazaki H., Sakatada T., Tomita K., Igarashi T., Kanai Y., Endou H.** (2005) Functional characterization of rat organic anion transporter 5 (Slc22a19) at the apical membrane of renal proximal tubules. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 315, 534–544
13. **Anzai N., Kanai Y., Endou H.** (2006) Organic anion transporter family: current knowledge. *J. Pharmacol. Sci.* 100, 411-426
14. **Appenroth D., Winnefeld K., Schröter H., Rost M.** (1993) Beneficial effect of acetylcysteine on cisplatin nephrotoxicity in rats. *J. Appl. Toxicol.* 13, 189-192
15. **Arjumand W., Seth A., Sultana S.** (2011) Rutin attenuates cisplatin induced renal inflammation and apoptosis by reducing NFκB, TNF-α and caspase-3 expression in wistar rats *Food. Chem. Toxicol.* 49, 2013-2021
16. **Astolfi L., Ghiselli S., Guaran V., Chicca M., Simoni E., Olivetto E., Lelli G., Martini A.** (2013) Correlation of adverse effects of cisplatin administration in patients affected by solid tumours: a retrospective evaluation. *Oncol. Rep.* 29, 1285-1292
17. **Bearcroft C.P., Domizio P., Mourad F.H., André E.A., Farthing M.J.** (1999) Cisplatin impairs fluid and electrolyte absorption in rat small intestine: a role for 5-hydroxytryptamine. *Gut* 44, 174-179
18. **Bellomo R., Kellum J.A., Ronco C.** (2012) Acute kidney injury. *Lancet* 380, 756-766
19. **Benito-Martin A., Uceró A.C., Zubiri I., Posada-Ayala M., Fernandez-Fernandez B., Cannata-Ortiz P., Sanchez-Nino M.D., Ruiz-Ortega M., Egido J., Alvarez-Llamas G., Ortiz A.** (2013) Osteoprotegerin in exosome-like vesicles from human cultured tubular cells and urine. *PLoS One* 68, e72387
20. **Biomarkers Definitions Working Group.** (2001) Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* 69, 89-95
21. **Bonventre J.V., Vaidya V.S., Schmouder R., Feig P., Dieterle F.** (2010) Next-generation biomarkers for detecting kidney toxicity. *Nat. Biotechnol.* 28, 436-440
22. **Bouvet B.R., Paparella C.V., Arriaga S.M., Monje A.L., Amarilla A.M., Almará A.M.** (2014) Evaluation of urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase as a marker of early renal damage in patients with type 2 diabetes mellitus. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 58, 798-801

- 23. Brandoni A. , Villar S.R., Picena J.C., Anzai N., Endou H., Torres A.M.** (2006a) Expression of rat renal cortical OAT1 and OAT3 in response to acute biliary obstruction. *Hepatology* 43, 1092-1100
- 24. Brandoni A., Anzai N., Kanai Y., Endou H., Torres A.M.** (2006b) Renal elimination of p-aminohippurate (PAH) in response to three days of biliary obstruction in the rat. The role of OAT1 and OAT3. *Biochim. Biophys. Acta* 1762, 673–682
- 25. Breljak D., Ljubojevic M., Balen D., Zlender V., Brzica H., Micek V., Kusan M., Anzai N., Sabolic I.** (2010) Renal expression of organic anion transporter Oat5 in rats and mice exhibits the female-dominant sex differences. *Histol. Histopathol.* 25, 1385-1402
- 26. Brunton L., Chabner B., Knollman B.** (2012) Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica; 12° Ed., McGraw-Hill Interamericana Editores S.A., México D.F., México
- 27. Burckhardt G.** (2012) Drug transport by Organic Anion Transporters (OATs). *Pharmacol. Ther.* 136, 106-130
- 28. Burger H., Loos W.J., Eechoute K., Verweij J., Mathijssen R.H., Wiemer E.A.** (2011) Drug transporters of platinum-based anticancer agents and their clinical significance. *Drug. Resist. Updat.* 14, 22-34
- 29. Calabia E.R.** (2004) Medida de la función renal. Evaluación del cociente microalbuminuria/creatinina. Valor de la tira reactiva y del examen del sedimento urinario. Indicaciones para solicitar ecografía renal. *Nefrología* 24, 35-46
- 30. Chatamra K., Daniel P.M., Lam D.K.** (1984) The effects of fasting on core temperature, blood glucose and body and organ weights in rats. *Q. J. Exp. Physiol.* 69, 541-545
- 31. Claassen V.** (1994) Neglected factors in pharmacology and neuroscience research: biopharmaceutics, animal characteristics, maintenance, testing conditions. En: *Techniques in the Behavioural and Neural Sciences*. Elsevier Science B.V., Amsterdam, Holanda, Vol. 12, pp: 1-486
- 32. Dasari S., Tchounwou P.B.** (2014) Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur. J. Pharmacol.* 740, 364-378
- 33. Dashti-Khavidaki S., Moghaddas A., Heydari B., Khalili H., Lessan-Pezeshki M., Lessan-Pezeshki M.** (2013) Statins against drug-induced nephrotoxicity. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 16, 588-608

- 34. Di Giorno C., Pinheiro H.S., Heinke T., Franco M.F., Galante N.Z., Pacheco-Silva A, Camara N.O.** (2006) Beneficial effect of N-acetyl-cysteine on renal injury triggered by ischemia and reperfusion. *Transplant. Proc.* 38, 2774-2776
- 35. Di Giusto G., Torres A.M.** (2009) Transport Studies in Plasma Membrane Vesicles Isolated from Renal cortex. En: *Experimental Surgical Models in the Laboratory Rat*. Editores: Rigalli A. y Di Loreto V.E.; CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL, USA, pp 189-194
- 36. Di Giusto G., Anzai N., Endou H., Torres A.M.** (2009) Oat5 and NaDC1 protein abundance in kidney and urine after renal ischemic reperfusion injury. *J. Histochem. Cytochem.* 57, 17-27
- 37. Di Giusto G., Torres A.M.** (2010) Organic anion transporter 5 renal expression and urinary excretion in rats exposed to mercuric chloride: a potential biomarker of mercury-induced nephropathy. *Arch. Toxicol.* 84, 741-749
- 38. Di Loreto V.E., Rigalli A.** (2009) Measurements Techniques of Renal Parameters. En: *Experimental Surgical Models in the Laboratory Rat*; Editores: Rigalli A. y Di Loreto V.E.; CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL, USA, pp 161-168
- 39. Dickey D.T., Muldoon L.L., Doolittle N.D., Peterson D.R., Kraemer D.F., Neuwelt E.A.** (2008) Effect of N-acetylcysteine route of administration on chemoprotection against cisplatin-induced toxicity in rat models. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 62, 235-241
- 40. Dickey D.T., Wu Y.J., Muldoon L.L., Neuwelt E.A.** (2005) Protection against cisplatin-induced toxicities by N-acetylcysteine and sodium thiosulfate as assessed at themolecular, cellular, and in vivo levels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 3, 1052-1058
- 41. Dobyan D.C., Levi J., Jacobs C., Kosek J., Weiner M.W.** (1980) Mechanism of cis-platinum nephrotoxicity: II. Morphologic observations. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 213, 551-556
- 42. dos Santos N.A., Martins N.M., Curti C., Pires Bianchi M.de L., dos Santos A.C.** (2007) Dimethylthiourea protects against mitochondrial oxidative damage induced by cisplatin in liver of rats. *Chem. Biol. Interact.* 170, 177-186
- 43. Ecelbarger C.A., Sands J.M., Doran J.J., Cacini W., Kishore B.K.** (2001) Expression of salt and urea transporters in rat kidney during cisplatin-induced polyuria. *Kidney Int.* 60, 2274-2282
- 44. Efrati S., Averbukh M., Berman S., Feldman L., Dishy V., Kachko L., Weissgarten J, Golik A., Averbukh Z.** (2005) N-Acetylcysteine ameliorates lithium-induced renal failure in rats. *Nephrol. Dial. Transplant.* 20, 65-70

45. **Ekor M., Adesanoye O.A., Farombi E.O.** (2010) N-acetylcysteine pretreatment ameliorates mercuric chloride-induced oxidative renal damage in rats. *Afr. J. Med. Med. Sci.* 39 Suppl, 153-160
46. **Esteva-Font C., Wang X., Ars .E, Guillén-Gómez E., Sans L., González Saavedra I., Torres F., Torra R., Masilamani S., Ballarín J.A., Fernández-Llama P.** (2010) Are sodium transporters in urinary exosomes reliable markers of tubular sodium reabsorption in hypertensive patients? *Nephron. Physiol.* 114, 25-34
47. **Fang D.Y., King H.W., Li J.Y., Gleadle J.M.** (2013) Exosomes and the kidney: blaming the messenger. *Nephrology (Carlton)* 18, 1–10
48. **Ferguson M.A., Vaidya V.S., Bonventre J.V.** (2008) Biomarkers of nephrotoxic acute kidney injury. *Toxicology* 245, 182-193
49. **Fishbane S., Durham J.H., Marzo K., Rudnick M.** (2004) N-acetylcysteine in the prevention of radiocontrast-induced nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15:251-60
50. **Flórez J.** (2008) Quimioterapia antineoplásica, En: *Farmacología Humana*. 5° Ed. Editado por Flórez J., Armijo J.A. Mediavilla A. Elsevier Masson, Barcelona, España, pp 1129-1171
51. **Gautier J.C., Riefke B., Walter J., Kurth P., Mylecraine L., Guilpin V., Barlow N., Gury T., Hoffman D., Ennulat D., Schuster K., Harpur E., Pettit S.** (2010) Evaluation of novel biomarkers of nephrotoxicity in two strains of rat treated with Cisplatin. *Toxicol. Pathol.* 38, 943-956
52. **Geneser F.** (2008) Finn Geneser. *Histología*; 3° Ed., Panamericana, Buenos Aires. Argentina
53. **Gillissen A.** (2011) Actualizan el Uso Terapéutico de la N-Acetilcisteína y los Mecanismos de Acción Involucrados. *Traducción de: Pneumologie* 65, 549-557
54. **Girardi G., Elias M.M.** (1991) Effectiveness of N-acetylcysteine in protecting against mercuric chloride-induced nephrotoxicity. *Toxicology* 67, 155-164
55. **Antunes L.M., Darin J.D., Bianchi M.D.** (2000) Protective effects of vitamin C against cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in adult rats: a dose-dependent study. *Pharmacol. Res.* 41, 405-411
56. **Gonzales P.A., Pisitkun T., Hoffert J.D., Tchapyjnikov D., Star R.A., Kleta R., Wang N.S., Knepper M.A.** (2009) Large-scale proteomics and phosphoproteomics of urinary exosomes. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20, 363-379
57. **Han W.K.** (2012) Biomarkers for early detection of acute kidney injury. *Curr. Biomark. Find.* 2, 77–85

- 58. Hanigan M.H., Devarajan P.** (2003) Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. *Cancer Ther.* 1, 47-61
- 59. Haragsim L., Zima T., Nemecek K.** (1994) Nephrotoxic effects of platinum cytostatics-preventative effects of nifedipine and cimetidine. *Sb. Lek.* 95, 173-183
- 60. Honore P.M., Jacobs R., Joannes-Boyau O., Verfaillie L., De Regt J., Van Gorp V., De Waele E., Boer W., Collin V., Spapen H.D.** (2012) Biomarkers for early diagnosis of AKI in the ICU: ready for prime time use at the bedside? *Ann. Intensive Care* 2, 24
- 61. Hoorn E.J., Pisitkun T., Zietse R., Gross P., Frokiaer J., Wang N.S., Gonzales P.A., Star R.A., Knepper M.A.** (2005) Prospects for urinary proteomics: exosomes as a source of urinary biomarkers. *Nephrology (Carlton)* 10, 283-290
- 62. Hosohata K., Ando H., Fujimura A.** (2012) Urinary vanin-1 as a novel biomarker for early detection of drug-induced acute kidney injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 341, 656-662
- 63. Ichimura T., Hung C.C., Yang S.A., Stevens J.L., Bonventre J.V.** (2004) Kidney injury molecule-1: a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury. *Am J. Physiol. Renal Physiol.* 286, F552-563
- 64. Jamieson E.R., Lippard S.J.** (1999) Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem. Rev.* 99, 2467-2498
- 65. Kaushal G.P., Kaushal V., Hong X., Shah S.V.** (2001) Role and regulation of activation of caspases in cisplatin-induced injury to renal tubular epithelial cells. *Kidney Int.* 60, 1726-1736
- 66. Khan E., Batuman V., Lertora J.J.** (2010) Emergence of biomarkers in nephrotoxicology. *Biomark. Med.* 4, 805-814
- 67. Kuhlmann M.K., Burkhardt G., Köhler H.** (1997) Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. *Nephrol. Dial. Transplant.* 12, 2478-2480
- 68. Kim S.W., Lee J.U., Nah M.Y., Kang D.G., Ahn K.Y., Lee H.S., Choi K.C.** (2001) Cisplatin decreases the abundance of aquaporin water channels in rat kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12, 875-882
- 69. Kodama A., Watanabe H., Tanaka R., Kondo M., Chuang V.T., Wu Q., Endo M., Ishima Y., Fukagawa M., Otagiri M., Maruyama T.** (2014) Albumin fusion renders thioredoxin an effective anti-oxidative and anti-inflammatory agent for preventing cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biochim. Biophys. Acta.* 1840, 1152-1162

70. **Konvalinka A.** (2014) Urine proteomics for acute kidney injury prognosis: another player and the long road ahead. *Kidney Int.* 85, 735-738
71. **Koyner J.L., Vaidya V.S., Bennett M.R., Ma Q., Worcester E., Akhter S.A., Raman J., Jeevanandam V., O'Connor M.F., Devarajan P., Bonventre J.V., Murray P.T.** (2010) Urinary biomarkers in the clinical prognosis and early detection of acute kidney injury. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 5, 2154-2165
72. **Kurien B.T., Everds N.E., Scofield H.** (2004) Experimental animal urine collection: a review. *Lab. Anim.* 38, 333-361
73. **Kwak J.O., Kim H.W., Oh K.J., Ko C.B., Park H., Cha S.H.J.** (2005) Characterization of mouse organic anion transporter 5 as a renal steroid sulfate transporter. *Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 97, 369-375
74. **Laredo L.M. y García-Arenillas M.M.** (2005) Utilización de fármacos en la insuficiencia renal. Nefrotoxicidad por fármacos. En: Velázquez. *Farmacología básica y Clínica.* 17 ° Ed.; Editores: Lorenzo P., Moreno A., Leza J.C., Lizasoain I., Moro M.A.; Editorial Médica Panamericana, Madrid, España, pp. 1161-1171
75. **Lee W., Kim R.B.** (2004) Transporters and renal drug elimination. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44, 137-166
76. **Liu T., Meng Q., Wang C., Liu Q., Guo X., Sun H., Peng J., Ma X., Kaku T., Liu K.** (2012) Changes in expression of renal Oat1, Oat3 and Mrp2 in cisplatin-induced acute renal failure after treatment of JBP485 in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 264, 423-30
77. **Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.** (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
78. **Sweetman S.C.** (2009) *Martindale: The Complete Drug Reference.* 36° Ed.; The Pharmaceutical Press, Londres, Inglaterra
79. **Marullo R., Werner E., Degtyareva N., Moore B., Altavilla G., Ramalingam S.S., Doetsch P.W.** (2013) Cisplatin induces a mitochondrial-ROS response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and bioenergetic functions. *PLoS One* 8, e81162
80. **Mazzon E., Britti D., De Sarro A., Caputi A.P., Cuzzocrea S.** (2001) Effect of N-acetylcysteine on gentamicin-mediated nephropathy in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 424, 75-83

- 81. McDuffie J.E., Ma J.Y., Sablad M., Sonee M, Varacallo L., Loudon C., Guy A., Vegas J., Liu X., La D., Snook S.** (2013) Time course of renal proximal tubule injury, reversal, and related biomarker changes in rats following Cisplatin administration. *Int. J. Toxicol.* 32, 251-260
- 82. McMahan G.M., Waikar S.S.** (2013) Biomarkers in nephrology: Core Curriculum 2013. *Am. J. Kidney Dis.* 62, 165-178
- 83. Miller R.P., Tadagavadi R.K., Ramesh G., Reeves W.B.** (2010) Mechanisms of Cisplatin Nephrotoxicity. *Toxins (Basel)* 2, 2490-2518
- 84. Mishima K., Baba A., Matsuo M., Itoh Y., Oishi R.** (2006) Protective effect of cyclic AMP against cisplatin-induced nephrotoxicity. *Free Radic. Biol. Med.* 40, 1564-1577
- 85. Mishra J., Ma Q., Prada A., Mitsnefes M., Zahedi K., Yang J., Barasch J., Devarajan P.** (2003) Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14, 2534-2543
- 86. Mishra J., Mori K., Ma Q., Kelly C., Barasch J., Devarajan P.** (2004) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a novel early urinary biomarker for cisplatin nephrotoxicity. *Am. J. Nephrol.* 24, 307-315
- 87. Miyahira Arakaki J.M.** (2003) Insuficiencia renal aguda. *Rev. Med. Hered.* 14, 36-47
- 88. Molitoris B.A., Melnikov V.Y., Okusa M.D., Himmelfarb J.** (2008) Technology Insight: biomarker development in acute kidney injury- what can we anticipate? *Nat. Clin. Pract. Nephrol.* 4, 154-165
- 89. Montagna G., Hofer C.G., Torres A.M.** (1998) Impairment of cellular redox status and membrane protein activities in kidneys from rats with ischemic acute renal failure. *Biochim. Biophys. Acta* 1407, 99-108
- 90. Morisaki T., Matsuzaki T., Yokoo K., Kusumoto M., Iwata K., Hamada A., Saito H.** (2008) Regulation of renal organic ion transporters in cisplatin-induced acute kidney injury and uremia in rats. *Pharm. Res.* 25, 2526-2533
- 91. Muraki K., Koyama R., Honma Y., Yagishita S., Shukuya T., Ohashi R., Takahashi F., Kido K., Iwakami S., Sasaki S., Iwase A., Takahashi K.** (2012) Hydration with magnesium and mannitol without furosemide prevents the nephrotoxicity induced by cisplatin and pemetrexed in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Dis.* 4, 562-568
- 92. Naughton C.A.** (2008) Drug-induced nephrotoxicity. *Am. Fam. Physician.* 78, 743-750

- 93. Nguyen M.T., Devarajan P.** (2008) Biomarkers for the early detection of acute kidney injury. *Pediatr. Nephrol.* 23, 2151-2157
- 94. Nigam S.K., Bush K.T., Martovetsky G., Ahn S.Y., Liu H.C., Richard E., Bhatnagar V., Wu W.** (2015) The organic anion transporter (OAT) family: a systems biology perspective. *Physiol. Rev.* 95, 83-123
- 95. Nisar S., Feinfeld D.A.** (2002) N-acetylcysteine as salvage therapy in cisplatin nephrotoxicity. *Ren. Fail.* 24, 529-533
- 96. Nishihara K., Masuda S., Shinke H., Ozawa A., Ichimura T., Yonezawa A., Nakagawa S., Inui K., Bonventre J.V., Matsubara K.** (2013) Urinary chemokine (C-C motif) ligand 2 (monocyte chemoattractant protein-1) as a tubular injury marker for early detection of cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biochem. Pharmacol.* 85, 570-582
- 97. Nitescu N., Ricksten S.E., Marcussen N., Haraldsson B., Nilsson U., Basu S., Guron G.** (2006) N-acetylcysteine attenuates kidney injury in rats subjected to renal ischaemia-reperfusion. *Nephrol. Dial. Transplant.* 21, 1240-1247
- 98. Ozkok A., Edelstein C.L.** (2014) Pathophysiology of cisplatin-induced acute kidney injury. *Biomed. Res. Int.* 2014, 967826
- 99. Pabla N., Dong Z.** (2008) Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney Int.* 73, 994-1007
- 100. Palipoch S., Punsawad C.** (2013) Biochemical and histological study of rat liver and kidney injury induced by Cisplatin. *J. Toxicol. Pathol.* 26, 293-299
- 101. Parikh C.R., Mishra J., Thiessen-Philbrook H., Dursun B., Ma Q., Kelly C., Dent C., Devarajan P., Edelstein C.L.** (2006) Urinary IL-18 is an early predictive biomarker of acute kidney injury after cardiac surgery. *Kidney Int.* 70, 199-203
- 102. Pavkovic M., Riefke B., Gutberlet K., Raschke M., Ellinger-Ziegelbauer H.** (2014) Comparison of the MesoScale Discovery and Luminex multiplex platforms for measurement of urinary biomarkers in a cisplatin rat kidney injury model. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 69, 196-204
- 103. Peres L.A., Cunha Júnior A.D., Schäfer A.J., Silva A.L., Gaspar A.D., Scarpari D.F., Alves J.B., Girelli Neto R., Oliveira T.F.** (2013) Biomarkers of acute kidney injury. *J. Bras. Nefrol.* 35, 229-236
- 104. Pinches M., Betts C., Bickerton S., Burdett L., Thomas H., Derbyshire N., Jones H.B., Moores M.** (2012a) Evaluation of novel renal biomarkers with a cisplatin model of kidney injury: gender and dosage differences. *Toxicol. Pathol.* 40, 522-533

- 105. Pinches M.D., Betts C.J., Bickerton S.J., Beattie L., Burdett L.D., Thomas H.T., Derbyshire N.A., Moores M.** (2012b) Evaluation of novel urinary renal biomarkers with a cisplatin model of kidney injury: effects of collection period. *Toxicol. Pathol.* 40, 534-540
- 106. Pinches M.D., Betts C.J., Bickerton S.J., Beattie L., Burdett L.D., Thomas H.T., Derbyshire N.A., Moores M., Price S.A.** (2012c) Evaluation of novel urinary renal biomarkers: biological variation and reference change values. *Toxicol. Pathol.* 40, 541-549
- 107. Pisitkun T., Shen R.F., Knepper M.A.** (2004) Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 13368-13373
- 108. Pisitkun T., Johnstone R., Knepper M.A.** (2006) Discovery of urinary biomarkers. *Mol. Cell. Proteomics* 5, 1760-1771
- 109. Poletti P.A., Saudan P., Platon A., Mermillod B., Sautter A.M., Vermeulen B., Sarasin F.P., Becker C.D., Martin P.Y.** (2007) I.V. N-acetylcysteine and emergency CT: use of serum creatinine and cystatin C as markers of radiocontrast nephrotoxicity. *Am. J. Roentgenol.* 189, 687-692
- 110. Price C.P., Newall R.G., Boyd J.C.** (2005) Use of protein:creatinine ratio measurements on random urine samples for prediction of significant proteinuria: a systematic review. *Clin. Chem.* 51, 1577-1586
- 111. Ramesh G., Reeves W.B.** (2004) Salicylate reduces cisplatin nephrotoxicity by inhibition of tumor necrosis factor- α . *Kidney Int.* 65, 490-499
- 112. Rizwan A.N., Burckhardt G.** (2007) Organic anion transporters of the SLC22 family: biopharmaceutical, physiological, and pathological roles. *Pharm. Res.* 24, 450-70
- 113. Rjiba-Touati K., Ayed-Boussema I., Belarbia A., Guedri Y., Zakhama A., Achour A., Bacha H.** (2013) The protective effect of recombinant human erythropoietin against cisplatin-induced renal and hepatic dysfunctions in Wistar rats. *Hum. Exp. Toxicol.* 32, 407-417
- 114. Ronco C.** (2014) AKI biomarkers www (who, where, when): you cannot treat what you do not know. *Blood Purif.* 38, I-II
- 115. Rosenberg B., Vancamp L., Krigas T.** (1965) Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* 205, 698-699
- 116. Rosenberg, B.; VanCamp, L.; Trosko, J.E.; Mansour, V.H.** (1969) Platinum compounds: A new class of potent antitumour agents. *Nature* 222, 385-386
- 117. Sabolić I.** (2006) Common mechanisms in nephropathy induced by toxic metals. *Nephron. Physiol.* 104, p107-114

- 118.Sabolić I., Asif A.R., Budach W.E., Wanke C., Bahn A., Burckhardt G.** (2007) Gender differences in kidney function. *Pflugers Arch.* 455, 397-429
- 119.Safirstein R.L.** (1999) Lessons learned from ischemic and cisplatin-induced nephrotoxicity in animals. *Ren. Fail.* 21, 359-364
- 120.Salinas P.** (2005) Fármacos antineoplásicos. En: Velázquez. *Farmacología Básica y Clínica.* 17° Ed.; Editores: Lorenzo P., Moreno A., Leza J.C., Lizasoain I., Moro M.A.; Editorial Médica Panamericana, Madrid, España, pp. 955-978
- 121.Sanchez-Gonzalez P.D., Lopez-Hernandez F., Perez-Barriocanal F., Morales A.I., Lopez-Novoa J.M.** (2011) Quercetin reduces cisplatin nephrotoxicity in rats without compromising its anti-tumour activity. *Nephrol. Dial. Transplant.* 26, 3484-3495
- 122.Santos N.A., Bezerra C.S., Martins N.M., Curti C., Bianchi M.L., Santos A.C.** (2008) Hydroxyl radical scavenger ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity by preventing oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 61, 145-155
- 123.Santoso J.T., Lucci J.A. 3rd, Coleman R.L., Schafer I., Hannigan E.V.** (2003) Saline, mannitol, and furosemide hydration in acute cisplatin nephrotoxicity: a randomized trial. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 52, 8-13
- 124.Schiffli H., Lang S.M.** (2013) Earlier diagnosis of acute kidney injury in critically ill patients by novel biomarkers: Moving from supportive care to targeted renoprotection? *OA Critical Care* 1, 5
- 125.Shalby A.B., Assaf N., Ahmed H.H.** (2011) Possible mechanisms for N-acetyl cysteine and taurine in ameliorating acute renal failure induced by cisplatin in rats. *Toxicol. Mech. Methods* 21, 538-546
- 126.Sheikh-Hamad D., Timmins K., Jalali Z.** (1997) Cisplatin-induced renal toxicity: possible reversal by N-acetylcysteine treatment. *J. Am. Soc. Nephrol.* 8, 1640-1644
- 127.Sinha V., Vence L.M., Salahudeen A.K.** (2013) Urinary tubular protein-based biomarkers in the rodent model of cisplatin nephrotoxicity: a comparative analysis of serum creatinine, renal histology, and urinary KIM-1, NGAL, and NAG in the initiation, maintenance, and recovery phases of acute kidney injury. *J. Investig. Med.* 61, 564-8
- 128.Sirota J.C., Klawitter J., Edelstein C.L.** (2011) Biomarkers of acute kidney injury. *J. Toxicol.* 2011, 328120
- 129.Srimaroeng C., Perry J.L., Pritchard J.B.** (2008) Physiology, structure, and regulation of the cloned organic anion transporters. *Xenobiotica* 38, 889-935

- 130.Star R.A.** (1998) Treatment of acute renal failure. *Kidney Int.* 54, 1817-1831
- 131.Takhtfooladi M.A., Jahanshahi A., Jahanshahi G., Sotoudeh A.,Takhtfooladi H.A., Khansari M.** (2012) Protective effect of N-acetylcysteine on kidney as a remote organ after skeletal muscle ischemia-reperfusion. *Acta Cir. Bras.* 27, 611-615
- 132.Thadhani R., Pascual M., Bonventre J.V.** (1996) Acute renal failure. *N. Engl. J.* 334, 1448-1460
- 133.Tiseo M., Martelli O., Mancuso A., Sormani M.P., Bruzzi P., Di Salvia R., De Marinis F., Ardizzoni A.** (2007) Short hydration regimen and nephrotoxicity of intermediate to high-dose cisplatin-based chemotherapy for outpatient treatment in lung cancer and mesothelioma. *Tumori* 93, 138-144
- 134.Townsend D.M., Hanigan M.H.** (2002) Inhibition of gamma-glutamyl transpeptidase or cysteine S-conjugate beta-lyase activity blocks the nephrotoxicity of cisplatin in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300, 142-148
- 135.Uehara T., Yamate J., Torii M., Maruyama T.** (2011) Comparative Nephrotoxicity of Cisplatin and Nedaplatin: Mechanisms and Histopathological Characteristics. *J. Toxicol. Pathol.* 24, 87-94
- 136.Vadiee K., Siddik Z.H., Khokhar A.R., al-Baker S., Sampedro F., Perez-Soler R.** (1992) Pharmacokinetics of liposome-entrapped cis-bis-neodecanoato-trans-R,R-1,2-diaminocyclohexane platinum(II) and cisplatin given i.v. and i.p. in the rat. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 30, 365-369
- 137.Vaidya V.S., Ramirez V., Ichimura T., Bobadilla N.A., Bonventre J.V.** (2006) Urinary kidney injury molecule-1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 290, F517-529
- 138.Vaidya V.S., Ferguson M.A., Bonventre J.V.** (2008) Biomarkers of acute kidney injury. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 48, 463-493
- 139.VanWert A.L., Gionfriddo M.R., Sweet D.H.** (2010) Organic anion transporters: discovery, pharmacology, regulation and roles in pathophysiology. *Biopharm. Drug. Dispos.* 31, 1-71
- 140.Vermeulen, J.K., De Vries A., F. Schlingmann F., Remie R.** (1997). Food deprivation: Common sense or nonsense? *Animal Technology* 48, 45-54
- 141.Villar S.R., Brandoni A., Quaglia N.B., Torres A.M.** (2004) Renal elimination of organic anions in rats with bilateral ureteral obstruction. *Biochim. Biophys. Acta* 1688, 204-209

- 142. Villar S.R., Brandoni A., Anzai N., Endou H., Torres A.M.** (2005) Altered expression of rat renal cortical OAT1 and OAT3 in response to bilateral ureteral obstruction. *Kidney Int.* 68, 2704-2713
- 143. Villar S.R., Brandoni A., Torres A.M.** (2008) Time course of organic anion excretion in rats with bilateral ureteral obstruction: role of organic anion transporters (Oat1 and Oat3). *Nephron. Physiol.* 110, p45-56
- 144. Vinken P., Starckx S., Barale-Thomas E., Looszova A., Sonee M., Goeminne N., Versmissen L., Buyens K., Lampo A.** (2012) Tissue Kim 1 and urinary clusterin as early indicators of cisplatin-induced acute kidney injury in rats. *Toxicol. Pathol.* 40, 1049-1062
- 145. Wadey R.M., Pinches M.G., Jones H.B., Riccardi D., Price S.A.** (2014) Tissue expression and correlation of a panel of urinary biomarkers following cisplatin-induced kidney injury. *Toxicol. Pathol.* 42, 591-602
- 146. Wang L., Sweet D.H.** (2013) Renal organic anion transporters (SLC22 family): expression, regulation, roles in toxicity, and impact on injury and disease. *AAPS J* 15, 53-69
- 147. Waring W.S.** (2012) Novel acetylcysteine regimens for treatment of paracetamol overdose. *Ther. Adv. Drug. Saf.* 3, 305-315
- 148. Wasung M.E., Chawla L.S., Madero M.** (2015) Biomarkers of renal function, which and when? *Clin. Chim. Acta.* 438, 350-357
- 149. Wu J., Chen Y.D., Gu W.** (2010) Urinary proteomics as a novel tool for biomarker discovery in kidney diseases. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 11, 227-237
- 150. Yao X., Panichpisal K., Kurtzman N., Nugent K.** (2007) Cisplatin Nephrotoxicity: A Review. *Am. J. Med. Sci.* 334, 115-124
- 151. Yokoo S., Yonezawa A., Masuda S., Fukatsu A., Katsura T., Inui K.** (2007) Differential contribution of organic cation transporters, OCT2 and MATE1, in platinum agent-induced nephrotoxicity. *Biochem. Pharmacol.* 74, 477-487
- 152. Yonezawa A., Masuda S., Nishihara K., Yano I., Katsura T., Inui K.** (2005) Association between tubular toxicity of cisplatin and expression of organic cation transporter rOCT2 (Slc22a2) in the rat. *Biochem. Pharmacol.* 70, 1823-1831
- 153. Youngblood G.L., Sweet D.H.** (2004) Identification and functional assessment of the novel murine organic anion transporter Oat5 (Slc22a19) expressed in kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 287, F236-244
- 154. Zalups R.K.** (2000) Molecular interactions with mercury in the kidney. *Pharmacol. Rev.* 52, 113-143

155.Zhang L., Hanigan M.H. (2003) Role of cysteine S-conjugate beta-lyase in the metabolism of cisplatin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 306, 988-994

156.Zhou H., Pisitkun T., Aponte A., Yuen P.S., Hoffert J.D., Yasuda H., Hu X., Chawla L., Shen R.F., Knepper M.A., Star R.A. (2006) Exosomal Fetuin-A identified by proteomics: a novel urinary biomarker for detecting acute kidney injury. *Kidney Int.* 70, 1847-1857

157.Zlender V., Breljak D., Ljubojević M., Flajs D., Balen D., Brzica H., Domijan A.M., Peraica M., Fuchs R., Anzai N., Sabolić I. (2009) Low doses of ochratoxin A upregulate the protein expression of organic anion transporters Oat1, Oat2, Oat3 and Oat5 in rat kidney cortex. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 239, 284-296

NOTAS:

