



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

Tesis de Doctorado

**EXCRECIÓN URINARIA DE TRANSPORTADORES DE ANIONES ORGÁNICOS EN NEFROPATÍA OBSTRUCTIVA. POTENCIALES BIOMARCADORES DE DAÑO RENAL**

Autora: Lic. Romina Valeria Campagno  
Directora: Prof. Dra. Adriana Mónica Torres  
Codirectora: Dra. Anabel Brandoni

Tesis para optar al título de Doctora en Ciencias Biológicas

Rosario, Argentina

2019

**“EXCRECIÓN URINARIA DE TRANSPORTADORES DE ANIONES ORGÁNICOS EN NEFROPATÍA OBSTRUCTIVA. POTENCIALES BIOMARCADORES DE DAÑO RENAL.”**

**Romina Valeria Campagno**

Licenciada en Genética

Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctora 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 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 de la Universidad Nacional de Rosario, durante el periodo comprendido entre abril de 2015 y noviembre de 2019, bajo la dirección de la Prof. Dra. Adriana M. Torres, y la codirección de la Dra. Anabel Brandoni.

..... Prof. Dra. Adriana M. Torres, Directora

..... Dra. Anabel Brandoni, Codirectora

..... Jurado de tesis

..... Jurado de tesis

..... Jurado de tesis

Defendida el: .....

Parte de los resultados que se describen en el presente trabajo de Tesis fueron publicados en los artículos y presentados en las reuniones científicas que se detallan a continuación.

#### **Publicaciones en revistas científicas indexadas:**

- “*Renal expression and urinary excretion of Na<sup>+</sup>/dicarboxylate cotransporter 1 (NaDC1) in obstructive nephropathy: a candidate biomarker for this pathology*” **Campagno, R.V.**; Severin, M.J.; Nosetto, E.C.; Brandoni, A.; Torres, A.M. *Pflügers Arch.* 470:1777-1786, 2018. doi: 10.1007/s00424-018-2200-6. ISSN 1432-2013
- “*Utility of urinary organic anion transporter 5 as a biomarker of obstructive nephropathy. Comparison with other markers of renal damage and evaluation of its expression in renal tissue*” **Campagno, R.V.**; Nosetto, E.C.; Brandoni, A.; Torres, A.M. (Manuscrito enviado a publicar).
- “*Renal and liver expression of the organic anion transporting polypeptide 1 in obstructive nephropathy. First detection of Oatp1 in urine, a potential early biomarker for this pathology*” **Campagno, R.V.**; Nosetto, E.C.; Brandoni, A.; Torres, A.M. (Manuscrito en preparación).

#### **Publicaciones en reuniones y congresos científicos:**

- “*Urinary excretion of the organic anion transporter 5 (Oat5) as a diagnostic biomarker of obstructive nephropathy*” **Campagno, R.V.**; Nosetto, E.C.; Brandoni, A.; Torres, A.M.  
Presentado en: Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Fisiología (SAFIS 2019). Rosario, 10-11 Octubre 2019.  
Publicado en: *Physiological Mini-Reviews Vol. 12: R1, 2019.*
- “*Renal expression and function of sodium-dicarboxylate cotransporter 1 (NaDC1) in rats with bilateral ureteral obstruction*” **Campagno, R.V.**; Nosetto, E.C.; Brandoni, A.; Torres, A.M.  
Presentado en: LXIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica; LXVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología; Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Fisiología (Reunión Conjunta SAIC.SAL.SAFIS 2018). Mar del Plata, 14-18 Noviembre 2018.  
Publicado en: *Medicina Vol. 78 (III) pág. 152, 2018.*  
Este trabajo ha sido reconocido con el **Premio al mejor Póster, área Nefrología.**
- “*Renal expression of the Organic anion transporting polypeptide 1 (Oatp1) in rats with obstructive nephropathy*” **Campagno, R.V.**; Nosetto, E.C.; Brandoni, A.M.; Torres, A.  
Presentado en: Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias, Buenos Aires, 13-17 Noviembre 2017.  
Publicado en: *Medicina Vol. 77 (1) pág. 127, 2017.*

- “*Urinary excretion of sodium-dicarboxylate cotransporter 1 (NaDC1) in a preclinical model of obstructive nephropathy*” **Campagno, R.V.**; Severin, M.J.; Brandoni, A.; Torres, A.M.  
Presentado en: LXI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Mar del Plata, 16-19 Noviembre 2016.  
Publicado en: *Medicina Vol. 76 (1) pág. 303, 2016.*
  
- “*Renal expression and urinary excretion of the organic anion transporter 5 (Oat5) in rats with obstructive nephropathy*” **Campagno, R.V.**; Nosetto, E.C.; Severin, M.J.; Brandoni, A.; Torres, A.M. Presentado en: LXI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Mar del Plata, 16-19 Noviembre 2016.  
Publicado en: *Medicina Vol. 76 (1) pág. 269, 2016.*  
Este trabajo ha sido reconocido con el **Primer premio Póster, área Farmacología.**

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>ABREVIATURAS</b> .....	I
<b>RESUMEN</b> .....	III
<b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1 Lesión renal aguda</b> .....	1
<b>1.2 Lesión postrenal u obstructiva</b> .....	2
1.2.1 Incidencia y prevalencia de la nefropatía obstructiva.....	3
1.2.2 Fisiopatología de la nefropatía obstructiva.....	3
1.2.2.1 Manifestaciones renales de la nefropatía obstructiva.....	4
1.2.2.2 Manifestaciones extrarenales de la nefropatía obstructiva.....	5
<b>1.3 Modelos experimentales de nefropatía obstructiva</b> .....	6
<b>1.4 Biomarcadores de lesión renal</b> .....	8
1.4.1 Definición de biomarcador y clasificación.....	8
1.4.2 La orina como fuente de biomarcadores.....	11
1.4.3 Biomarcadores convencionales de lesión renal aguda.....	12
1.4.4 Nuevos biomarcadores de lesión renal aguda.....	15
1.4.5 Biomarcadores específicos de nefropatía obstructiva.....	19
<b>1.5 Transportadores de aniones orgánicos</b> .....	21
1.5.1 Transportador de aniones orgánicos 5 (Oat5, Slc22a19).....	23
1.5.2 Cotransportador Na <sup>+</sup> /Dicarboxilatos 1 (NaDC1, Slc13a2).....	24
1.5.3 Polipéptido transportador de aniones orgánicos 1 (Oatp1, Slco1a1).....	25
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	27
<b>3 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	28
<b>3.1 Animales de experimentación</b> .....	28
<b>3.2 Diseño experimental</b> .....	28
<b>3.3 Obtención de muestras y procesamiento posterior</b> .....	30
<b>3.4 Monitoreo de la pérdida de peso corporal</b> .....	31
<b>3.5 Cálculo de la relación peso renal/peso corporal</b> .....	31
<b>3.6 Determinaciones bioquímicas</b> .....	32
3.6.1 Determinación de la concentración plasmática de urea.....	32
3.6.2 Determinación de la concentración de creatinina en muestras de plasma y orina.....	32

3.6.3 Determinación del <i>clearance</i> renal de creatinina.....	33
3.6.4 Determinación de las excreciones fraccionales de agua y osmoles.....	34
3.6.5 Determinación de la concentración de proteínas totales en orina.....	35
3.6.6 Determinación de la concentración de glucosa en plasma y orina.....	35
3.6.7 Determinación de la actividad de fosfatasa alcalina en orina.....	36
3.6.8 Determinación de la concentración de citrato en orina.....	36
3.6.9 Determinación de la concentración de proteínas en tejido renal.....	37
<b>3.7 Estudios en tejido renal.....</b>	<b>38</b>
3.7.1 Estudios histopatológicos y de inmunohistoquímica.....	38
3.7.2 Preparación de homogenados y obtención de membranas apicales de células de riñón.....	40
<b>3.8 Electroforesis y <i>Western blotting</i>.....</b>	<b>42</b>
<b>3.9 Análisis estadístico.....</b>	<b>44</b>
<b>3.10 Materiales.....</b>	<b>44</b>
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
<b>4.1 Caracterización del modelo experimental de nefropatía obstructiva.....</b>	<b>45</b>
<b>4.2 Evaluación de la función renal en ratas con nefropatía obstructiva de diferente periodo de evolución.....</b>	<b>50</b>
<b>4.3 Excreción urinaria y expresión renal del Transportador de aniones orgánicos 5 (Oat5) en ratas con nefropatía obstructiva.....</b>	<b>55</b>
4.3.1 Excreción urinaria de Oat5 en ratas con nefropatía obstructiva.....	55
4.3.1.1 Comparación de la Oat5 <sub>u</sub> con parámetros tradicionales de daño renal.....	56
4.3.2 Expresión renal de Oat5 en ratas con nefropatía obstructiva.....	57
4.3.2.1 Evaluación de la expresión renal de Oat5 mediante la técnica de electroforesis y <i>Western blotting</i> .....	57
4.3.2.2 Evaluación de la expresión renal de Oat5 mediante la técnica de inmunohistoquímica.....	58
<b>4.4 Excreción urinaria y expresión renal del Cotransportador Na<sup>+</sup>/Dicarboxilatos 1 (NaDC1) en ratas con nefropatía obstructiva.....</b>	<b>60</b>
4.4.1 Excreción urinaria de NaDC1 en ratas con nefropatía obstructiva.....	60
4.4.1.1 Comparación de la NaDC1 <sub>u</sub> con parámetros tradicionales de daño renal.....	60
4.4.2 Expresión renal de NaDC1 en ratas con nefropatía obstructiva.....	62
4.4.2.1 Evaluación de la expresión renal de NaDC1 mediante la técnica de electroforesis y <i>Western blotting</i> .....	62
4.4.2.2 Evaluación de la expresión renal de NaDC1 mediante la técnica de inmunohistoquímica.....	63
4.4.3 Excreción urinaria de citrato.....	64

<b>4.5 Excreción urinaria y expresión renal del Polipéptido transportador de aniones orgánicos 1 (Oatp1) en ratas con nefropatía obstructiva.....</b>	<b>66</b>
4.5.1 Excreción urinaria de Oatp1 en ratas con nefropatía obstructiva.....	66
4.5.1.1 Comparación de la Oatp1 <sub>u</sub> con parámetros tradicionales de daño renal.....	67
4.5.2 Expresión renal de Oatp1 en ratas con nefropatía obstructiva.....	68
4.5.2.1 Evaluación de la expresión renal de Oatp1 mediante la técnica de electroforesis y <i>Western blotting</i> .....	68
4.5.2.2 Evaluación de la expresión renal de Oatp1 mediante la técnica de inmunohistoquímica.....	69
<b>4.6 Análisis comparativo de la excreción urinaria de potenciales biomarcadores de lesión renal en ratas con nefropatía obstructiva.....</b>	<b>71</b>
 <b>5 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....</b>	 <b>75</b>
<b>5.1 Caracterización del modelo experimental de nefropatía obstructiva.....</b>	<b>76</b>
<b>5.2 Excreción urinaria y expresión renal del Transportador de aniones orgánicos 5 (Oat5) en ratas con nefropatía obstructiva.....</b>	<b>81</b>
<b>5.3 Excreción urinaria y expresión renal del Cotransportador Na<sup>+</sup>/Dicarboxilatos 1 (NaDC1) en ratas con nefropatía obstructiva.....</b>	<b>85</b>
<b>5.4 Excreción urinaria y expresión renal del Polipéptido transportador de aniones orgánicos 1 (Oatp1) en ratas con nefropatía obstructiva.....</b>	<b>89</b>
<b>5.5 Análisis comparativo de la excreción urinaria de potenciales biomarcadores de lesión renal en ratas con nefropatía obstructiva.....</b>	<b>91</b>
<b>5.6 Conclusiones finales.....</b>	<b>95</b>
 <b>6 BIBLIOGRAFÍA.....</b>	 <b>98</b>
 <b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	 <b>114</b>

## ABREVIATURAS

ANOVA: análisis de la variancia

Cys C: cistatina C

Cl<sub>Cr</sub>: *clearance* de creatinina

Cr: creatinina

EF: excreción fraccional

FOH: fosfatasa alcalina

HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanosulfónico

i.p.: intraperitoneal

kDa: kilodaltons

KIM-1: molécula de injuria renal 1

LRA: lesión renal aguda

NaDC<sub>s</sub>: cotransportadores Na<sup>+</sup>/dicarboxilatos

NaDC1: Cotransportador Na<sup>+</sup>/Dicarboxilatos 1

NGAL: lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos

Oat<sub>s</sub>: transportadores de aniones orgánicos

Oat5: Transportador de aniones orgánicos 5

Oatp<sub>s</sub>: polipéptidos transportadores de aniones orgánicos

Oatp1: Polipéptido transportador de aniones orgánicos 1

Osm: osmoles

OUB: obstrucción ureteral bilateral

p.c.: peso corporal

PBS: *buffer* fosfato salino

PBST: *buffer* fosfato salino con Tween 20

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo

Pr: peso renal

SDS: detergente dodecil sulfato sódico

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS

SE: error estándar

TBS: buffer tris salino

TBST: buffer tris salino con Tween 20

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

$U_f$ : flujo urinario

UI: unidades internacionales

VFG: velocidad de filtración glomerular

## RESUMEN

La modificación de la función renal por obstrucción del tracto urinario, es una condición conocida con el nombre de nefropatía obstructiva. La lesión renal obstructiva ocasiona alteraciones estructurales y funcionales que afectan principalmente a los segmentos tubulares de la nefrona. Si bien es una situación reversible, una interrupción prolongada del flujo de orina (más de 24 horas) puede provocar pérdida de nefronas, con reducción de la tasa de filtración glomerular y deterioro en el manejo tubular de agua y solutos. Además, cuando la obstrucción es bilateral y completa, el daño puede persistir incluso después de que se haya resuelto el problema. Por lo tanto, la detección temprana es extremadamente necesaria para asegurar una recuperación óptima de la función renal.

Los marcadores tradicionales utilizados en la práctica clínica para el reconocimiento de la enfermedad renal, son poco sensibles e inespecíficos. La creatinina plasmática, por ejemplo, es un indicador subóptimo dado que sólo considera la tasa de filtración glomerular y los cambios funcionales, sin tener en cuenta las situaciones subclínicas, en donde los riñones muestran indicios de daño a pesar de no presentar alteraciones manifiestas de su función. A consecuencia de esto, surge la necesidad de hallar nuevos biomarcadores que permitan entre otras cosas, mayor capacidad de diagnóstico, identificación precoz del riesgo y elevada eficacia predictiva respecto de la progresión de la enfermedad renal.

La mayoría de los biomarcadores recientemente descritos son péptidos y proteínas de membrana que presentan variaciones en cuanto a su distribución tisular, la función, y el momento de su liberación después de la lesión renal. En muchas ocasiones, la pérdida de integridad de los epitelios tubulares conduce al volcado de diferentes proteínas hacia el interior de la luz tubular, promoviendo su aparición en la orina. Esta situación y el hecho de ser moléculas en íntimo contacto con el sitio de la lesión, las convierte en excelentes biomarcadores de lesión renal, con el potencial de brindar diferente tipo de información.

Los transportadores de aniones orgánicos son proteínas integrales de membrana, capaces de mediar el transporte de una gran variedad de compuestos, entre ellos metabolitos endógenos, fármacos de importancia clínica y agentes xenobióticos. El Transportador de aniones orgánicos 5 (Oat5), el Cotransportador  $\text{Na}^+$ /Dicarboxilatos 1 (NaDC1) y el Polipéptido transportador de aniones orgánicos 1 (Oatp1), son algunos de los transportadores de aniones orgánicos más importantes localizados a nivel renal. Las tres proteínas se expresan en las membranas apicales de las células del túbulo proximal, y en consecuencia son susceptibles de aparecer en el fluido

tubular, en situaciones de daño renal obstructivo. Por lo tanto el objetivo general del presente trabajo de Tesis consistió en **analizar la excreción urinaria de Oat5, NaDC1 y Oatp1 en un modelo experimental de nefropatía obstructiva en ratas, para determinar su potencialidad como biomarcadores de lesión renal obstructiva.**

Para tal fin, se realizaron estudios en grupos experimentales de ratas a las cuales se les practicó una cirugía de obstrucción ureteral bilateral (OUB) completa, de diferente duración: 1, 2, 5 y 24 horas. Luego de liberar dicha obstrucción, los animales se mantuvieron durante 24 horas en jaulas metabólicas para la recolección de las muestras de orina.

En una primera instancia, se caracterizó el modelo experimental de nefropatía obstructiva. Se observó: aumento en los niveles plasmáticos de urea y creatinina; disminución del *clearance* renal de creatinina; y aumento de las concentraciones de la Lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL), glucosa y proteínas totales en la orina de los animales con 5 y 24 horas de obstrucción ureteral. Además, se observaron incrementos en el flujo urinario y en las excreciones fraccionales de agua y osmoles de estos dos grupos experimentales. En paralelo, los estudios en tejido renal revelaron aumentos del peso renal y un importante daño en el tejido a nivel del epitelio tubular, evidenciado mediante estudios histopatológicos.

Luego se analizó la excreción urinaria de los transportadores de aniones orgánicos Oat5, NaDC1 y Oatp1, y se los comparó con marcadores tradicionales de lesión renal, para evaluar su potencial como biomarcadores de esta patología. Se observó un aumento en la excreción urinaria de Oat5 en todos los grupos experimentales, incluso en aquellos con obstrucciones ureterales de corta duración (1 hora). La excreción urinaria de NaDC1 aumentó en todos los grupos experimentales, mostrando un patrón de incremento regular a medida que el tiempo de obstrucción se hizo más prolongado. El análisis de regresión permitió corroborar la correlación positiva entre las dos variables (NaDC1 urinaria y tiempo de obstrucción), con un alto grado de significancia. Respecto de la excreción urinaria de Oatp1, sólo se detectó banda reactiva en la orina de los animales OUB, incluso en aquellos con tiempos de obstrucción ureteral cortos (OUB1). Por otro lado, no se detectó señal alguna en la orina de los animales Sham.

Según nuestro conocimiento, este es el primer estudio que informa no sólo la detección de Oatp1 en muestras de orina, sino también el primero que analiza a los tres transportadores en el contexto de la enfermedad renal obstructiva. En contraste con los niveles plasmáticos de urea y creatinina, el *clearance* renal de creatinina, la excreción urinaria de NGAL y el resto de los parámetros de función renal analizados, los niveles urinarios de Oat5, NaDC1 y Oatp1 aumentaron significativamente en todos los grupos experimentales a los que se les practicó la cirugía de obstrucción de uréteres, incluso en aquellos con tiempos de obstrucción ureteral

cortos. Cuando el tiempo de obstrucción fue muy corto (OUB1), los únicos parámetros modificados fueron los niveles urinarios de Oat5, NaDC1 y Oatp1. Ni los indicadores clásicos de función renal, como la urea y la creatinina, ni otros biomarcadores descritos más recientemente, como la NGAL urinaria, se alteraron en respuesta al daño renal obstructivo. Por lo tanto, **las excreciones urinarias de Oat5, NaDC1 y Oatp1 podrían ser consideradas como biomarcadores diagnóstico tempranos, más sensibles que otros para predecir la lesión renal obstructiva. Además, el patrón de excreción mostrado por NaDC1 indicaría su potencialidad como biomarcador capaz de brindar información acerca del tiempo transcurrido desde el inicio del evento obstructivo.**

Por otro lado, la expresión renal de las tres proteínas se encontró modificada en respuesta a la obstrucción. En los homogenados totales de riñón, Oat5 disminuyó en todos los grupos experimentales analizados, mientras que NaDC1 disminuyó en OUB5 y OUB24. Por su parte, la expresión renal de Oatp1 no presentó alteraciones en los homogenados renales de los animales con OUB. Las modificaciones observadas a nivel del tejido renal podrían ser el resultado de alteraciones en los procesos de síntesis y/o degradación proteica ocasionados por la nefropatía obstructiva. Además, el hecho de que las tres proteínas respondan de manera distinta a la obstrucción revelaría mecanismos regulatorios diferentes para cada una de ellas, en función de la gravedad del cuadro. En las membranas apicales renales, lugar donde estas proteínas se expresan y son funcionales, Oat5 disminuyó en todos los grupos experimentales. Por su parte NaDC1 disminuyó en OUB5 y OUB24, en paralelo con el aumento en la excreción fraccional de citrato de estos grupos. El citrato es un sustrato endógeno de NaDC1 de relevancia fisiológica, debido a su rol como inhibidor de la formación de cálculos renales. Por otro lado, la expresión de Oatp1 en membranas aumentó sólo en OUB24. Las modificaciones observadas en la expresión renal de proteínas transportadoras de membrana son un hecho de relevancia clínica debido a que implican consecuencias directas sobre el manejo renal de fármacos y metabolitos endógenos transportados por estas proteínas. Tales cuestiones deberían ser tenidas en cuenta, por ejemplo, a la hora de diseñar regímenes de dosificación y planes terapéuticos, para evitar futuras complicaciones.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis aportan nueva información acerca de las modificaciones inducidas por la nefropatía obstructiva en la expresión renal y en la excreción urinaria de diferentes proteínas transportadoras de aniones orgánicos. Estos conocimientos son de relevancia clínica debido al rol que cumplen estas proteínas en la función renal, y además, debido a su potencialidad como novedosas herramientas no invasivas para el diagnóstico temprano de la enfermedad renal obstructiva.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Lesión renal aguda**

El sistema urinario en los mamíferos está formado por dos riñones, dos uréteres, la vejiga urinaria y la uretra. La orina que se forma en los riñones es excretada pasando por los uréteres, almacenada en la vejiga y expulsada finalmente del cuerpo a través de la uretra. Para que este proceso se desarrolle con éxito, es necesario que los órganos mantengan su integridad estructural y funcional, que el aporte sanguíneo sea adecuado, y que las áreas de almacenamiento y las vías de paso estén despejadas. Una alteración en cualquiera de estos factores ocasionará lo que actualmente se conoce con el término de **lesión renal aguda (LRA)**.

Desde un punto de vista fisiopatológico y dependiendo de cuál sea su origen, la LRA puede definirse como prerrenal, renal/parenquimatosa o postrenal/obstrucciona (Farrar A, 2018; Radi ZA, 2018):

- En la lesión **prerrenal** existe una inadecuada perfusión renal que compromete la filtración glomerular. Es una respuesta fisiológica a la hipoperfusión renal pero con el mantenimiento de la integridad del parénquima renal.
- La lesión **renal/parenquimatosa** está asociada a un daño tisular directo en las estructuras anatómicas: glomérulos, túbulos, intersticios o vasos renales.
- La lesión **postrenal/obstrucciona** se produce cuando existe un obstáculo en las vías urinarias que impide la salida de la orina formada, provocando un aumento de la presión que se transmite retrógradamente y que compromete el filtrado glomerular.

La LRA es una condición ampliamente diseminada, sobre todo en los pacientes hospitalarios (incidencia del 5-7%), y es un factor de riesgo que aumenta la morbilidad y mortalidad a corto y largo plazo, con un tremendo impacto económico en términos de costos de salud. Particularmente, en las unidades de cuidados intensivos la incidencia es mucho más elevada, alrededor del 25%, con tasas de mortalidad entre el 50 y el 80% (Seller-Pérez G *et al.*, 2016; Søvik S *et al.*, 2019).

## 1.2 Lesión postrenal u obstructiva

La LRA postrenal se conoce comúnmente con el nombre de **nefropatía obstructiva**. El término nefropatía obstructiva se define como el conjunto de alteraciones morfológicas y funcionales debidas a la obstrucción parcial o completa de las vías urinarias. La expresión uropatía obstructiva se reserva para referirse a la presencia de un impedimento a la salida del flujo urinario, en un punto localizado entre la pelvis renal y el extremo distal de la uretra. Por otro lado, la hidronefrosis es la condición anatómica caracterizada por la dilatación del sistema colector, los cálices y la pelvis renal. La misma puede cursar o no con un proceso obstructivo por lo tanto, es importante destacar que hidronefrosis no es sinónimo de obstrucción (Klahr S, 2000).

Las obstrucciones del tracto urinario se clasifican según el grado, la duración y el sitio de la obstrucción:

- El grado de la obstrucción puede ser **alto** (obstrucción total o completa), o **bajo** (obstrucción parcial o incompleta).
- La obstrucción puede ser de **corta** (hasta 24 h), o **larga** (1 a 3 semanas, o más) duración.
- La localización de la obstrucción puede ocurrir en el tracto urinario superior (por encima de la unión ureterovesical) o en el tracto urinario inferior (por debajo de la unión ureterovesical).

Las causas de obstrucción en el **tracto urinario superior** pueden ser de origen intrínseco o extrínseco. A *nivel intrínseco*, los desórdenes pueden ser de tipo intraluminal (cálculos renales) o intramural. Estos últimos incluyen lesiones anatómicas (menos frecuentes) como estrangulaciones de uréteres, tumores, válvulas ureterales y pólipos, o desórdenes funcionales (reflujo vesicoureteral, segmentos ureterales adinámicos). A *nivel extrínseco*, los orígenes más comunes se localizan en el sistema reproductor, el sistema vascular, el tracto gastrointestinal o el espacio retroperitoneal. Por otro lado, en el **tracto urinario inferior**, las causas de obstrucción incluyen lesiones de la uretra, la próstata y la vejiga (Klahr S, 2000) (**Figura 1.1**).

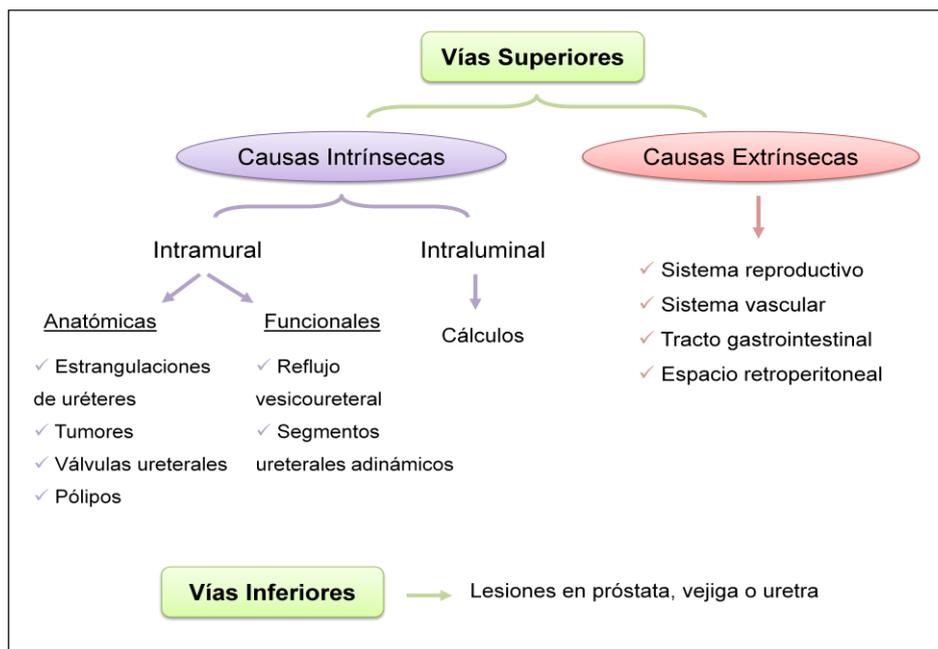


Figura 1.1: Localización de la obstrucción y causas potenciales.

### 1.2.1 Incidencia y prevalencia de la nefropatía obstructiva

La nefropatía obstructiva presenta una incidencia bimodal, afectando tanto a pacientes jóvenes como a adultos mayores. Las anomalías anatómicas son más frecuentes en los niños (obstrucción de la unión ureteropélvica (UPJO), válvulas uretrales posteriores, atresia o estenosis uretral y vejiga neuropática), mientras que en los adultos prevalecen las anomalías de origen adquirido. Entre los 20 y 60 años, la nefropatía obstructiva se observa más frecuentemente en las mujeres, debido fundamentalmente, a embarazo y cáncer uterino. En pacientes mayores de 60 años la tendencia se invierte, siendo más común en los hombres que en las mujeres, debido a hiperplasia benigna de próstata y carcinoma de próstata (Meola M *et al.*, 2016).

### 1.2.2 Fisiopatología de la nefropatía obstructiva

En líneas generales, las disfunciones renales cursan con alteraciones tanto a nivel local como sistémico. El riesgo de mortalidad en pacientes hospitalizados por disfunción renal es cercano al 50-80% y mucho de este riesgo se debe principalmente a complicaciones en órganos distantes al riñón. Los mecanismos involucrados en el desarrollo de las complicaciones extra-renales no se conocen completamente y la mayoría de las investigaciones al respecto han sido realizadas en modelos animales de isquemia renal y nefrectomía unilateral o bilateral (Grams ME y Rabb H, 2012; Yap SC y Lee HT, 2012; Druml W, 2014).

En el caso particular de las nefropatías obstructivas, los defectos fisiopatológicos más conocidos son aquellos que afectan la integridad del riñón y su función (Ucero AC *et al.*, 2010; Truong LD *et al.*, 2011; Mourmouris PI *et al.*, 2014). Los efectos sistémicos de estas patologías han sido menos estudiados.

### **1.2.2.1 Manifestaciones renales de la nefropatía obstructiva**

Por muchos años las obstrucciones del tracto urinario fueron consideradas meramente como un problema físico. Sin embargo, actualmente se sabe que los efectos de la obstrucción sobre el riñón son el resultado de una variedad de factores que interaccionan de manera compleja, y que resultan en alteraciones tanto de la hemodinamia glomerular como de la función tubular (Ucero AC *et al.*, 2010; Truong LD *et al.*, 2011; Mourmouris PI *et al.*, 2014). En una primera fase (aguda, 1-2 horas) la respuesta inmediata a la obstrucción es un breve periodo (minutos) de hiperemia y un incremento en el flujo sanguíneo renal. El aumento de la presión en el sitio próximo a la obstrucción dilata los sistemas colectores y esta presión se transmite hacia los túbulos distal y proximal. El aumento de la presión en el túbulo proximal conduce a una disminución del gradiente de presión hidráulica neta, lo que reduce el flujo sanguíneo renal y la tasa de filtración glomerular. En una segunda fase (intermedia, 2-5 horas), el aumento de la presión intratubular induce vasoconstricción renal secundaria, a través de fenómenos humorales, neuronales y reflejos (aumento de agentes vasoconstrictores como angiotensina II, tromboxano A<sub>2</sub> y prostaciclina, y disminución de vasodilatadores: óxido nítrico, prostaglandinas, endotelinas, entre otros). El flujo sanguíneo renal continúa disminuyendo, lo cual puede causar un cuadro de isquemia renal y esta disminución de la perfusión renal, reduce aún más la tasa de filtración glomerular. En una tercera fase (tardía, 24 horas) la presión dentro del túbulo proximal aumenta notoriamente y el flujo sanguíneo renal continúa en descenso hasta alcanzar valores de entre un 30-50% respecto de los observados antes de la obstrucción (Truong LD *et al.*, 2011).

El deterioro renal iniciado por el aumento de la presión intratubular y la isquemia asociada, se magnifica aún más por el desarrollo secundario de inflamación tubulointersticial, muerte celular y fibrosis. La activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona contribuye a la respuesta inflamatoria intersticial: infiltración mononuclear, principalmente macrófagos y linfocitos T (Qin T *et al.*, 2016; Braga TT *et al.*, 2018). La expresión local de citoquinas, quimoquinas y la expresión de moléculas de adhesión en la membrana de las células parenquimatosas y endoteliales lesionadas reclutan leucocitos en el sitio de la lesión y estas células, a su vez, amplifican la inflamación. El estiramiento mecánico de las células tubulares provoca la

liberación de mediadores inflamatorios, letales y profibróticos, lo que conduce al atrofiamiento y eventual apoptosis de las células tubulares renales (Jang HS y Padanilam BJ, 2015; Nilsson L *et al.*, 2015) y al desarrollo de fibrosis intersticial. La fibrosis se caracteriza por un mayor número de fibroblastos activados y la acumulación difusa de componentes extracelulares de membrana tales como colágeno tipo I, III y IV, proteoglicanos y fibronectina (Samarakoon R *et al.*, 2012; Li A *et al.*, 2017; Xi W *et al.*, 2018).

Luego de una obstrucción ureteral es común que la función tubular presente anormalidades. Ocurre una disminución en la capacidad de concentrar la orina y de reabsorber sodio y otros solutos como fósforo, magnesio y calcio. También se encuentran alteradas la secreción de potasio y la capacidad de acidificar la orina. En conjunto, estas alteraciones se conocen con el nombre de síndrome de “**diuresis postobstructiva**” (Nørregaard R *et al.*, 2007; Quinlan MR *et al.*, 2010; Danilovic A *et al.*, 2012). Las excreciones fraccionales de sodio y agua aumentan más de cinco veces en comparación a los valores controles. Junto con la reducción de las acuaporinas a lo largo de toda la nefrona y la resistencia tubular a los efectos de la hormona antidiurética, los trastornos en la reabsorción de agua también contribuyen a la incapacidad de concentrar la orina. La expansión de volumen del fluido extracelular, la diuresis osmótica de urea y la circulación de factores natriuréticos, también contribuyen a la diuresis postobstructiva (Kim SW *et al.*, 2001; Zhang Y *et al.*, 2010; Stødkilde L *et al.*, 2011).

### **1.2.2.2 Manifestaciones extrarenales de la nefropatía obstructiva**

Las consecuencias sistémicas de la nefropatía obstructiva han sido menos estudiadas. La mayoría de los trabajos se centran en los efectos de las obstrucciones de uréteres sobre el hígado y sus implicancias en el metabolismo hepático de fármacos. Okabe H *et al.* (2004) estudiaron la absorción intestinal y la excreción hepática de fármacos  $\beta$ -bloqueantes adrenérgicos en ratas con obstrucción bilateral de uréteres. La tasa de absorción intestinal de fármacos como propranolol y metoprolol no se modificó en estos animales. Sin embargo, la biodisponibilidad aumentó debido a una disminución en el metabolismo de primer paso hepático. La actividad de la enzima responsable del metabolismo de estos fármacos, el CYP2D2, no presentó alteraciones en el hígado de las ratas con nefropatía obstructiva. El hallazgo de que la tasa de generación de NADPH en la fracción citosólica del hígado de las ratas con obstrucción de uréteres fuera menor que la de las ratas control les permitió a estos autores concluir que la disminución en la actividad metabólica hepática y en la excreción de propranolol y metoprolol en estas ratas sería al menos en parte, el resultado de la menor síntesis de NADPH en el hígado (Okabe H *et al.*, 2004).

Otros autores han continuado estas investigaciones y han ahondado en los mecanismos responsables de la disminución del metabolismo hepático de fármacos en situaciones de obstrucciones de uréteres (Higashi T *et al.*, 2005; Taguchi M *et al.*, 2006), pero los alcances siguen siendo aún limitados.

### **1.3 Modelos experimentales de nefropatía obstructiva**

Se han desarrollado varios modelos animales de obstrucción del tracto urinario, en diversas especies como conejos, perros, ovejas, cerdos, ratones y ratas (Eskild-Jensen A *et al.*, 2007; Klein J *et al.*, 2011; Springer A *et al.*, 2012; Li WQ *et al.*, 2014; Narváez Barros A *et al.*, 2019). En líneas generales, se pueden diferenciar tres tipos de sistemas experimentales en uso actualmente para el estudio de la nefropatía obstructiva: los modelos genéticos, los modelos de nefrolitiasis inducida y los modelos quirúrgicos.

Los modelos genéticos han sido empleados habitualmente para el estudio de las nefropatías obstructivas de tipo congénitas, en fetos en desarrollo. Se han identificado modelos genéticos espontáneos con obstrucción ureteral unilateral congénita, pero la infertilidad o la baja tasa de reproducción de estas cepas limita su uso (Seseke F *et al.*, 2004; Hermens JS *et al.*, 2007). Por su parte, la tecnología de eliminación génica, o de “genes *knock-out*”, ha permitido estudiar el rol específico de determinadas moléculas, en el desarrollo del daño renal (Yokoyama H *et al.*, 2002; Inazaki K *et al.*, 2004; Matsuyama M *et al.*, 2014; Smith SW *et al.*, 2015). Se han descrito ratones hidronefróticos con obstrucción urinaria congénita en cepas de ratones carentes de genes específicos, como el receptor de angiotensina, Agtr2 (Pope JC *et al.*, 2001). Sin embargo, a pesar de su novedad, los modelos genéticos presentan importantes limitaciones debidas sobre todo a que la reproducibilidad es deficiente y a que el número de individuos afectados resulta escaso. En el caso de los ratones transgénicos, la incidencia es limitada (2-3%), aumentando a 20% con endogamia adicional. Además, no ha habido una demostración definitiva de que estos animales presenten obstrucción en un sentido hidrodinámico, y se plantea si la aparición de la hidronefrosis se debe a una obstrucción hidrostática o al desarrollo renal anormal que provoca la aparición de hidronefrosis debido a la ausencia de estructuras renales normales (Pope JC *et al.*, 2001).

Dentro de los modelos de nefrolitiasis inducida se encuentran algunas variantes como la utilización de agentes inductores de formaciones cristalinas dentro del riñón, entre ellos etilenglicol, oxalato de amonio, o la implementación de dietas enriquecidas en determinados componentes como calcio, fósforo o vitamina D. Estos modelos han permitido estudiar, entre

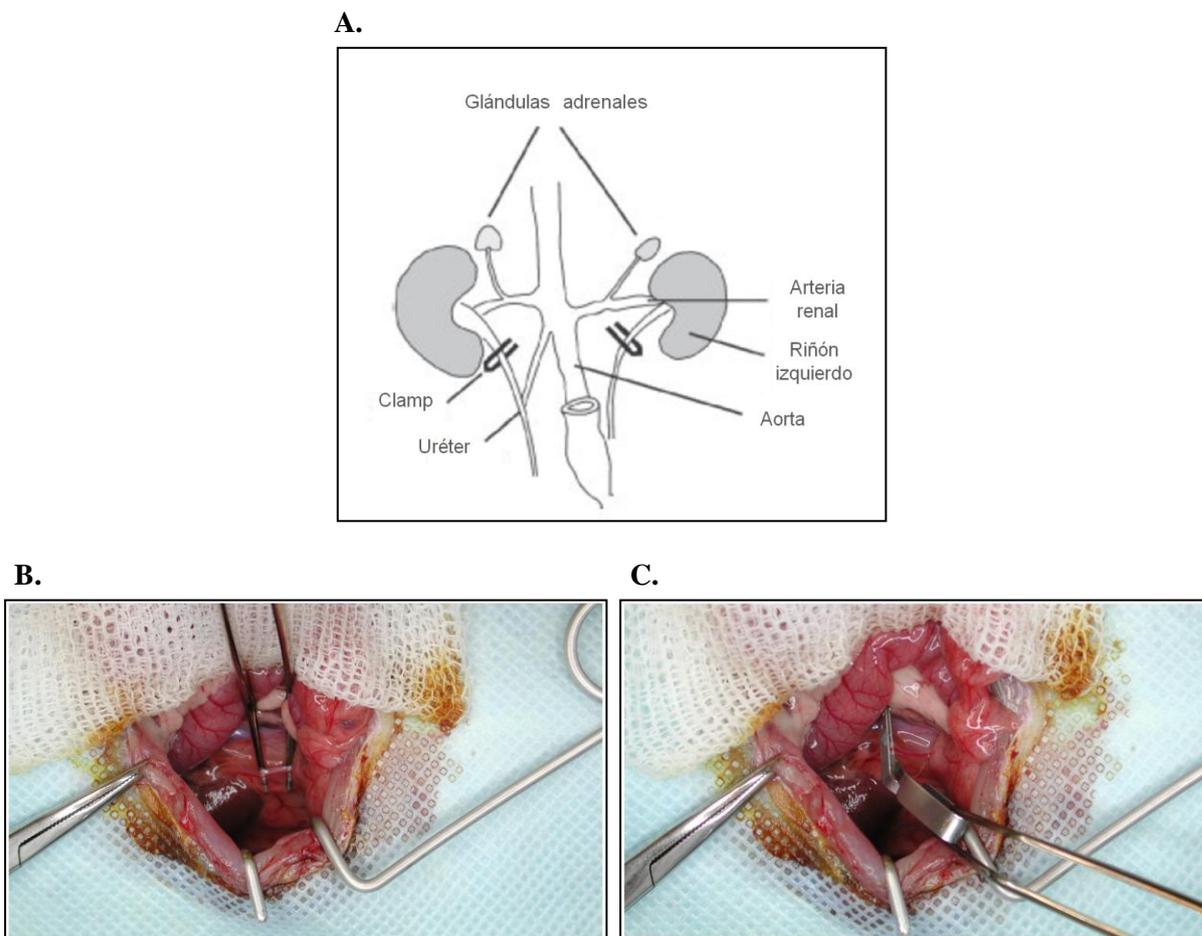
otras cosas, la composición química de los cálculos renales y la fisiopatología de su formación (Yachantha C *et al.*, 2009; Zhang X *et al.*, 2009; Zhu W *et al.*, 2014; Sharma M *et al.*, 2015).

También existen modelos basados en la inyección de esferas de alginato gulurónico, un medio aparentemente eficaz para crear una obstrucción fisiológica de alto grado, sin evidencia de toxicidad (Tarantal AF *et al.*, 2001).

Como contrapartida, los modelos quirúrgicos de obstrucción urinaria son los más utilizados en la actualidad debido a que producen de manera confiable la condición patológica, en un momento y en un grado específico. Ofrecen varias ventajas: son técnicamente fáciles de inducir, generan un patrón de lesiones renales relativamente constantes y uniformes entre los distintos animales tratados, y permiten controlar de manera precisa el tiempo y la gravedad de las lesiones renales que se inducen. Además, ofrecen la posibilidad de eliminar la causa de la obstrucción a intervalos variables, según los requerimientos del estudio, y por lo tanto, son prácticamente los únicos modelos pertinentes para el estudio de la reversibilidad de la enfermedad renal obstructiva. Dependiendo de cuál sea el objetivo del estudio, se pueden encontrar variantes de obstrucción ureteral parcial o completa, unilateral (OUU) o bilateral (OUB). El modelo de obstrucción completa OUB conduce a una obstrucción aguda y completa de los uréteres que, si bien rara vez se encuentra en humanos, tiene la ventaja de que imita, de manera acelerada y extrema, las diferentes etapas de la nefropatía obstructiva. Particularmente, la infiltración de células del sistema inmune, la atrofia celular y posterior apoptosis, y la fibrosis tubulointersticial, aparecen rápidamente después de la inducción de una OUB completa y además, los resultados son altamente reproducibles de un experimento a otro (Truong LD *et al.*, 2011).

En este trabajo de Tesis se empleó el **modelo de obstrucción ureteral bilateral** que había sido puesto a punto previamente en nuestro laboratorio (Villar SR *et al.*, 2004, 2005, 2008; Di Giusto G y Torres AM, 2009). Este modelo consiste en la obstrucción completa de ambos uréteres mediante el uso de *clamps* vasculares (**Figura 1.2A**). Brevemente, se realiza una incisión a cada lado de la cavidad abdominal del animal y se exponen los uréteres, como se muestra en la **Figura 1.2B**. Posteriormente se procede a ligar cada uno de los uréteres con un *clamp* vascular, accesorio quirúrgico diseñado para obstruir los conductos sin generar lesiones en los tejidos (**Figura 1.2C**). Por último, se procede a cerrar la cavidad abdominal mediante sutura doble, y los animales son mantenidos vivos, con acceso a agua y alimentos, durante el tiempo que corresponda según el diseño experimental. Se considera que la ligadura es exitosa cuando el diámetro ureteral supera los 2 mm y ocurre hidronefrosis evidente (ver ítem 3.2 de Materiales y Métodos). Transcurrido el periodo obstructivo, se realiza una nueva cirugía para retirar los

*clamps* y restablecer el flujo de orina. Los animales son mantenidos en jaula metabólica durante 24 horas para obtener las muestras de orina libre de heces y contaminantes.



**Figura 1.2:** (A) Ilustración del modelo de nefropatía obstructiva. (B) Exposición del uréter. (C) Aplicación del *clamp* vascular. Imágenes extraídas de Di Giusto G y Torres AM (2009).

## 1.4 Biomarcadores de lesión renal

### 1.4.1 Definición de biomarcador y clasificación

En el año 2001, el *National Institutes of Health* (NIH) estableció la definición de biomarcador como aquellas características biológicas, bioquímicas, antropométricas, fisiológicas, etc., objetivamente mensurables, capaces de identificar procesos fisiológicos o patológicos, o bien una respuesta farmacológica a una intervención terapéutica (Robb MA *et al.*, 2016; Califf RM, 2018). Por su parte, la *Food and Drug Administration* (FDA) definió el término biomarcador como cualquier indicador diagnóstico que pueda ser medido y utilizado para la evaluación de cualquier riesgo o enfermedad (Robb MA *et al.*, 2016; Califf RM, 2018). Estas definiciones

generales incluyen características moleculares, histológicas, radiográficas o fisiológicas medibles, como respuesta a procesos fisiológicos, patológicos o intervenciones terapéuticas.

En líneas generales, un biomarcador ideal debe cumplir con ciertos requisitos (Devarajan P y Murray P, 2014; Beker BM *et al.*, 2018):

- ✓ Ser fácilmente obtenible, preferentemente en forma no invasiva (generalmente en muestras de sangre o de orina).
- ✓ Ser medible rápida y certeramente.
- ✓ Ser estable *in vivo* e *in vitro*.
- ✓ Ser altamente sensible, específico y predictivo del daño.
- ✓ Debe tener la suficiente relevancia preclínica y clínica como para modificar las decisiones relativas al proceso patológico en que se aplica.
- ✓ Debe ser económico en cuanto a su forma de detección.

De acuerdo con sus aplicaciones, se han definido varias clases de biomarcadores y si bien un sólo biomarcador puede aplicar a más de una categoría, es importante destacar que para cada uso particular se debe contar con evidencia clínica de respaldo. Por lo tanto, aunque las definiciones pueden superponerse, las categorías tienen características distintivas claras que especifican usos particulares.

A continuación se detalla una clasificación de biomarcadores que compete al ámbito clínico (Califf RM, 2018):

***Biomarcadores de diagnóstico:*** tienen la capacidad de detectar o confirmar la presencia de una enfermedad, y además, de identificar a los individuos con un subtipo particular de dicha enfermedad. Por lo tanto, son especialmente útiles cuando se pretende redefinir la clasificación de una patología determinada. En general, estos biomarcadores dan indicios acerca de la presencia de daño en un tejido, o informan acerca de la pérdida de función de un órgano en particular. La utilidad clínica de este tipo de biomarcadores reside en cuán precoz puede llegar a ser su detección, razón por la cual en muchas ocasiones suelen denominarse como “***biomarcadores tempranos***” a aquellos que detectan las lesiones más precozmente respecto de otros marcadores de uso tradicional.

***Biomarcadores de monitorización:*** evalúan el estado de una enfermedad o una condición médica particular a través de mediciones en serie. Los biomarcadores de monitorización tienen

importantes aplicaciones en la atención clínica; sin embargo, la determinación de qué cambios en el biomarcador deberían indicar un cambio particular en el curso clínico y la toma de decisiones (por ejemplo, más pruebas o intervenciones) es compleja y, generalmente, poco precisa. Los biomarcadores de monitoreo también se utilizan frecuentemente para medir efectos farmacodinámicos, detectar evidencia temprana de respuesta terapéutica, o para detectar complicaciones de una enfermedad o terapia.

***Biomarcadores predictivos:*** identifican a aquellos individuos o grupos de individuos que experimentarán una respuesta favorable a un medicamento, o un efecto desfavorable por la exposición a un agente ambiental, en función de la presencia o cambio en dicho biomarcador. Las diferencias de resultados muestran una correlación significativa con la presencia, ausencia o nivel del biomarcador en el individuo, medido previo a la intervención.

***Biomarcadores de pronóstico:*** se utilizan para identificar la probabilidad, la recurrencia o la progresión de una enfermedad en un paciente con una condición médica particular. Los biomarcadores de pronóstico se asocian con resultados diferenciales de una enfermedad y deben diferenciarse de los biomarcadores predictivos, los cuales brindan información acerca del efecto de una intervención o exposición. Por otro lado, también se diferencian de los biomarcadores de susceptibilidad/riesgo, dado que estos últimos se relacionan más con la transición de un estado de salud a uno de enfermedad.

En los ensayos clínicos, los biomarcadores pronósticos se utilizan de forma rutinaria para establecer criterios de inclusión y exclusión para identificar poblaciones de riesgo. Además, los biomarcadores pronósticos son especialmente importantes para predecir el riesgo de un evento o un mal resultado en un individuo. Esta información es clave por ejemplo, para la toma de decisiones sobre la duración de la estadía hospitalaria y/o en las unidades de cuidados intensivos, para distinguir qué pacientes podrían beneficiarse con una evaluación más intensiva y para evitar en otros, pruebas diagnósticas e intervenciones innecesarias.

***Biomarcadores de susceptibilidad o riesgo:*** estos biomarcadores identifican a aquellos individuos con el potencial de desarrollar una enfermedad o condición médica particular, cuando aún no manifiestan signos o síntomas clínicamente evidentes. El concepto es similar al de los biomarcadores pronósticos, sin embargo el punto clave es la asociación del biomarcador con el desarrollo de la enfermedad, en lugar del pronóstico de la misma, cuando ya se tiene un diagnóstico.

### 1.4.2 La orina como fuente de biomarcadores

En comparación con otros fluidos corporales, la orina tiene varias características que la convierten en una opción preferida para el descubrimiento de biomarcadores de lesión renal. En primer lugar, la recolección es muy simple; puede obtenerse de forma no invasiva en grandes cantidades y almacenarse fácilmente para su procesamiento. En segundo lugar, se trata de un fluido que se encuentra en íntimo contacto con los diferentes tejidos urológicos al momento de la lesión. Por ello, muchas de las proteínas secretadas suelen acumularse en la orina luego de producida la lesión renal. Además, se sabe que el proteoma urinario cambia con el estado patológico, por lo cual este fluido es considerado como uno de los más atractivos para el descubrimiento de biomarcadores de las enfermedades renales. En tercer lugar, los péptidos urinarios y las proteínas de menor peso molecular son generalmente solubles. Por lo tanto, el proceso de solubilización, etapa de gran influencia en los análisis proteómicos de células o tejidos, se ve ampliamente facilitado. Por último, la orina puede almacenarse durante varios meses a  $-20^{\circ}\text{C}$  o durante varios años a  $-80^{\circ}\text{C}$  sin que, en muchos casos, cambie significativamente el proteoma urinario (Decramer S *et al.*, 2008; Rodríguez-Suárez E *et al.*, 2014; Mischak H, 2015).

A pesar de todas estas ventajas, la orina como fuente biológica de biomarcadores presenta algunas limitaciones que deben ser tenidas en cuenta. Por un lado, las concentraciones de proteínas y péptidos urinarios pueden variar principalmente debido a las diferencias en la ingesta diaria de líquidos. Al respecto, esta dificultad se puede contrarrestar mediante la estandarización basada en la creatinina o en el flujo urinario. Además, la definición de biomarcadores en la orina, y muy probablemente en otros fluidos biológicos, se complica por cambios significativos en el proteoma durante el día. Es probable que estos cambios sean causados por variaciones en la dieta, procesos metabólicos o catabólicos, ritmos circadianos y ejercicio, así como niveles circulatorios de diversas hormonas. Sin embargo, estas variaciones aparecen principalmente limitadas a una fracción del proteoma urinario, y una gran parte no se ve afectada por estos procesos. Finalmente, los biomarcadores urinarios suelen tener una baja estabilidad, por lo cual la orina debe ser recolectada y almacenada de manera apropiada, en tubos estériles y a bajas temperaturas, para una correcta preservación (Decramer S *et al.*, 2008; Rodríguez-Suárez E *et al.*, 2014; Mischak H, 2015).

### 1.4.3 Biomarcadores convencionales de lesión renal aguda

En la actualidad, tanto el diagnóstico como el monitoreo de la LRA, se basan en la evaluación de diversos marcadores de daño renal, como por ejemplo los niveles plasmáticos de creatinina, la estimación de la velocidad de filtración glomerular (VFG) (a través del *clearance* renal de creatinina), la diuresis, los niveles plasmáticos de urea, etc. A continuación, se analizan cada uno de ellos individualmente.

#### *Creatinina y clearance renal de creatinina*

La creatinina es un metabolito de desecho proveniente del metabolismo de la creatina muscular, producido y eliminado de forma constante a través de los riñones. Es considerada particularmente como un estimador de la VFG, ya que se filtra libremente a nivel glomerular y posee escaso manejo tubular. Conociendo las concentraciones de creatinina en plasma ( $Cr_p$ ) y en orina ( $Cr_o$ ), y el flujo urinario ( $U_f$ ), se puede calcular el *clearance* renal de creatinina ( $Cl_{Cr} = (Cr_o \cdot U_f) / Cr_p$ ) y así estimar la VFG. Sin embargo, su uso como indicador de la función renal está sujeto a limitaciones: primero, se requiere de una disminución de al menos un 50% de la VFG para que se detecte un incremento en la concentración plasmática de creatinina. Segundo, la caída de la VFG se acompaña de un aumento de la secreción tubular proximal de creatinina, que inicialmente logra mantener los valores plasmáticos de creatinina sin modificaciones. En condiciones normales, la actividad secretora representa un 5-20% de la excreción total, y podría elevarse hasta un 50%, como mecanismo compensatorio cuando la tasa de filtración glomerular disminuye, por lo cual el *clearance* renal de creatinina en estos casos sobreestimaría la VFG. Tercero, los niveles plasmáticos de creatinina no dependen únicamente del filtrado glomerular, sino también de otras variables, como la edad, el sexo, la masa corporal y el metabolismo muscular, la función hepática, así como también del estado de nutrición y de hidratación del paciente. Además, en la fase aguda de la enfermedad, la creatinina en plasma no es representativa de la función renal hasta que no se ha alcanzado un estado de equilibrio, el cual puede diferirse en el tiempo, a veces hasta 48 horas, especialmente en los pacientes internados en cuidados intensivos (Devarajan P y Murray P, 2014; Murray PT *et al.*, 2014).

Por lo tanto, los niveles plasmáticos de creatinina, y el *clearance* renal de creatinina, no deben ser empleados de forma aislada para valorar la función renal, dado que presentan baja sensibilidad y especificidad, sobre todo para distinguir entre lesiones de tipo postrenales, de aquellas de origen prerenal o intrínseco.

## ***Urea***

La urea es una sustancia producida por el hígado, que resulta de la digestión de las proteínas y es excretada por la orina. Su uso como marcador de la función renal está ampliamente difundido, sin embargo, existen muchos factores que pueden afectar su concentración plasmática. Esta sustancia no se genera a una velocidad constante y sus valores plasmáticos pueden aumentar en ciertas condiciones, aún en presencia de una función renal normal, como el tratamiento con corticoides, la hemorragia digestiva y la dieta hiperproteica. En cambio, otros factores como una dieta baja en proteínas o la enfermedad hepática avanzada, pueden producir la disminución de los niveles plasmáticos de urea, sin afectación de la función renal (Bonventre JV *et al.*, 2010; Peres LA *et al.*, 2013).

## ***Diuresis***

El flujo urinario es un parámetro comúnmente indicativo no sólo de la función renal sino también del estado hemodinámico del paciente. En el caso de la LRA, no tiene gran valor diagnóstico, dado que las distintas formas clínicas de la patología renal pueden cursar con diferentes variaciones de la diuresis. Además, la oliguria, por ejemplo, podría producirse como consecuencia de una lesión renal, pero también podría reflejar una respuesta fisiológica adaptativa tanto a la deshidratación intracelular como a la hipovolemia. Por otro lado, muchas intervenciones realizadas en unidad de cuidados intensivos (administración de diuréticos, resucitación con fluidos, administración de dopamina) afectan a la diuresis sin modificar necesariamente la función renal (Prowle JR *et al.*, 2011).

## ***Otros parámetros en orina***

La osmolaridad, los niveles urinarios de glucosa y proteínas, la excreción fraccional de sodio, o la actividad de fosfatasa alcalina en orina, se utilizan a menudo para evaluar la integridad y la capacidad funcional de los túbulos renales. La regulación de la osmolaridad urinaria y la recuperación de metabolitos de importancia fisiológica, como glucosa y proteínas, requieren de la integridad de los mecanismos de reabsorción en los distintos segmentos tubulares de la nefrona. La expresión de los transportadores responsables de la reabsorción tubular puede encontrarse alterada como consecuencia de la disfunción renal, ocasionando un aumento en la excreción urinaria de sus metabolitos sustrato. Además, la pérdida de integridad estructural del

tejido renal ocasiona que muchas proteínas integrales de membrana, como la fosfatasa alcalina, aparezcan en la orina como consecuencia de la lesión (Prowle J *et al.*, 2012; Ralib AM *et al.*, 2014).

En el año 2002, la *Acute Dialysis Quality Initiative* (ADQI) propuso un sistema de clasificación, denominado RIFLE, que permite diagnosticar y agrupar a los pacientes con LRA según la gravedad de la disfunción. RIFLE es el acrónimo de las palabras inglesas correspondientes a riesgo (*risk*), daño (*injury*), fallo (*failure*), pérdida prolongada de función renal (*loss*) y fallo final e irreversible de ésta (*end*). Por tanto, incluye tres etapas de disfunción renal progresiva y gravedad creciente (*risk-injury-failure*) y dos etapas de resultados (*loss-end*) (Bellomo R *et al.*, 2012). Los parámetros que utiliza para asignar a los pacientes a una categoría particular son: descensos porcentuales de la VFG, elevaciones relativas de la creatinina plasmática con respecto a un valor basal y el descenso en valor absoluto de la diuresis (**Tabla 1.1**).

En el año 2005, el grupo internacional multidisciplinar *Acute Kidney Injury Network* (AKIN), conformado por la ADQI y la *European Society of Intensive Care Medicine*, propuso ampliar el sistema RIFLE contemplando un incremento absoluto en la creatinina plasmática  $\geq 0,3$  mg/dL en un periodo de 48 horas aún cuando éste no represente un aumento del 50% sobre su valor basal en un intervalo de 7 días (Bellomo R *et al.*, 2012). Otra modificación fue incluir en la categoría “fallo” a todos los pacientes que estén recibiendo tratamiento renal sustitutivo independientemente de los valores plasmáticos de creatinina o de la diuresis. Además, en lugar de utilizar las letras de un acrónimo, emplean un sistema de estadios funcionales identificados por números (Bellomo R *et al.*, 2012) (**Tabla 1.1**).

**Tabla 1.1:** Criterios RIFLE para la clasificación funcional de la lesión renal aguda. RIFLE: *risk, injury, failure, loss, end stage*; AKIN: *acute kidney injury network*; Cr<sub>p</sub>: creatinina plasmática; VFG: velocidad de filtración glomerular. Adaptado de Bellomo R *et al.* (2012).

Estadios RIFLE / AKIN	Creatinina plasmática (Cr <sub>p</sub> )	Diuresis	Descenso VFG
<b>RISK / Estadio I</b>	↑ Cr <sub>p</sub> ≥ 0,3 mg/dL durante 48 horas ó ↑ Cr <sub>p</sub> ≥ 1,5 mg/dL sobre el basal durante 7 días	< 0,5 mL/Kg/h durante > 6 h	> 50%
<b>INJURY / Estadio II</b>	↑ Cr <sub>p</sub> ≥ 2 mg/dL sobre el basal	< 0,5 mL/Kg/h durante > 12 h	> 50%
<b>FAILURE / Estadio III</b>	↑ Cr <sub>p</sub> ≥ 3 mg/dL sobre el basal ó ↑ Cr <sub>p</sub> ≥ 4 mg/dL con aumento agudo ≥ 0,5 mg/dL, ó inicio de tratamiento renal sustitutivo	< 0,3 mL/Kg/h durante 24 h ó anuria por 12 h	> 75%
<b>LOSS</b>	Fallo renal persistente > 4 semanas		
<b>END STAGE</b>	Fallo renal persistente > 3 meses		

Hasta la fecha, la utilización de este sistema ha permitido el diagnóstico de la LRA y el establecimiento de un sistema de clasificación funcional para la identificación de distintos niveles de gravedad entre los pacientes. Sin embargo, aún cuando las nuevas definiciones y la propuesta de los criterios RIFLE suponen avances en el diagnóstico y la prognosis de la LRA, lo detallado anteriormente demuestra que las variables que se utilizan para definir y clasificar la enfermedad renal aguda siguen estando sujetas a serias limitaciones (Devarajan P y Murray P, 2014; Murray PT *et al.*, 2014). Los nuevos biomarcadores de LRA prometen mayor capacidad de diagnóstico, identificación precoz del riesgo, elevada eficacia predictiva respecto de la progresión de la enfermedad renal y posibilidad de identificar a aquellos pacientes que requieran de una terapia de reemplazo renal.

#### 1.4.4 Nuevos biomarcadores de lesión renal aguda

En los últimos años, se han realizado numerosas investigaciones en el campo de los biomarcadores, tanto en modelos experimentales animales como en humanos. Son muchos los péptidos y proteínas que han surgido como potenciales biomarcadores de daño renal, y se ha constatado que las mismas varían en su origen, en su función, en su distribución y en el momento de su liberación después de la lesión renal (Andreucci M *et al.*, 2017; Teo SH *et al.*, 2017; Antonelli A *et al.*, 2018; Beker BM *et al.*, 2018).

La mayor parte de la evidencia bibliográfica se centra en la lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL, del inglés *neutrophil gelatinase-associated lipocalin*), la molécula de

injurias renales 1 (KIM-1, del inglés *kidney injury molecule-1*), la N-acetil-D-glucosaminidasa (NAG), la interleuquina 18 (IL-18), proteínas de bajo peso molecular como la cistatina C (Cys-C) y la  $\beta$ 2-Microglobulina ( $\beta$ 2-M), la proteína de unión a ácidos grasos de tipo hepática (L-FABP) y marcadores de detención del ciclo celular como IGFBP7 y TIMP2 (Andreucci M *et al.*, 2017; Teo SH *et al.*, 2017; Antonelli A *et al.*, 2018; Beker BM *et al.*, 2018). A continuación, se detallan las características más relevantes de cada una de ellas.

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

NGAL, también conocida como lipocalina de neutrófilos o lipocalina 2, es un miembro de la superfamilia de las lipocalinas. Es una proteína pequeña, con carga positiva que puede presentarse en tres formas moleculares distintas; como un monómero de 25 kDa, como un homodímero de 45 kDa con un enlace disulfuro y como un heterodímero de 135 kDa, conjugado covalentemente con gelatinasa (metaloproteínasa de la matriz extracelular). La NGAL es sintetizada en la médula ósea durante la mielopoyesis desde donde se dirige y almacena en los gránulos de neutrófilos y, además, puede expresarse en varios tejidos no hematopoyéticos, como el colon, la tráquea, el pulmón y el epitelio renal (Cai L *et al.*, 2010; Martensson J y Bellomo R, 2014). La NGAL se sobreexpresa rápidamente en respuesta a la lesión renal aguda. En los riñones que experimentan isquemia o toxicidad temprana, la NGAL se acumula principalmente en las células del túbulo contorneado proximal y, además, pueden detectarse niveles elevados en sangre y orina (> 20 ng/mL) poco después de ocurrida la lesión (Huang HF *et al.*, 2017; Shang W y Wang Z, 2017).

Se han realizado diversos estudios para evaluar el potencial de NGAL como un nuevo biomarcador de LRA. Sin embargo, el hecho de que esta proteína tenga una alta producción extrarenal, juega en detrimento de su capacidad predictiva, dado que pueden registrarse incrementos en la excreción urinaria en ausencia de daño renal (Abella V *et al.*, 2015).

### ***Kidney injury molecule 1 (KIM-1)***

KIM-1 es una glicoproteína transmembrana que se expresa abundantemente en las células epiteliales de los túbulos proximales renales, luego de una lesión isquémica o tóxica. No es detectada en tejido renal sano, ni tampoco se la detecta en orina en situaciones no patológicas (Obermüller N *et al.*, 2014).

Investigaciones en modelos murinos y en humanos demostraron que la KIM-1 urinaria es un prometedor biomarcador de lesión renal. En comparación con NGAL, KIM-1 muestra una mejor especificidad para la LRA inducida por isquemia y toxicidad. Sin embargo, los niveles urinarios de KIM-1 también se encuentran elevados en pacientes con carcinoma de células renales, enfermedad renal crónica e infecciones del tracto urinario, por lo tanto su especificidad para diagnosticar LRA puede verse reducida (Vaidya VS *et al.*, 2009; Vanmassenhove J *et al.*, 2013).

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

La NAG es una enzima lisosomal que se localiza en las microvellosidades de las células de los túbulos proximales renales. Debido a su alto peso molecular, esta proteína no se excreta de manera regular, por lo tanto, altas concentraciones urinarias de NAG sugieren daño celular o mayor actividad lisosomal (Adiyanti SS y Loho T, 2012).

Diversos estudios han demostrado el aumento de la NAG urinaria en situaciones de LRA, originada por ejemplo, por fármacos nefrotóxicos, cirugía cardíaca o trasplante renal, y por ello ha sido propuesta como un biomarcador de lesión renal. Sin embargo, en las enfermedades glomerulares, el análisis de isoenzimas de NAG ha demostrado que la excreción urinaria aumentada de esta enzima se debe al incremento de la liberación por las células tubulares renales y no a la filtración aumentada debido a daño en la pared capilar glomerular (Beker BM *et al.*, 2018).

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

La IL-18 es una citoquina proinflamatoria, sintetizada por monocitos, macrófagos y células epiteliales tubulares proximales. Si bien se expresa de manera constitutiva en el tejido renal sano, esta proteína ha sido detectada en la orina de humanos y de diversos modelos animales con disfunción renal de diferente etiología. Es considerada como un biomarcador temprano de disfunción renal (Slocum JL *et al.*, 2012).

Sin embargo, la concentración urinaria de IL-18 puede estar influenciada por otros factores independientes de la condición renal, dado que al ser una citoquina proinflamatoria, juega un rol crucial en todas aquellas situaciones donde haya una respuesta inflamatoria involucrada, como la sepsis y las enfermedades inflamatorias y autoinmunes, limitando así su especificidad y su uso como biomarcador (Obermüller N *et al.*, 2014).

### ***Cistatina C (Cys-C)***

La Cys-C es una proteína inhibidora de la cisteinoproteasa, de bajo peso molecular (13 kDa), producida por todas las células nucleadas del cuerpo y liberada en la sangre, con una tasa de síntesis muy estable. En condiciones fisiológicas, es filtrada libremente a través del glomérulo y reabsorbida completamente, siendo posteriormente degradada en el interior de las células de los túbulos proximales renales. Por lo tanto, la aparición de esta proteína en la orina es un indicador de una alteración en la capacidad de reabsorción de los túbulos (Teo SH y Endre ZH, 2017).

La Cys-C urinaria ha sido identificada como un prometedor biomarcador de LRA, más sensible que la creatinina. Sin embargo, se sabe que esta proteína compite con la albúmina por la reabsorción tubular y, por lo tanto, cualquier situación que genere un aumento de los niveles urinarios de albúmina, ocasionará aumentos en los niveles de Cys-C, independientemente de que haya daño renal (Beker BM *et al.*, 2018).

### ***β2-Microglobulina (β2-M)***

La β2-M es un polipéptido de bajo peso molecular (11,8 kDa) que forma la cadena ligera de los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I. Está presente en la superficie de todas las células nucleadas y, cuando se disocia de la cadena pesada entra en circulación como un monómero. Es filtrada libremente por el riñón, y completamente reabsorbida y catabolizada en las células de los túbulos contorneados proximales. Una disminución de la filtración glomerular ocasiona incrementos en los niveles plasmáticos de β2-M, por lo que, a nivel plasmático, ha sido considerada de utilidad para diferenciar tubulopatías proximales de enfermedades renales glomerulares, tanto en adultos como en niños y neonatos (Andreucci M *et al.*, 2017).

Por otro lado, se ha observado que el aumento de los niveles urinarios de esta proteína puede servir como marcador temprano de disfunción tubular causada por agentes nefrotóxicos y por trasplante renal. Sin embargo, la estabilidad de la β2-M en orina es baja, lo que actúa en detrimento de su potencial como biomarcador en este tipo de patologías (Adiyanti SS y Loho T, 2012).

### ***Proteína de unión a ácidos grasos de tipo hepática (L-FABP)***

La proteína L-FABP es una lipocalina pequeña (14 kDa) que se produce en el hígado, y que está involucrada en la unión de ácidos grasos de cadena larga. Actúa como un antioxidante celular, al unir los productos de oxidación de los ácidos grasos y limitar sus efectos tóxicos en las membranas celulares. L-FABP se expresa en varios tejidos, principalmente intestinos y riñones, y a nivel renal, es filtrada por el glomérulo y reabsorbida en el túbulo proximal (Teo SH *et al.*, 2017).

Los niveles urinarios de L-FABP son indetectables en individuos sanos. Diversos estudios experimentales han demostrado que la aparición de L-FABP en orina es un biomarcador útil de LRA inducida por isquemia y por nefrotoxinas (Andreucci M *et al.*, 2017).

### ***Marcadores de detención del ciclo celular: Proteína 7 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP7) e Inhibidor tisular de las metaloproteínas 2 (TIMP2).***

IGFBP7 y TIMP2 son dos proteínas inductoras de la detención del ciclo celular en fase G1, un mecanismo clave en el desarrollo de la LRA (Beker BM *et al.*, 2018). Diversos estudios han comparado los niveles urinarios de ambas proteínas con otros biomarcadores de LRA, como NGAL, KIM-1 e IL-18 en orina, y en todos los casos se ha demostrado que la IGFBP7 y TIMP2 urinarias presentan una mejor capacidad predictiva. Koyner JL *et al.* (2015) reportaron que la medición temprana del índice (TIMP-2 x IGFBP7) en el contexto de una enfermedad crítica puede identificar a pacientes con LRA con un mayor riesgo de terapia de reemplazo renal y mortalidad. Recientemente, la *Food and Drug Administration* (FDA) aprobó la comercialización del Nephrocheck Test<sup>®</sup> y Astute 140<sup>®</sup> Meter (Astute Medical Inc., San Diego, CA, EE. UU.), una prueba rápida que mide en forma cuantitativa los niveles urinarios de ambos biomarcadores.

Sin embargo, vale la pena señalar que el producto (TIMP-2 x IGFBP7) mostró una correlación negativa con la edad, y que existe una asociación entre los cuadros de diabetes y altos niveles de (TIMP-2 x IGFBP7) en orina (Liu C *et al.*, 2017).

### **1.4.5 Biomarcadores específicos de nefropatía obstructiva**

La elucidación de los mecanismos celulares y moleculares que subyacen a la respuesta patofisiológica en la enfermedad renal obstructiva han permitido el descubrimiento de una serie de biomarcadores para el diagnóstico, la prognosis y el monitoreo de esta enfermedad. Como se

mencionó anteriormente en este capítulo, los efectos de la obstrucción sobre la función renal son la consecuencia de muchos factores que alteran profundamente todos los componentes de la función de la nefrona. Además de los efectos agudos sobre la tasa de filtración glomerular y la función de los túbulos, la obstrucción de uréteres induce lesiones tubulares e intersticiales que resultan de la activación de diferentes vías moleculares de señalización (Madsen MG *et al.*, 2013; Lucarelli G *et al.*, 2014; Chevalier RL, 2016).

La nefropatía obstructiva conduce a la activación del sistema de renina-angiotensina intrarrenal. La angiotensina II (ANGII) tiene un papel central en el inicio y la progresión del daño, tanto directa como indirectamente. ANGI regula la expresión de muchos factores como el factor de crecimiento transformante 1 (TGF-1), el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), la osteopontina, la molécula de adhesión de células vasculares 1 (VCAM-1), la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y el factor nuclear NF- $\kappa$ B, que entre otras cosas, promueven la expresión de genes proinflamatorios. ANGI también estimula el estrés oxidativo, a través de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS). Todos estos factores conducen al reclutamiento de células inflamatorias dentro de los espacios intersticiales, y estas células, a su vez, liberan citoquinas adicionales con actividades profibróticas y proapoptóticas, amplificando el daño tubular (Madsen MG *et al.*, 2012; Lucarelli G *et al.*, 2014; Chevalier RL, 2016).

El estiramiento mecánico de las células epiteliales es un poderoso estímulo de la apoptosis en los túbulos dilatados del riñón hidronefrótico. La apoptosis tubular es inducida por el factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) e inhibida por varias moléculas como la isoforma inducible de la sintetasa de óxido nítrico (iNOS), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1) (Chevalier RL, 2006).

Algunas de las proteínas más estudiadas hasta la fecha como potenciales biomarcadores de nefropatía obstructiva incluyen el TGF- $\beta$ 1, el EGF, la endotelina 1 y la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1). TGF- $\beta$ 1 se ha examinado en varios estudios clínicos, y Taha MA *et al.* (2007) han sugerido que los niveles urinarios de TGF- $\beta$ 1 podrían utilizarse como una herramienta no invasiva en el seguimiento a largo plazo de niños con obstrucción de la unión ureteropélvica (UPJO) después de la pieloplastia.

MCP-1 es una quimiocina específica que promueve la quimiotaxis de monocitos, y su expresión a nivel tubular conduce al reclutamiento de células inflamatorias dentro del espacio intersticial y a la estimulación secundaria de los miofibroblastos con aumento en el depósito de matriz extracelular intersticial. Por su parte, la endotelina 1 es un potente agente vasoconstrictor que se sintetiza en el endotelio vascular en respuesta a ANGI, entre otros estímulos. Es una molécula proinflamatoria y profibrótica que modula la síntesis de matriz extracelular y además,

interviene en la respuesta inflamatoria. Tanto MCP-1 como endotelina 1 han sido examinados en estudios clínicos y mostraron concentraciones urinarias aumentadas en niños con UPJO (Taha MA *et al.*, 2007; Bartoli F *et al.*, 2011).

Varios estudios han demostrado que los niños con UPJO tienen una reducción marcada de la expresión génica del EGF renal (Grandaliano G *et al.*, 2000; Yang Y *et al.*, 2006) pero los estudios que examinan los niveles urinarios de EGF han mostrado resultados contradictorios. Grandaliano G *et al.* (2007) demostraron una disminución de las concentraciones urinarias de EGF en niños con UPJO, mientras que otros autores no encontraron diferencias significativas (Taha MA *et al.*, 2007).

El rol de KIM-1 y NGAL como biomarcadores de daño renal también ha sido analizado en el contexto de la nefropatía obstructiva. En un estudio prospectivo realizado en niños con hidronefrosis grave debida a UPJO, Wasilewska A *et al.* (2011) mostraron que, las concentraciones urinarias de estas dos proteínas fueron significativamente más altas en los niños afectados en comparación con la de los grupos control. Además, tres meses después de la cirugía, los valores de KIM-1 en orina habían disminuido significativamente.

En conjunto, estos cambios a nivel del tejido del tracto urinario humano y de la orina están en línea con los predichos a partir de modelos animales. Sin embargo, la dificultad aún radica en poder determinar la gravedad y la probabilidad de progresión de la lesión renal obstructiva.

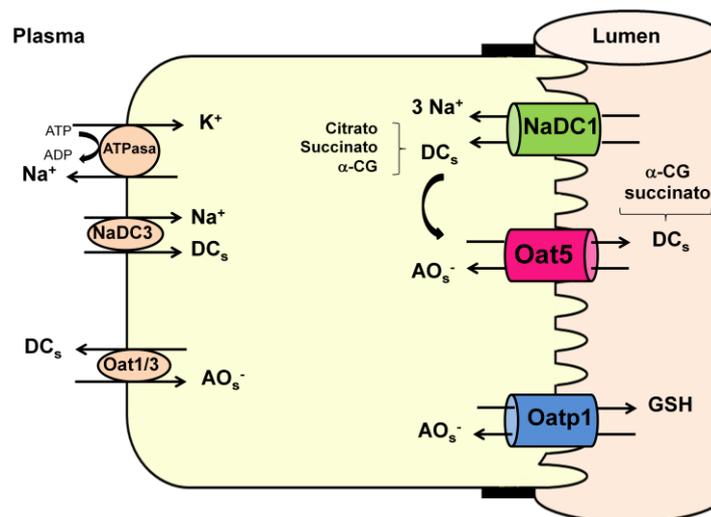
## **1.5 Transportadores de aniones orgánicos**

Una gran variedad de compuestos farmacológicos y agentes xenobióticos, así como compuestos endógenos y sus metabolitos, son clasificados químicamente como cationes o aniones orgánicos. Debido a su naturaleza iónica, estos compuestos no pueden atravesar libremente las membranas biológicas, por lo que requieren de transportadores específicos para su difusión. Las proteínas transportadoras de cationes y aniones orgánicos se encuentran distribuidas ampliamente en todos los tejidos del organismo, pero cobran especial importancia en aquellos órganos como los riñones y el hígado, encargados de la eliminación de sustancias y la homeostasis fisiológica (Koepsell H, 2013; Pelis RM y Wright SH, 2014; Murray M y Zhou F, 2017; Czuba LC *et al.*, 2018).

Los sistemas de transporte renal y hepático son utilizados tanto para la eliminación de sustancias potencialmente tóxicas para el organismo, como para la recuperación de aquellos metabolitos de importancia fisiológica, que no deberían ser eliminados y que por lo tanto son recaptados y devueltos a la circulación sistémica (Momper JD y Nigam SK, 2018).

En líneas generales, los transportadores de iones orgánicos son miembros de una de dos principales familias de transportadores: la familia con un sitio de unión a ATP (ABC, del inglés *ATP-binding cassette*) o la familia de proteínas transportadoras de solutos (SLC, del inglés *solute carriers*). Los miembros de la primera operan a través de un transporte activo primario (dependiente de ATP) y algunos de sus integrantes incluyen a las proteínas asociadas de resistencia a múltiples drogas (MRP<sub>s</sub>), las proteínas de resistencia a múltiples drogas (MDR<sub>s</sub>), y la proteína de resistencia al cáncer de mama (BCRP). Por su parte, los miembros de la familia SLC funcionan ya sea por difusión facilitada o por transporte activo secundario, y el flujo neto está dictado por los gradientes electroquímicos de los sustratos involucrados. Este grupo incluye, entre otros integrantes, a los transportadores de aniones y cationes orgánicos (OAT<sub>s</sub>/OCT<sub>s</sub>), a los cotransportadores sodio/dicarboxilato (NaDC<sub>s</sub>), y a los polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OATP<sub>s</sub>) (Murray M y Zhou F, 2017; Czuba LC *et al.*, 2018; Momper JD y Nigam SK, 2018).

En el presente trabajo de Tesis, la atención estará centrada en tres transportadores específicos, todos miembros de la familia SLC previamente mencionada: el **Transportador de aniones orgánicos 5 (Oat5)**, el **Cotransportador Na<sup>+</sup>/Dicarboxilatos 1 (NaDC1)** y el **Polipéptido transportador de aniones orgánicos 1 (Oatp1)** (*Figura 1.3*).



**Figura 1.3:** Esquema de una célula de túbulo proximal renal con Oat5, NaDC1 y Oatp1 expresados en ella. AO<sub>s</sub><sup>-</sup>: aniones orgánicos; DC<sub>s</sub>: dicarboxilatos; α-CG: α-cetoglutarato; GSH: glutatión.

### 1.5.1 Transportador de aniones orgánicos 5 (Oat5, Slc22a19)

El Transportador de aniones orgánicos 5 (Oat5, Slc22a19) es uno de los miembros de la familia de Transportadores de Aniones Orgánicos (Oat<sub>s</sub>). El gen codificante para esta proteína contiene 1995 pares de bases. En ratas y ratones, el ARNm de Oat5 se localizó mediante experimentos de *Northern blott* exclusivamente en los segmentos S2 y S3 del túbulo proximal renal (S2 <S3) (Youngblood GL y Sweet DH, 2004; Anzai N *et al.*, 2005; Kwak JO *et al.*, 2005) (**Figura 1.3**).

La proteína funcional contiene 551 aminoácidos y el modelo estructural propuesto se compone de 10-12 dominios transmembrana, con cuatro posibles sitios de glicosilación (residuos 39, 56, 62 y 102) y numerosos sitios potenciales de fosforilación (algunos de ellos, residuos 216, 272, 279, 313 y 536) (Youngblood GL y Sweet DH, 2004). Ensayos de inmunohistoquímica, han localizado a la proteína en la membrana apical de las células del túbulo proximal, en los segmentos S2 y S3, ubicados particularmente en la médula externa y en la corteza juxtamedular del riñón (Anzai N *et al.*, 2005; Kwak JO *et al.*, 2005).

Al igual que otros Oat<sub>s</sub>, la expresión es influenciada por el sexo, siendo mayor en las hembras, aparentemente debido a una inhibición de la expresión inducida por andrógenos (testosterona) (Breljak D *et al.*, 2010).

Oat5 ha sido definido como un antiportador de anión orgánico/dicarboxilato sensible a probenecid, con preferencia por dicarboxilatos con una longitud de cadena de 4 carbonos, como succinato y  $\alpha$ -cetoglutarato. La actividad de Oat5 está funcionalmente acoplada a la de otros transportadores como NaDC1, que generan el flujo de dicarboxilatos necesario para su correcto funcionamiento. Oat5 tiene capacidad de transporte para sulfatos de esteroides como el sulfato de dehidroepiandrosterona y la estrona-3-sulfato, y para fármacos de importancia clínica como antiinflamatorios no esteroideos, furosemida, y penicilina G. Además, puede transportar algunas toxinas, como la ocratoxina A, y salicilatos, pero muestra muy baja afinidad por algunos de los sustratos clásicos de los transportadores de aniones orgánicos como el p-aminohipurato (PAH) y otros fármacos aniónicos y catiónicos (Burckhardt G, 2012; Nigam SK *et al.*, 2015).

Nuestro grupo de investigación ha demostrado alteraciones en la expresión renal y en la excreción urinaria de Oat5, en distintos modelos experimentales de patologías humanas. Además, ha sido pionero en la detección de Oat5 en muestras de orina (Di Giusto G *et al.*, 2009). En los últimos años, nuestro equipo de trabajo ha postulado a la excreción urinaria de Oat5 como biomarcador temprano de daño renal inducido por isquemia (Di Giusto G *et al.*, 2009), calcificación vascular (Hazelhoff MH *et al.*, 2013) y agentes nefrotóxicos tales como mercurio,

cisplatino y metotrexato (Di Giusto G y Torres AM, 2010; Bulacio RP y Torres AM, 2013 y 2015; Bulacio RP *et al.*, 2015; Severin MJ *et al.*, 2016, 2019).

### 1.5.2 Cotransportador Na<sup>+</sup>/Dicarboxilatos 1 (NaDC1, Slc13a2)

El Cotransportador Na<sup>+</sup>/Dicarboxilatos 1 (NaDC1, Slc13a2) es un transportador perteneciente a la familia de Cotransportadores Na<sup>+</sup>/Dicarboxilatos (NaDC<sub>s</sub>) que se expresa principalmente en la membrana apical de las células del túbulo proximal renal y en el intestino delgado (**Figura 1.3**). Su función principal consiste en reabsorber los intermediarios del ciclo de Krebs filtrados desde la luz tubular en el riñón o aquellos que provienen de los alimentos digeridos en el intestino, los cuales son una fuente energética y de biosíntesis para el metabolismo oxidativo celular (Bergeron MJ *et al.*, 2013).

El gen que codifica para NaDC1 ha sido clonado de diversas especies de mamíferos, incluyendo humanos, ratones, conejos y ratas (Zhang FF y Pajor AM, 2001). La proteína contiene 592 aminoácidos y el modelo estructural propuesto consiste en 11 dominios transmembrana flanqueados por un extremo N-terminal citosólico y una región C-terminal extracelular con uno o dos sitios consenso de N-glicosilación. Estudios de inmunohistoquímica permitieron localizar a NaDC1 en la membrana apical del túbulo proximal renal de rata y de ratón, y en las membranas del borde en cepillo yeyunal del ser humano y del ratón (Pajor AM, 2014).

En el riñón, la actividad de NaDC1 promueve la generación de un gradiente de dicarboxilatos a través de la membrana que permite el correcto funcionamiento de otros transportadores apicales como por ejemplo Oat5. El transporte mediado por NaDC1 reúne una serie de características: presenta alta especificidad de sustrato con preferencia por dicarboxilatos (succinato, malato, oxalacetato) y tricarboxilatos (citrato); es electrogénico, acoplado al movimiento de tres Na<sup>+</sup> por cada dicarboxilato, preferentemente en su estado divalente; muestra sensibilidad al pH dependiente de sustrato: cotransporte pH-independiente para succinato y pH-dependiente para citrato; es un transporte con sensibilidad al litio: en algunas especies, los iones Li<sup>+</sup> pueden actuar como inhibidores competitivos y/o sustituir al Na<sup>+</sup> impidiendo el transporte de dicarboxilatos (Bergeron MJ *et al.*, 2013; Pajor AM, 2014).

A nivel fisiológico, el rol principal de NaDC1 consiste en regular las concentraciones urinarias de citrato. El citrato actúa como un quelante de iones calcio que previene no sólo la precipitación de cristales en la orina, sino también su aglomeración y crecimiento, que en última instancia llevan a la formación de cálculos renales. En el plasma, la mayor parte del citrato

circula de forma libre y la fracción restante se encuentra complejada con calcio, potasio y sodio. A nivel renal, el citrato del plasma es filtrado en el glomérulo y luego es reabsorbido principalmente en el túbulo proximal desde la luz tubular, mediante NaDC1, y desde los capilares peritubulares, a través de NaDC3, otro transportador de la familia localizado en la membrana basolateral de las células del túbulo proximal (Hering-Smith KS *et al.*, 2000).

El citrato es el ácido orgánico más abundante en la orina, aunque normalmente se excreta a tasas muy bajas. Aproximadamente 10-35 % de la carga filtrada total se excreta en la orina. En condiciones fisiológicas, no se ha demostrado la secreción tubular de citrato (Hering-Smith KS *et al.*, 2000).

### **1.5.3 Polipéptido transportador de aniones orgánicos 1 (Oatp1, Slco1a1)**

El Polipéptido transportador de aniones orgánicos 1 (Oatp1, Slco1a1) es uno de los miembros de la familia de Polipéptidos Transportadores de Aniones Orgánicos (Oatp<sub>s</sub>), que se expresa en una gran variedad de órganos y tejidos, fundamentalmente en riñón, hígado y cerebro (**Figura 1.3**) (Hagenbuch B y Meier PJ, 2004; Svoboda M *et al.*, 2011).

El gen que codifica para Oatp1 fue aislado y clonado por primera vez en la rata (Jacquemin E *et al.*, 1994). Posteriormente los estudios continuaron en humanos y en otras especies de interés para la investigación farmacéutica como el mono, el perro y el cerdo. La proteína funcional contiene 643 aminoácidos y el modelo estructural propuesto consiste en 12 dominios transmembrana, con los extremos N-terminal y C-terminal orientados hacia la región citoplasmática de la célula. La proteína presenta además cuatro sitios de glicosilación caracterizados, en los residuos 62, 124, 135 y 492. Diferentes estudios de inmunohistoquímica han permitido localizar a Oatp1 en la membrana apical de la célula del túbulo proximal renal, particularmente en el segmento S3, y en la membrana sinusoidal (basolateral) de hepatocitos (Hagenbuch B y Meier PJ, 2004; Svoboda M *et al.*, 2011).

La expresión de Oatp1 en el riñón está influenciada por el sexo y es regulada por hormonas sexuales, principalmente testosterona. La expresión es mayor en los machos que en las hembras (Gotoh Y *et al.*, 2002).

El transporte mediado por Oatp1 es independiente de sodio y los sustratos son preferentemente aniones orgánicos anfipáticos de peso molecular mayor a 300 Da (Jacquemin E *et al.*, 1994; Eckhardt U *et al.*, 1999; Shitara Y *et al.*, 2002; Hata S *et al.*, 2003). Dentro de la amplia variedad de compuestos transportados por esta proteína podemos mencionar: ácidos y

sales biliares, bilirrubina, conjugados de esteroides, prostaglandinas y fármacos de importancia clínica como antibióticos  $\beta$ -lactámicos, eritromicina, glicósidos cardíacos, estatinas, entre otros.

## **2. OBJETIVOS**

La lesión renal obstructiva ocasiona alteraciones estructurales y funcionales a lo largo de todos los segmentos de la nefrona. En muchas ocasiones, la pérdida de integridad de los epitelios tubulares conduce a la liberación de diversas proteínas de membrana hacia la luz tubular, promoviendo su aparición en la orina. Esta situación y el hecho de ser moléculas en íntimo contacto con el sitio de la lesión, las convierte en excelentes biomarcadores del daño renal. Los transportadores de aniones orgánicos son proteínas integrales de membrana, susceptibles de aparecer en el fluido tubular en situaciones de lesión renal, por lo tanto el objetivo general del presente trabajo de Tesis consistió en...

**“Analizar la excreción urinaria de diferentes proteínas transportadoras de aniones orgánicos en un modelo experimental de nefropatía obstructiva en ratas, con el fin de determinar su potencialidad como biomarcadores de lesión renal obstructiva.”**

Para ello, se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar las alteraciones de la función renal en un modelo experimental de nefropatía postrenal, obtenido a través de la obstrucción completa de ambos uréteres durante diferentes periodos de tiempo.
- Evaluar la excreción urinaria de diferentes proteínas transportadoras renales, en grupos experimentales de nefropatía obstructiva de gravedad creciente, y compararlas con marcadores tradicionales de lesión renal. Las proteínas a evaluar son:
  - \* El **Transportador de aniones orgánicos 5 (Oat5, Slc22a19)**
  - \* El **Cotransportador Na<sup>+</sup>/Dicarboxilatos 1 (NaDC1, Slc13a2)**
  - \* El **Polipéptido transportador de aniones orgánicos 1 (Oatp1, Slco1a1)**
- Evaluar la expresión renal de Oat5, NaDC1 y Oatp1 en el contexto de la lesión renal obstructiva y determinar sus implicancias.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Animales de experimentación**

Se utilizaron ratas Wistar macho adultas (110-130 días de edad y 350-380 g de peso corporal, p.c.) provenientes del Bioterio de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario (U.N.R). Durante los experimentos los animales tuvieron libre acceso al agua y al alimento, y fueron mantenidos en condiciones constantes de humedad y temperatura (21-23°C), con ciclos regulares de luz (12 h). Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con los principios y lineamientos para el cuidado y uso de animales de laboratorio (National Research Council (US) Committee of the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8<sup>th</sup> Edition. Washington (DC). National Academies Press. (US); 2011). Así mismo, el protocolo experimental fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, U.N.R. (Resol. 484/2015).

#### **3.2 Diseño experimental**

Para la realización del presente trabajo de Tesis, se trabajó con un **modelo de nefropatía obstructiva**, basado en la obstrucción completa de ambos uréteres (obstrucción ureteral bilateral, OUB). Previo a los procedimientos quirúrgicos los animales fueron pesados y anestesiados con tiopental sódico (Pentothal<sup>®</sup> Sódico), empleando una dosis de 70 mg/kg de p.c., intraperitoneal (i.p.). La operación consistió en efectuar una incisión a ambos lados de la cavidad abdominal, localizar los uréteres y obstruirlos completamente mediante el uso de *clamps* vasculares (Villar SR *et al.*, 2004, 2005, 2008; Di Giusto G y Torres AM, 2009). Posteriormente, la herida fue cerrada, permitiendo a los animales recuperarse completamente, teniendo libre acceso al agua y al alimento.

Se estudiaron cuatro grupos experimentales (**Figura 3.1**):

OUB1: ratas sometidas a 1 h de obstrucción ureteral (n=5)

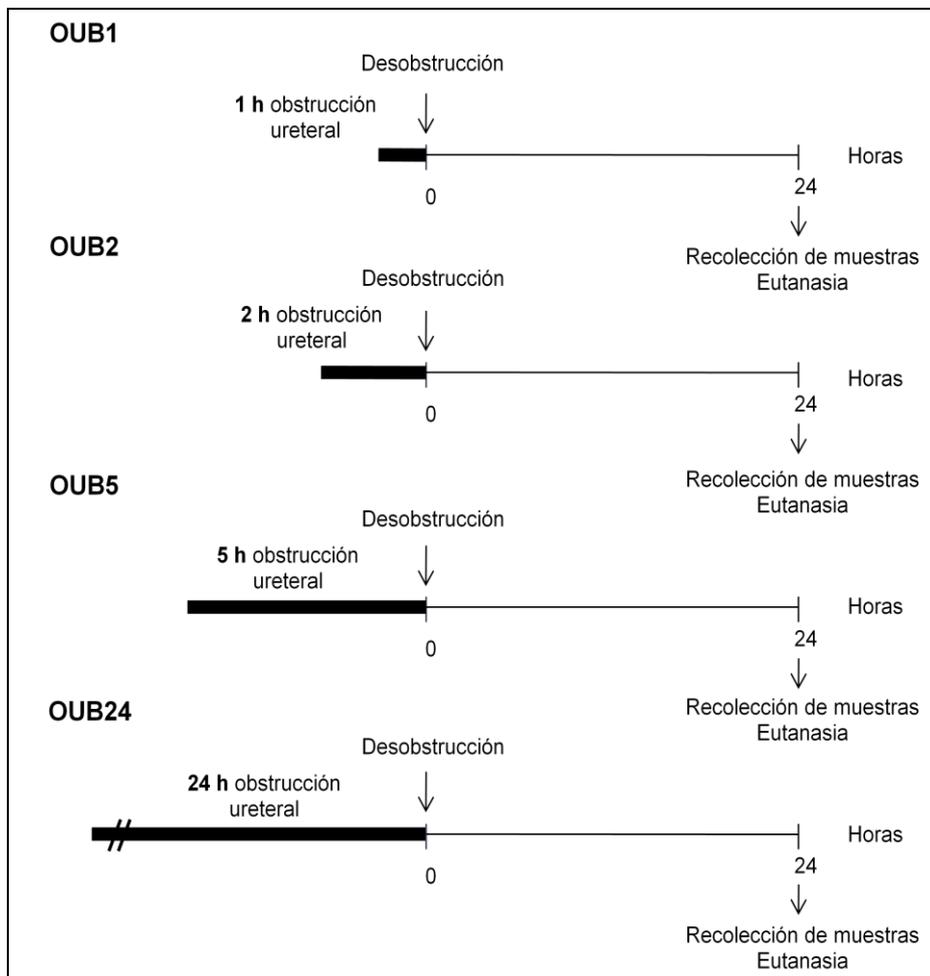
OUB2: ratas sometidas a 2 h de obstrucción ureteral (n=7)

OUB5: ratas sometidas a 5 h de obstrucción ureteral (n=6)

OUB24: ratas sometidas a 24 h de obstrucción ureteral (n=6)

La obstrucción fue considerada exitosa cuando el diámetro ureteral fue mayor a 2 mm y se constató la ocurrencia de hidronefrosis. Luego de transcurrido el periodo obstructivo se procedió nuevamente a anestésiar a los animales y, por cirugía, a desligar ambos uréteres mediante la remoción de los *clamps* vasculares. Posteriormente, los animales fueron mantenidos en jaulas metabólicas durante 24 h. El día del experimento los animales se anestésiaron nuevamente con tiopental sódico (70 mg/kg p.c., i.p.) y se obtuvieron muestras de sangre, orina y tejido renal. Para finalizar, se practicó la eutanasia con una sobredosis de anestésico y posterior neumotórax.

Para cada grupo experimental se procesó, simultáneamente, un grupo de animales Sham. Una vez corroborado que no existían diferencias significativas entre ellos, en cada variable estudiada, se procedió a unificarlos en un grupo Sham unificado (grupo Sham, n=11) para facilitar el análisis de los resultados.



**Figura 3.1:** Esquema del diseño experimental.

### 3.3 Obtención de muestras y procesamiento posterior

Los animales fueron colocados en jaulas metabólicas individuales, en ayuno y con libre acceso al agua, luego de la cirugía de desobstrucción, durante 24 horas para la recolección de las muestras de orina. El volumen urinario se determinó por gravimetría y se expresó en  $\mu\text{L}/\text{min} \cdot 100\text{g p.c.}$  (flujo urinario,  $U_f$ ). Las orinas fueron centrifugadas a 3.000 g durante 10 minutos, con el fin de eliminar células descamadas y detritus celulares. Los sobrenadantes se utilizaron para realizar diferentes determinaciones bioquímicas (niveles de creatinina, glucosa, proteínas totales, osmolaridad, citrato, y la actividad de fosfatasa alcalina) y para evaluar la abundancia proteica de Oat5, NaDC1, Oatp1 y NGAL mediante la técnica de electroforesis y *Western blotting*.

El día de los experimentos (24 h posteriores a la cirugía de desobstrucción), los animales fueron anestesiados nuevamente, y se procedió a la recolección de las muestras de sangre y a la extracción de los riñones, los cuales fueron pesados y almacenados a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su posterior uso. Las muestras de sangre, obtenidas por punción cardíaca, se centrifugaron a 3.000 g por 10 minutos. En el plasma obtenido se realizaron las mediciones de los niveles de urea, creatinina, glucosa y osmolaridad.

#### *Recolección de muestras de orina mediante jaula metabólica*

Las jaulas metabólicas (**Figura 3.2**) son dispositivos cuidadosamente diseñados para separar de forma selectiva la orina y las heces. La separación es inmediata y completa, sin ninguna posibilidad de contaminación, proporcionando muestras puras y fiables. Una jaula metabólica comercial típica consta de un habitáculo de policarbonato transparente, resistente a las mordeduras, donde el animal se mantiene contenido. Este habitáculo posee un suelo de rejilla que se coloca en la parte superior de un embudo por donde la orina fluye hasta caer en un vial de colección, graduado en centímetros cúbicos. En los laterales, las heces caen por separado en otro vial.

El habitáculo superior contiene una botella de agua, que funciona como mamadera, y que se encuentra anexada a un tubo para la recolección de derrames. Ambos están calibrados, lo que permite al investigador medir la cantidad real de agua consumida durante el experimento. Además, el habitáculo posee un cajón con alimento, que puede abrirse desde afuera, facilitando el llenado por el operador sin molestar al animal.

Los tubos para la recolección de orina y heces son de policarbonato impermeable, lo que permite la libre fluidez de las muestras. Cada muestra puede retirarse sin la menor molestia para el animal, permitiendo la realización de las pruebas sin interrupciones, durante periodos de tiempo prolongados. Además, todos los componentes de la jaula se pueden lavar y esterilizar (Kurien BT *et al.*, 2004).

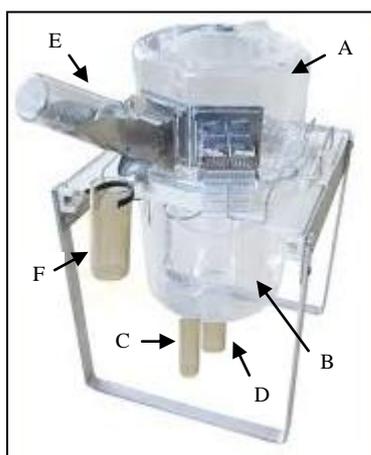


Imagen adaptada de <https://es.made-in-china.com>

**Figura 3.2:** Jaula metabólica. (A) Habitáculo de policarbonato. (B) Embudo por donde fluye la orina. (C) Vial de policarbonato graduado para la recolección de orina. (D) Vial para las heces. (E) Botella de agua calibrada (madera). (F) Tubo para la recolección de derrames.

### 3.4 Monitoreo de la pérdida de peso corporal

A fin de evaluar la posible variación en el peso corporal, los animales fueron pesados antes de realizar la cirugía de obstrucción y previo a la obtención de las muestras de sangre y de tejido renal.

La pérdida de peso se calculó como % de peso perdido, según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Peso perdido} = - (\text{Peso}_{\text{final}} - \text{Peso}_{\text{inicial}}) \cdot 100$$

### 3.5 Cálculo de la relación peso renal/peso corporal

El peso y el tamaño de los órganos en los animales de laboratorio se encuentran influenciados por diversas variables, entre ellas el peso corporal. La determinación del peso renal en relación al peso corporal representa un valioso aporte sobre todo para evaluar la variación relativa de peso del órgano, debida a la nefropatía obstructiva.

La relación peso renal/peso corporal se calculó como un cociente entre el peso de los riñones y el peso corporal final (previo a la cirugía de eutanasia), según la siguiente fórmula:

$$\text{Peso renal/Peso corporal (Pr/PC)} = (\text{Peso}_{\text{Riñón}} / \text{Peso}_{\text{Corporal final}}) \cdot 10^{-3}$$

### **3.6 Determinaciones bioquímicas**

#### **3.6.1 Determinación de la concentración plasmática de urea**

La urea es generada en el hígado como resultado del catabolismo de los aminoácidos. Las enzimas del ciclo de la urea convierten el amoníaco citotóxico proveniente del metabolismo proteico, en otra sustancia más inocua y neutra, la urea, que puede ser eliminada a través de los fluidos, especialmente la orina. La urea es excretada no solo por filtración glomerular, sino también por secreción tubular, siendo el 40-50% reabsorbida en los túbulos proximales (Schmidt-Nielsen B y Sands JA, 2001; Layton AT y Bankir L, 2013).

El nitrógeno ureico en sangre (BUN) ha sido utilizado durante décadas para evaluar la función renal. Sin embargo, dado que los niveles en sangre de este compuesto pueden alterarse debido a diferentes situaciones como la dieta, hormonas y diferentes enfermedades, actualmente es considerado como un indicador no específico de la función renal (Traynor J *et al.*, 2006; Waikar SS y Bonventre JV, 2006).

#### *Técnica experimental*

La concentración plasmática de urea fue determinada espectrofotométricamente. Se utilizó un kit comercial (Uremia, Laboratorio Wiener, Rosario, Argentina) basado en la capacidad de la ureasa de descomponer específicamente a la urea en dióxido de carbono y amoníaco. El amoníaco reacciona con fenol e hipoclorito en un medio alcalino y produce azul de indofenol, compuesto que finalmente es detectado por espectroscopía a  $\lambda=540$  nm.

#### **3.6.2 Determinación de la concentración de creatinina en muestras de plasma y orina**

La creatinina es un compuesto proveniente del metabolismo de la creatina y la fosfocreatina musculares, que se forma a una tasa relativamente constante en el organismo, con el fin de proporcionar una fuente rápida pero a corto plazo de ATP en los músculos y otros tejidos. Se

elimina de manera casi completa por filtración glomerular a través de la orina, no se reabsorbe y su secreción es prácticamente mínima (Van Veldhuisen DJ *et al.*, 2016).

La medición de los niveles de creatinina en plasma y orina, así como el cálculo de su *clearance* renal, se utilizan ampliamente para evaluar la función renal y para normalizar los niveles de varios compuestos excretados. Una alteración en la velocidad de filtración glomerular ocasionará la acumulación de este compuesto en el plasma y su consecuente disminución en la orina (Van Veldhuisen DJ *et al.*, 2016).

### Técnica experimental

Para determinar la concentración de creatinina, tanto en plasma como en orina, se utilizó un kit comercial (Creatinina, Laboratorios Wiener, Rosario, Argentina). El método consiste en la reacción de la creatinina con picrato alcalino en un medio tamponado, que da lugar a la formación de un compuesto coloreado que se detecta espectrofotométricamente a  $\lambda=510$  nm. En el caso del plasma, previo a la reacción, se realizó la desproteínización de la muestra con ácido pícrico.

### **3.6.3 Determinación del *clearance* renal de creatinina**

El *clearance* renal de cualquier sustancia se define como el volumen de plasma que es depurado de dicha sustancia por unidad de tiempo. Si  $[X]_o$  es igual a la concentración en orina de la sustancia X, y  $U_f$  es la velocidad de formación de orina (flujo urinario), entonces  $([X]_o \cdot U_f)$  es la cantidad de sustancia X excretada en la orina por unidad de tiempo. Si  $[X]_p$  es la concentración de X en plasma, el término  $([X]_o \cdot U_f / [X]_p)$  indica el volumen de plasma depurado de la sustancia X en la unidad de tiempo. Esta relación brinda una visión cuantitativa de la habilidad renal para excretar la sustancia X en relación a su concentración en plasma a un tiempo dado.

Una de las aplicaciones de las técnicas de *clearance* es la determinación de la velocidad de filtración glomerular (VFG). La VFG es un buen parámetro para evaluar la función renal. Uno de los requerimientos para la estimación es contar con una sustancia que sea libremente filtrable en los glomérulos y no sea reabsorbida ni secretada por los túbulos renales.

La velocidad a la cual tal sustancia es filtrada será igual a  $(VFG \cdot [X]_p)$ ; la velocidad de excreción será igual a  $(U_f \cdot [X]_o)$ ; por lo tanto si tal sustancia no es reabsorbida ni secretada por los túbulos, la cantidad que se elimina por orina  $(U_f \cdot [X]_o)$  será igual a la cantidad de la misma

que filtra el riñón ( $VFG \cdot [X]_p$ ), de este modo la VFG será igual a  $(U_f \cdot [X]_o / [X]_p)$ . Es decir que el *clearance* de cualquier sustancia que cumpla con este criterio, será una medida de la VFG.

Para que una sustancia pueda ser utilizada en la estimación de la VFG debe cumplir, además, las siguientes condiciones:

- ✓ Ser fisiológicamente inerte y no tóxica.
- ✓ No estar sujeta a destrucción, síntesis o almacenamiento dentro del riñón.
- ✓ Presentar un *clearance* constante en un amplio rango de concentraciones plasmáticas.

A pesar de sus limitaciones, la creatinina es un compuesto endógeno que cumple con la mayoría de las características previamente mencionadas, por lo tanto, desde hace décadas, su *clearance* renal ha sido considerado como un estimador de la VFG y de la función renal (Stanton BA y Koepen BM, 1995).

#### Técnica experimental

El *clearance* renal de creatinina se determinó, utilizando la fórmula convencional de *clearance*:

$$Cl_{Cr} = (Cr_o \cdot U_f) / Cr_p$$

Para ello, se determinaron previamente las concentraciones de creatinina en plasma ( $Cr_p$ ) y en orina ( $Cr_o$ ) (ítem 3.6.2 de este capítulo), y se calculó el flujo urinario, empleando jaulas metabólicas para la recolección de la orina.

### **3.6.4 Determinación de las excreciones fraccionales de agua y osmoles**

La excreción fraccional de agua es la relación entre la velocidad de formación de la orina y la VFG. Este valor dará cuenta de los procesos pasivos de reabsorción de agua a lo largo de toda la nefrona.

$$EF\% \text{ H}_2\text{O} = (U_f / VFG) \cdot 100$$

Por otro lado, la excreción fraccional de osmoles se calcula como la relación entre la carga excretada ( $Osm_o \cdot U_f$ ) y la carga filtrada ( $Osm_p \cdot VFG$ ) de las partículas osmóticamente activas. Este parámetro evidencia el manejo tubular de especies osmóticamente activas.

$$EF\% \text{ Osm} = [(Osm_o \cdot U_f) / (Osm_p \cdot VFG)] \cdot 100$$

La osmolaridad en las muestras de orina y plasma se determinó empleando un osmómetro de descenso crioscópico (Osmomat 030 - Gonotec, GmbH, Alemania).

### **3.6.5 Determinación de la concentración de proteínas totales en orina**

La proteinuria es la presencia de niveles elevados de proteínas en la orina, por encima del intervalo de referencia. La membrana basal glomerular es una barrera eficaz que impide el paso de moléculas de gran tamaño, pero eventualmente, una pequeña fracción puede atravesar la membrana y aparecer en el filtrado glomerular. En condiciones fisiológicas, estas proteínas filtradas son degradadas y reabsorbidas en los túbulos proximales, sin embargo, cuando la función renal se encuentra comprometida, ocurre un aumento en la permeabilidad glomerular y/o una alteración en el proceso de reabsorción tubular, lo que ocasiona el incremento en los niveles urinarios de proteínas. La presencia de concentraciones elevadas de proteínas en la orina, de modo persistente, es un signo de lesión renal (Montañés Bermúdez R *et al.*, 2011).

#### *Técnica experimental*

Los niveles de proteínas totales en la orina se determinaron espectrofotométricamente utilizando un kit comercial (Proti U/LCR, Laboratorios Wiener, Rosario, Argentina). Las proteínas presentes en la muestra reaccionan con el complejo Rojo de Pirogalol-Molibdato, en medio ácido, generando un nuevo compuesto coloreado que se detecta a  $\lambda=600$  nm.

### **3.6.6 Determinación de la concentración de glucosa en plasma y orina**

En situaciones fisiológicas, la glucosa sanguínea es filtrada libremente por el glomérulo y reabsorbida completamente a nivel tubular, mediante transportadores específicos. Cuando la función renal es normal, la excreción de glucosa a través de la orina ocurre solamente cuando la concentración de glucosa en sangre es anormalmente elevada, debido a la saturación del transporte. Sin embargo, una alteración en la capacidad de reabsorción de los túbulos renales, también puede ocasionar aumentos en los niveles urinarios de glucosa. Por lo tanto, frente a niveles de glucosa en sangre normales, el aumento en los niveles de glucosa en orina es un parámetro indicativo de daño renal tubular (Mather A y Pollock C, 2011).

### Técnica experimental

El dosaje de glucosa en plasma y orina se realizó empleando un kit comercial (Glicemia, Laboratorios Wiener, Rosario, Argentina). El método se basa en la reacción enzimática de la glucosa oxidasa que convierte a la glucosa, presente en la muestra, en ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. Este último reacciona con fenol y 4-aminofenazona produciendo una quinona coloreada que se detecta a  $\lambda=505$  nm.

#### **3.6.7 Determinación de la actividad de fosfatasa alcalina en orina**

La fosfatasa alcalina es una enzima de localización ubicua, que cataliza la hidrólisis de diferentes monoésteres fosfóricos, a pH alcalino. En el riñón, esta enzima se localiza en la zona del ribete en cepillo de los túbulos proximales renales y tradicionalmente, el aumento en la actividad de la fosfatasa alcalina en orina se asocia a daño en la estructura de las microvellosidades. Pacientes con patologías renales de diferente etiología mostraron aumentos en la actividad de la fosfatasa alcalina urinaria, sin modificaciones de la misma a nivel plasmático, permitiendo inferir que el aumento observado se debe principalmente al daño de la célula renal (Refaie MO *et al.*, 2000; Santos C *et al.*, 2010).

### Técnica experimental

La actividad de la fosfatasa alcalina se determinó por espectrofotometría utilizando un kit comercial (Fosfatasa alcalina optimizada, Laboratorios Wiener, Rosario, Argentina). La técnica se basa en la capacidad de la fosfatasa alcalina de desdoblar al fenilfosfato de sodio, en medio alcalino. El fenol liberado se determina por reacción con 4-aminoantipirina y ferrocianuro como agente oxidante. El color que se desarrolla es directamente proporcional a la actividad de la enzima y es detectado a  $\lambda=520$  nm.

#### **3.6.8 Determinación de la concentración de citrato en orina**

El citrato es un dicarboxilato intermediario del ciclo de Krebs, sintetizado y metabolizado por aquellos tejidos que obtienen la energía principalmente a partir del metabolismo oxidativo. La molécula de citrato está involucrada no sólo en la producción de energía sino también en varias vías metabólicas: es una fuente de equivalentes reductores citosólicos para la biosíntesis

reductiva, es una fuente de carbono para procesos biosintéticos citosólicos (por ejemplo, ácidos grasos, esteroides), y es un regulador de otros pasos metabólicos (Caudarella R *et al.*, 2003).

En la sangre, la mayor parte del citrato circula de forma libre y la fracción restante se encuentra complejada con calcio, potasio y sodio. A nivel renal, el citrato es filtrado en el glomérulo y luego reabsorbido principalmente en el túbulo proximal. A pesar de que sólo el 10-35% de la carga filtrada total se excreta en la orina, se considera que el citrato es el anión orgánico más abundante presente en este fluido (Unwin RJ *et al.*, 2004).

### Técnica experimental

La determinación de los niveles de citrato en las muestras de orina se realizó empleando un kit comercial (Citric acid, Boehringer Mannheim/R-Biopharm, Darmstadt, Alemania). El fundamento de la técnica consiste en la capacidad de la citratoliasa de desdoblar el citrato en oxalacetato y acetato. El oxalacetato junto con el piruvato proveniente de la degradación del acetato, son reducidos a L-malato y L-lactato respectivamente, a expensas de la oxidación de NADH. La cantidad de NADH oxidado es estequiométrico con la cantidad de citrato de partida. El NADH es detectado por medio de su absorbancia a  $\lambda=340$  nm.

### **3.6.9 Determinación de la concentración de proteínas en tejido renal**

El dosaje de proteínas en muestras de tejido renal se realizó empleando la técnica de Lowry, con algunas modificaciones (Severin MJ *et al.*, 2016, 2019). A través de una reacción en dos fases, el método permite analizar cuantitativamente la concentración de proteínas de una muestra. En una primera etapa se añade a la muestra un reactivo, conocido con el nombre de reactivo alcalino, que contiene iones  $\text{Cu}^{++}$ , en medio alcalino. Los mismos se unen a las proteínas formando complejos con los enlaces peptídicos. Estos complejos provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos fenólicos de la tirosina y el triptófano. El  $\text{Cu}^{++}$  permanece en solución alcalina gracias a la formación de complejos con el tartrato, otro componente del reactivo alcalino, impidiendo así la precipitación. En una segunda fase se agrega el reactivo de Folin, también en medio básico, y se produce su reducción por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina y triptófano, actuando el cobre como un catalizador. El componente principal del reactivo de Folin es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido da lugar a un complejo de color azul intenso que se mide a  $\lambda=600$  nm. La intensidad del color es proporcional a la concentración de proteínas en la solución.

### 3.7 Estudios en tejido renal

#### 3.7.1 Estudios histopatológicos y de inmunohistoquímica

La histología es la disciplina que estudia los aspectos morfológicos, estructurales y funcionales de los diferentes tejidos orgánicos. Para llevar a cabo un estudio histológico es necesario contar con una serie de procedimientos que permitan la preparación de las muestras para la observación microscópica. Dentro de las diferentes técnicas histológicas existentes, las que se basan en el estudio de material muerto o inanimado son las que presentan mayores aplicaciones y por tanto, las más frecuentemente utilizadas. En líneas generales el proceso consta de una serie de etapas que comienzan con la fijación del tejido a analizar. La *fijación* preserva las características morfológicas de la muestra y evita los procesos degradativos de autólisis y putrefacción; el fijador coagula las proteínas estableciendo enlaces cruzados entre ellas e inactiva las enzimas líticas retardando la aparición de alteraciones después de la muerte o disección, conservando de esta manera la estructura lo más parecida posible a como se hallaba en el organismo vivo. Luego, el tejido fijado debe ser cortado en secciones de un espesor de entre 5-10  $\mu\text{m}$  para poder realizar la observación microscópica. Para poder realizar tales cortes, el tejido necesita ser incluido en un medio especial, generalmente parafina, que le otorgue una consistencia adecuada. La parafina es un tipo de cera insoluble en agua, por lo tanto, previo a la inclusión, la muestra debe ser deshidratada empleando para ello una serie de baños en alcoholes y solventes orgánicos. Una vez realizada la inclusión, el bloque sólido del tejido impregnado en la parafina se corta en secciones delgadas las cuales se montan en portaobjetos de vidrio (Geneser F, 2008; Martín Lacave I y García Caballero T, 2012).

Como muchos constituyentes tisulares tienen aproximadamente las mismas densidades ópticas, los preparados deben teñirse para poder observarlos a la luz del microscopio. La tinción se efectúa principalmente con colorantes hidrosolubles. Primero se retira la parafina del corte y, a continuación, el tejido se rehidrata y se tiñe. La tinción empleada más a menudo en histología es la de hematoxilina y eosina. La hematoxilina es una base que brinda un tinte azulado preferencialmente a los componentes ácidos de la célula. Como la mayor parte de los componentes ácidos son ADN y ARN, el núcleo y ciertas regiones del citoplasma se tiñen de color azul oscuro. La eosina es un ácido que otorga una coloración rosada a los componentes básicos de la célula. Como muchos constituyentes citoplásmicos tienen pH básico, las regiones del citoplasma se tiñen de color rosado.

Después de la tinción el corte se deshidrata una vez más de modo que pueda fijarse de manera permanente en el portaobjetos con un medio de montaje adecuado. El cubreobjetos no sólo protege al tejido del daño, sino que además se requiere para poder ver el corte con el microscopio (Geneser F, 2008; Martín Lacave I y García Caballero T, 2012).

Por otro lado, las técnicas de inmunohistoquímica permiten localizar constituyentes químicos específicos de los tejidos y las células, con mayor grado de precisión. Basada en la alta especificidad y afinidad de la reacción antígeno-anticuerpo, la técnica de inmunohistoquímica permite determinar la localización *in situ* de determinadas proteínas, mediante el empleo de anticuerpos específicos y diferentes sistemas de detección. Dichos sistemas de detección pueden ser enzimáticos o fluorescentes, y las opciones van desde versiones sencillas, donde la marcación se encuentra directamente en el anticuerpo primario, hasta otras más complejas, donde la marca se encuentra en el anticuerpo secundario. Actualmente, los protocolos disponibles son numerosos y la elección de uno u otro dependerá principalmente del grado de sensibilidad requerido por el sistema de estudio (Geneser F, 2008; Martín Lacave I y García Caballero T, 2012).

### Técnica experimental

Para los estudios histopatológicos y de inmunohistoquímica se utilizó un *set* diferente de animales (n=4, para cada uno de los cinco grupos experimentales analizados). Los riñones de las ratas Sham y OUB fueron perfundidos por medio de una cánula introducida en la aorta abdominal, primero con solución salina por un breve periodo de tiempo, y luego con una solución de periodato-lisina-paraformaldehído (0,01 M NaIO<sub>4</sub>, 0,075 M lisina, 0,0375 M *buffer* fosfato, con 2% paraformaldehído, pH=7,20). Posteriormente se procedió a la extracción y limpieza de los órganos, y se realizaron cortes para obtener muestras de tejido. Las muestras fueron sumergidas en solución de periodato-lisina-paraformaldehído y mantenidas a 4°C durante toda la noche. Finalmente se realizó la inclusión en parafina.

Se tomaron cortes con micrótopo, de 4 µm de espesor. Luego de deparafinar las láminas, algunas de ellas se procesaron para la tinción de rutina con hematoxilina-eosina. Otras fueron empleadas para estudios de inmunohistoquímica con tinción específica para Oat5, NaDC1 y Oatp1. Para esto, las láminas fueron incubadas con 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 15 minutos (para eliminar la actividad peroxidasa endógena) y luego con solución de bloqueo por 30 minutos. Posteriormente, se realizó la incubación con los anticuerpos policlonales no comerciales anti-Oat5 (dilución 1:100) y anti-NaDC1 (dilución 1:50) y con el anticuerpo policlonal comercial anti-Oatp1 (dilución 1:50), a 4°C durante toda la noche. Las muestras fueron lavadas con PBST

y luego incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpo secundario contra inmunoglobulina de conejo, asociado a peroxidasa de rabanito (HRP). Para detectar la tinción se utilizó como sustrato de la peroxidasa a la diaminobencidina (0,05% diaminobencidina en PBST con 0,05% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Posteriormente, se realizó la contra-tinción con hematoxilina y finalmente las láminas fueron montadas, para su posterior examen por microscopía convencional.

A partir de los cortes teñidos con la tinción de rutina con hematoxilina-eosina, se evaluó la aparición de lesión tubular en el tejido renal. La gravedad de la lesión se consideró como el porcentaje de los túbulos que mostraban una alteración tubular determinada (dilatación tubular, pérdida del borde en cepillo, desprendimiento celular, residuos celulares y fibrosis) y se clasificó de la siguiente manera: 0, menos del 5%; 1, 5-33%; 2, 34-66% y 3, más del 66%, como se describió anteriormente (Stoyanoff TR *et al.*, 2014; Hazelhoff MH *et al.*, 2018). Para lograrlo, un observador ciego, que desconocía los grupos experimentales, examinó diez campos/secciones en cada preparado en alta resolución (400X).

### **3.7.2 Preparación de homogenados y obtención de membranas apicales de células de riñón**

Los procesos de reabsorción y secreción de compuestos orgánicos cargados ocurren principalmente a nivel de los túbulos proximales renales. Las células epiteliales de estos túbulos cuentan con una serie de sistemas de transporte distribuidos asimétricamente sobre toda la superficie de la membrana, los cuales a su vez permiten diferenciar un dominio apical de otro basolateral, con características morfológicas, físicas y de composición química claramente definidas.

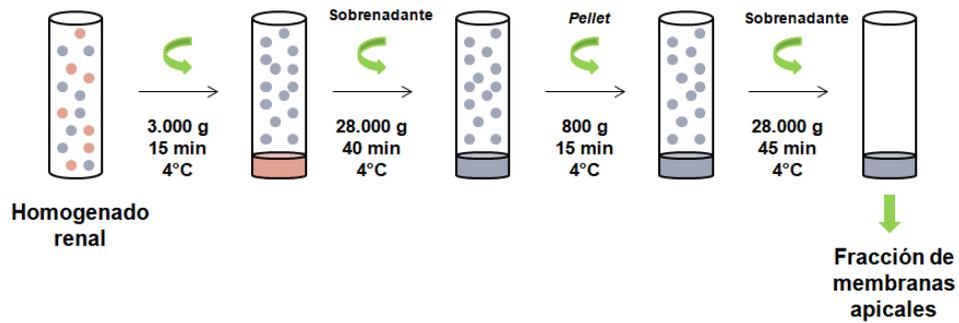
Para estudiar la expresión tisular de proteínas transportadoras, tales como Oat5, NaDC1 y Oatp1, es necesario contar con un método de aislamiento que permita separar las membranas plasmáticas apicales o basolaterales del resto de los componentes celulares. El primer paso en cualquier método de separación consiste en la homogeneización de los tejidos. En un homogeneizador, que puede tener la forma de un cilindro de vidrio, se colocan pequeños trozos del tejido junto con una solución *buffer* adecuada, mantenida a baja temperatura (4°C), para preservar la integridad de las organelas. Posteriormente, mediante la acción de una varilla de teflón que rota a gran velocidad, los trozos de tejidos son aplastados contra las paredes del cilindro por la fricción de la varilla. Así se rompen las membranas celulares y quedan libres en la solución las organelas y los distintos componentes celulares.

La separación propiamente dicha se realiza luego por centrifugación diferencial. Debido a las diferencias en tamaño y densidad, cada componente celular presenta un coeficiente de sedimentación particular, el cual aumenta en función de la masa y el volumen de las partículas. Después de unos minutos de reposo, el homogenado es centrifugado primero a velocidades moderadas y luego repetidas veces a velocidades crecientes, sedimentándolo progresivamente en partículas más pequeñas y obteniendo así las distintas fracciones subcelulares, entre ellas las fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas (Evans WH, 1987).

### Técnica experimental

Se prepararon homogenados totales de riñón de ratas Sham y OUB. Para ello, los riñones extraídos fueron decapsulados, lavados con solución salina (9 g/L) a 4°C y pesados. Posteriormente el tejido fue cortado y homogeneizado en un *buffer* a 4°C constituido por manitol 50 mM, EGTA 5 mM, Tris HCl 2 mM (pH=7,10), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM, en una proporción de 100 mL de *buffer* cada 30 g de tejido renal. Este proceso se realizó empleando un homogeneizador Glas-Col por 5 minutos a máxima velocidad. Cada preparación representa el tejido renal de un animal. Se realizaron cuatro preparaciones diferentes para cada grupo experimental. De las preparaciones obtenidas se separaron alícuotas, para determinar la concentración de proteínas (ver ítem 3.6.9 de este capítulo) y para los estudios de expresión. Las alícuotas fueron almacenadas a -80°C hasta su uso.

Las membranas apicales fueron obtenidas a partir de los homogenados totales de riñón por precipitación con Mg/EGTA, como se describió previamente (Severin MJ *et al.*, 2016, 2019; Hazelhoff MH *et al.*, 2018). A los homogenados totales se les agregó MgCl<sub>2</sub> en una concentración final de 12 mM y se dejó agitando en frío durante 15 minutos. Se realizó la primera centrifugación a 3.000 g por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido fue separado delicadamente y centrifugado luego a 28.000 g por 40 minutos a 4°C. El *pellet* formado en este paso se encuentra altamente enriquecido en membranas apicales. El mismo fue resuspendido en un *buffer* “experimento” compuesto por manitol 50 mM, Hepes Tris 10 mM (pH=7,50) y PMSF 1 mM y centrifugado nuevamente a 800 g por 15 minutos a 4°C. Por último, el sobrenadante, se centrifugó una vez más a 28.000 g por 45 minutos a 4°C, y los *pellets* conseguidos se resuspendieron en el *buffer* “experimento”, siendo los mismos representativos de muestras puras de membranas apicales renales (**Figura 3.3**). De cada preparación se tomaron alícuotas para la determinación de proteínas (ver ítem 3.6.9 de este apartado) y para los estudios de expresión. Las alícuotas fueron almacenadas a -80°C hasta ser utilizadas.



**Figura 3.3:** Esquema de obtención de las fracciones de membranas apicales renales.

### 3.8 Electroforesis y *Western blotting*

El *Western blotting* es una técnica analítica ampliamente aceptada que se utiliza para detectar proteínas específicas a partir de una muestra compleja. El primer paso del procedimiento consiste en separar las macromoléculas mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y dodecil sulfato de sodio (SDS), en un sistema conocido como SDS-PAGE. El SDS es un detergente que desnaturaliza las proteínas y forma una micela cargada negativamente alrededor de ellas, haciendo que la carga de la molécula se vuelva relativa a su tamaño. Al aplicar un campo eléctrico sobre el gel, las moléculas cargadas negativamente se mueven hacia el electrodo positivo atravesando el entramado poroso, y se separan sólo en función de su tamaño (Mahmood T y Yang PC, 2012).

Después de la electroforesis, las proteínas se transfieren a una membrana de soporte sólido (generalmente nitrocelulosa o difluoruro de polivinilideno), donde se tiñen con anticuerpos específicos. Con el fin de prevenir la unión inespecífica de los anticuerpos, la membrana se trata previamente con una sustancia como leche descremada, seroalbúmina bovina o caseína, que bloquea los sitios residuales inespecíficos de la superficie. La membrana bloqueada se incuba con el anticuerpo primario y posteriormente con el anticuerpo secundario, el cual está marcado con un sistema reportero específico. Los sistemas de detección del complejo proteína-anticuerpo primario-anticuerpo secundario son variados, y se basan generalmente en una enzima que cataliza una reacción fácilmente detectable, una molécula fluorescente o un radioisótopo. Cualquiera que sea el sistema que se use, la intensidad de la señal se correlaciona con la abundancia del antígeno en la membrana (Mahmood T y Yang PC, 2012).

La técnica de *Western blotting* permite detectar concentraciones de proteínas tan bajas como 1 ng, debido a la alta resolución de la electroforesis en gel y a la alta especificidad y sensibilidad del inmunoensayo (Mahmood T y Yang PC, 2012).

### Técnica experimental

Las muestras de orina (10  $\mu$ L), homogenados (20  $\mu$ g de proteína) y membranas apicales renales (16  $\mu$ g de proteína) de ratas Sham y OUB, fueron calentadas a 100°C por 3 minutos en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol 1% y SDS 2%. Las muestras se sembraron en un gel de SDS-poliacrilamida al 8,5% o 12% (según la proteína a detectar), se separaron por electroforesis y luego fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa por electrotransferencia durante 1 hora. Para verificar la igual carga y transferencia de las proteínas, las membranas se tiñeron con el colorante Rojo Ponceau, según lo descrito previamente (Romero-Calvo I *et al.*, 2010; Bulacio RP *et al.*, 2015; Severin MJ *et al.*, 2016, 2019). A continuación, se incubaron durante 1 hora con una solución de leche en polvo descremada al 5% en PBST (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 80 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 100 mM, Tween 20 0,1% (pH=7,50)). Después de realizar 4 lavados con PBST, las membranas fueron incubadas durante toda la noche, a 4°C, con el anticuerpo primario correspondiente: anticuerpo policlonal no comercial de conejo anti-Oat5 de rata (dilución 1:800), anticuerpo policlonal no comercial de conejo anti-NaDC1 de rata (dilución 1:1.000), anticuerpo policlonal comercial de conejo anti-Oatp1 de rata (dilución 1:800) ó anticuerpo monoclonal comercial de ratón anti-NGAL de rata (dilución 1:800). La especificidad de los anticuerpos Oat5 y NaDC1 ha sido descrita previamente (Sekine T *et al.*, 1998; Anzai N *et al.*, 2005). Luego de cuatro lavados más con PBST, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario de cabra anti-inmunoglobulina de conejo ligado a peroxidasa ó con el anticuerpo secundario de oveja anti-inmunoglobulina de ratón ligado a peroxidasa, con agitación durante 1 hora a temperatura ambiente.

Por último, luego de lavados consecutivos con PBST y PBS, las bandas de Oat5, NaDC1, Oatp1 y NGAL fueron detectadas por quimioluminiscencia empleando un kit comercial (ECL enhanced chemiluminescence system, Pierce, Thermo Fisher Scientific, USA). La intensidad de las bandas obtenidas se analizó por densitometría empleando un *software* comercial y el resultado se expresó en unidades arbitrarias.

Para el análisis densitométrico de los *immunoblots*, las muestras de las ratas Sham y OUB fueron corridas en cada gel. Los niveles de Oat5, NaDC1, Oatp1 y NGAL en las muestras de los animales OUB se calcularon como porcentaje del valor promedio del grupo Sham para ese gel,

usando el *software* GelPro Analyzer (Gel-Pro Analyzer™; Media Cybernetics, Maryland, USA). En las muestras de orina, la abundancia de las proteínas se normalizó según los niveles urinarios de creatinina, como fuera descrito previamente (Bartoli F *et al.*, 2011; Bulacio RP *et al.*, 2015; Severin MJ *et al.*, 2016, 2019). En los casos en donde no se detectó banda inmunoreactiva en las muestras Sham (Oatp1 en orina) un segundo experimento de *Western blotting* fue diseñado, con el fin de poder estimar los niveles relativos de la proteína en los diferentes grupos experimentales y compararlos entre sí. En estos casos, las muestras de orina de los animales OUB fueron sembradas junto con una muestra de referencia interna de membranas apicales renales de animales Sham, a fin de contar con un valor al cual considerar como 100%.

### 3.9 Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el *software* GraphPad (Versión 6, San Diego, C.A., U.S.A.). Se realizó un análisis de t-Student desapareado cuando se compararon dos grupos experimentales. A fin de comparar más de dos grupos se empleó el test ANOVA plus *Newman-Keuls*. Para evaluar la correlación entre NaDC1<sub>u</sub> y el tiempo de obstrucción se realizó una regresión no lineal ajustada a la ecuación de Michaelis-Menten y se calculó un coeficiente de correlación de ( $r^2$ ). Los valores considerados significativos fueron aquellos con p menores a 0,05. Los resultados fueron expresados como “media ± error estándar” (SE).

### 3.10 Materiales

Los reactivos utilizados en los experimentos fueron adquiridos de la empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo., U.S.A.), de calidad analítica pura. Los anticuerpos policlonales no comerciales de conejo anti-Oat5 de rata y de conejo anti-NaDC1 de rata fueron gentilmente donados por el Prof. Anzai (Department of Pharmacology, Graduate School of Medicine, Chiba University, Japan). El anticuerpo policlonal comercial de conejo anti-Oatp1 de rata fue adquirido de Alpha Diagnostic International, San Antonio, U.S.A. El anticuerpo monoclonal comercial de ratón anti-NGAL de rata fue adquirido de Thermo Fisher Scientific, Rockford, I.L., U.S.A. Anticuerpos secundarios: el anticuerpo secundario de cabra anti-inmunoglobulina de conejo ligado a peroxidasa fue adquirido de Laboratorios Bio-Rad, Hercules, C.A., U.S.A.; el anticuerpo secundario de oveja anti-inmunoglobulina de ratón ligado a peroxidasa fue adquirido de Laboratorios GE Healthcare-Life Sciences, Marlborough, Massachusetts, U.S.A. El marcador de peso molecular de proteínas fue adquirido de Laboratorios Bio-Rad, Hercules, C.A., U.S.A.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Caracterización del modelo experimental de nefropatía obstructiva

El modelo quirúrgico de **obstrucción ureteral bilateral (OUB)**, es considerado apropiado para el estudio de la fisiopatología de la enfermedad renal obstructiva y ha sido empleado previamente por diversos autores (Villar SR *et al.*, 2004, 2005, 2008; Di Giusto G y Torres AM, 2009; Stødkilde L *et al.*, 2011). En el presente trabajo de Tesis, se comenzó trabajando con dos grupos experimentales, uno de animales sujetos a 24 horas de OUB (OUB24) y otro de animales a los cuales se les practicó una cirugía simulada (Sham). Los resultados que se presentan a continuación se obtuvieron 24 horas después de liberar dicha obstrucción o de realizar su simulación.

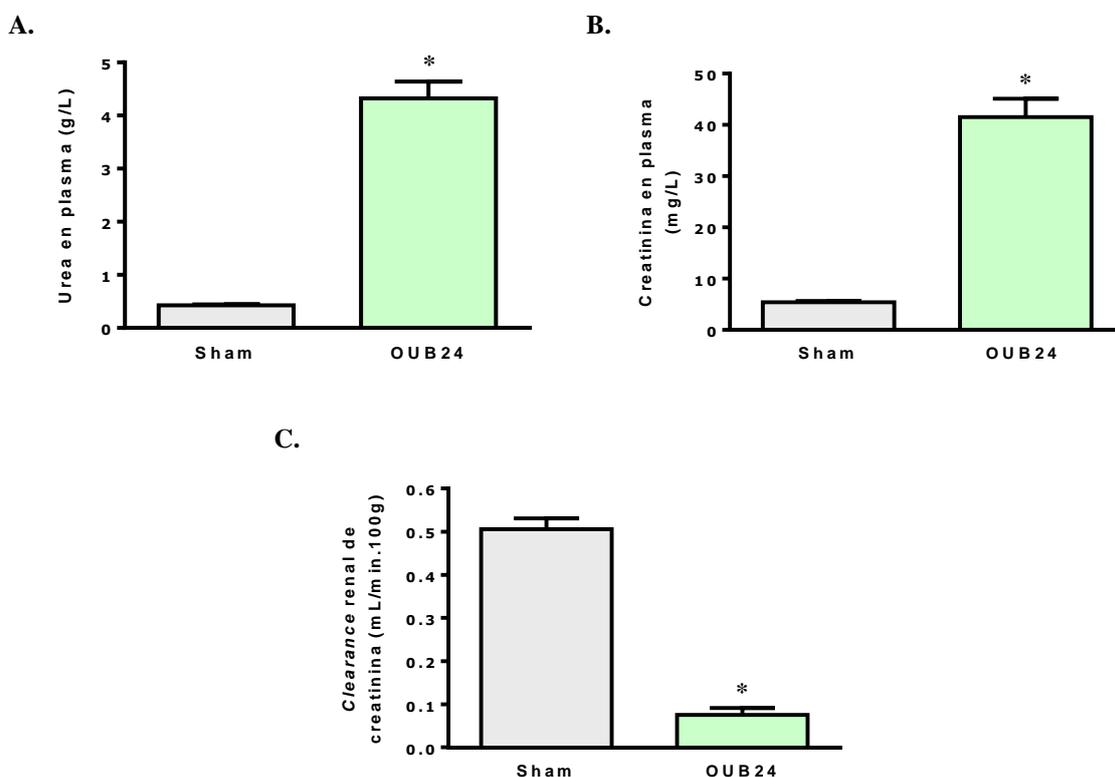
La **Tabla 4.1** muestra los datos de la disminución de peso corporal, el peso renal (Pr), la relación peso renal/peso corporal (Pr/PC) y el flujo urinario ( $U_f$ ) de los grupos Sham y OUB24. En todos los parámetros evaluados observamos un incremento significativo en los animales OUB24 respecto del grupo Sham. El aumento del peso renal y de la relación peso renal/peso corporal ya ha sido descrita previamente (Villar SR *et al.*, 2004, 2005, 2008) y respondería al cuadro de hidronefrosis que acontece luego de una obstrucción completa de los uréteres. El aumento del flujo urinario también es una consecuencia característica en este modelo experimental, dado que se conoce que el impedimento a la salida del flujo urinario ocasiona posteriormente un desbalance en el manejo renal de agua y electrolitos y una alteración en la capacidad del riñón de concentrar la orina, lo cual explica el incremento en la diuresis (Stødkilde L *et al.*, 2011; Lucarelli G *et al.*, 2014). Además, el aumento de la diuresis podría explicar también la disminución de peso corporal registrada en los animales OUB24.

**Tabla 4.1:** Disminución de peso corporal (PC), peso renal (Pr), relación peso renal/peso corporal (Pr/PC), y flujo urinario ( $U_f$   $\mu\text{L}/\text{min} \cdot 100\text{g}$ ) en ratas Sham y OUB24. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error estándar (SE). (\*)  $p < 0,05$ .

	Sham (n=4)	OUB24 (n=6)
<b>Disminución PC (%)</b>	5,35 $\pm$ 0,05	9,27 $\pm$ 1,04 *
<b>Pr (g)</b>	2,29 $\pm$ 0,04	3,30 $\pm$ 0,11 *
<b>Pr/PC (<math>\times 10^{-3}</math>)</b>	6,56 $\pm$ 0,19	9,41 $\pm$ 0,38 *
<b><math>U_f</math> (<math>\mu\text{L}/\text{min} \cdot 100\text{g}</math>)</b>	2,82 $\pm$ 0,41	6,80 $\pm$ 1,08 *

La determinación de los niveles plasmáticos de urea y creatinina son exámenes de rutina que se realizan a menudo cuando se pretende evaluar la función de los riñones. La urea es una sustancia producida por el hígado, resultante de la digestión de las proteínas y que se excreta por la orina; mientras que, la creatinina, es un metabolito de desecho proveniente de la actividad muscular, producido y eliminado de forma constante a través de los riñones. En conjunto, valores elevados de estos compuestos en sangre son indicativos de alteraciones en la función renal (Bellomo R *et al.*, 2012).

En el presente trabajo de Tesis se analizaron los niveles plasmáticos de urea y creatinina y el *clearance* renal de creatinina, en los animales Sham y OUB24. Como puede observarse en la **Figura 4.1**, los animales OUB24 mostraron un notable y significativo incremento de la urea (**Fig. 4.1A**) y la creatinina (**Fig. 4.1B**), mientras que el *clearance* renal de creatinina (**Fig. 4.1C**) disminuyó significativamente, respecto de los animales Sham.

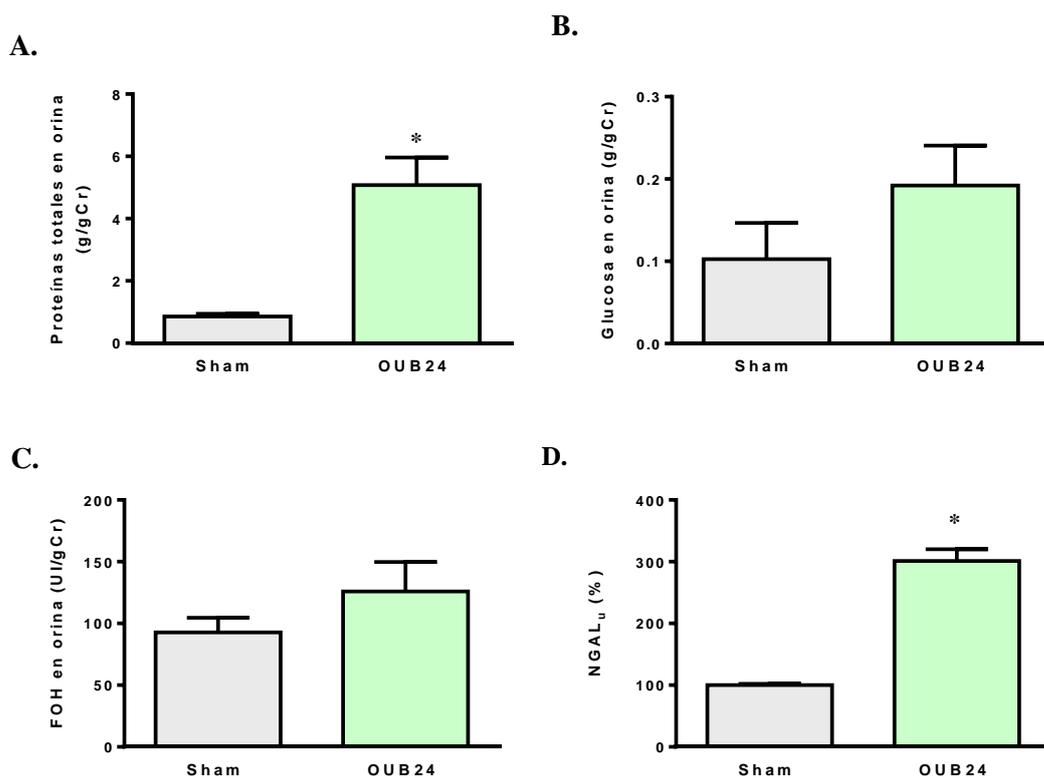


**Figura 4.1:** Niveles plasmáticos de urea (g/L) (A) y de creatinina (mg/L) (B), y *clearance* renal de creatinina (mL/min.100g) (C) en ratas Sham (n=4) y OUB24 (n=6). Cada valor representa la media  $\pm$  error estándar (SE); (\*)  $p < 0,05$ .

A continuación, se evaluaron otros parámetros indicadores de daño renal en orina, como proteínas, glucosa y actividad de fosfatasa alcalina. Además se evaluó la excreción urinaria de la Lipocalina de Neutrófilos Asociada a Gelatinasa (NGAL<sub>u</sub>). NGAL es una proteína pequeña de 25 kDa que pertenece a la familia de las lipocalinas, y su presencia en la orina ha sido descrita

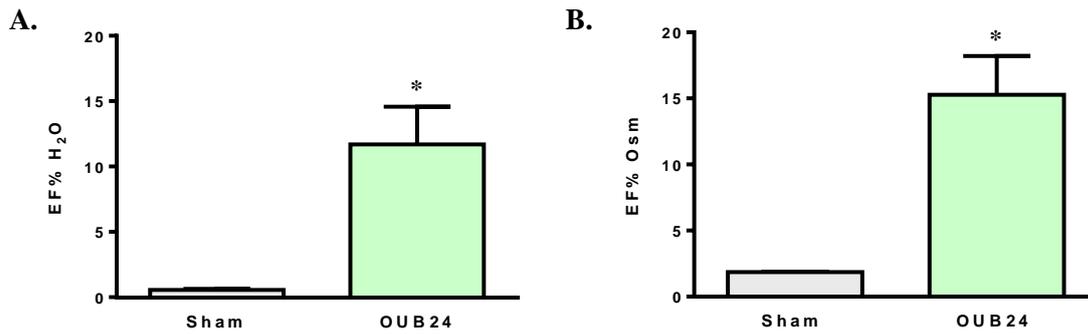
como un biomarcador temprano de lesión renal aguda de diferentes etiologías, inclusive en el contexto de la nefropatía obstructiva (Urbschat A *et al.*, 2014; Huang HF *et al.*, 2017).

Los resultados se muestran en la **Figura 4.2**. Los niveles urinarios de proteínas totales (**Fig. 4.2A**) aumentaron significativamente en los animales OUB24 respecto de los animales Sham, mientras que la glucosa (**Fig. 4.2B**), y la actividad de fosfatasa alcalina en orina (**Fig. 4.2C**) no presentaron alteraciones significativamente evidentes. Por su parte, la  $NGAL_u$  aumentó significativamente en el grupo OUB24 en comparación con los animales Sham (**Fig. 4.2D**).



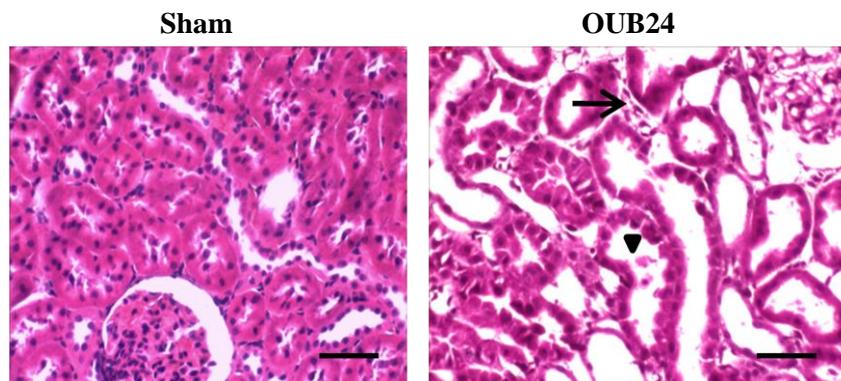
**Figura 4.2:** Niveles urinarios de proteínas totales (g/gCr) (A), glucosa (g/gCr) (B), actividad de fosfatasa alcalina en orina (FOH, UI/gCr) (C), y excreción urinaria de NGAL ( $NGAL_u$ , %) (D), normalizados a los valores de creatinina (Cr) urinaria en ratas Sham (n=4) y OUB24 (n=6). Cada valor representa la media  $\pm$  error estándar (SE); (\*)  $p < 0,05$ .

En paralelo, se evaluaron las excreciones fraccionales de agua y de osmoles. Se sabe que la “diuresis postobstructiva” es uno de los principales síndromes observados luego de la obstrucción bilateral de uréteres, y está caracterizada por un notable incremento del volumen urinario en conjunto con la disminución de la osmolaridad de la orina (Stødkilde L *et al.*, 2011; Lucarelli G *et al.*, 2014). En la **Figura 4.3** se muestran los resultados obtenidos. Tanto la excreción fraccional de agua (**Fig. 4.3A**) como la de osmoles (**Fig. 4.3B**) mostraron aumentos significativos en el grupo OUB24.



**Figura 4.3:** Excreciones fraccionales de agua (EF% H<sub>2</sub>O) (A) y de osmoles (EF% Osm) (B) en ratas Sham (n=4) y OUB24 (n=6). Cada valor representa la media ± error estándar (SE); (\*) p<0,05.

También, se realizaron estudios de histopatología en el tejido renal de ambos grupos experimentales, mediante la tinción de rutina con hematoxilina-eosina. Como se puede observar en la **Figura 4.4**, el grupo OUB24 presentó una marcada dilatación tubular, fibrosis intersticial (flecha) y descamación celular (cabeza de flecha). Estas alteraciones morfológicas coinciden con las descritas previamente para el modelo de OUB (Villar SR *et al.*, 2004, 2005, 2008; Stødkilde L *et al.*, 2011).



**Figura 4.4:** Cortes histológicos de tejido renal de ratas Sham (n=4) y OUB24 (n=4), coloreados con hematoxilina-eosina. En OUB24 se observa una marcada dilatación tubular, áreas de fibrosis intersticial (flecha) y descamación celular (cabeza de flecha). Magnificación 200X. Barra: 40 μm.

Los resultados expuestos en esta sección permitieron verificar el cuadro de daño renal obstructivo en el grupo OUB24 mediante el aumento en los niveles plasmáticos de urea y creatinina, la disminución del clearance renal de creatinina y las alteraciones histológicas descritas. Asimismo, otros parámetros evaluados como la NGAL<sub>ur</sub>, las proteínas totales en orina y las excreciones fraccionales de agua y osmoles presentaron alteraciones en este grupo experimental. Estos resultados coinciden con lo previamente descrito para este modelo de nefropatía obstructiva (Villar SR et al., 2004, 2005, 2008; Stødkilde L et al., 2011).

Considerando que el objetivo principal del presente trabajo de Tesis es evaluar el potencial de diferentes proteínas renales como biomarcadores tempranos de daño renal obstructivo, se decidió continuar los estudios agregando tres grupos experimentales de ratas con obstrucción de uréteres de más corta duración (OUB1, OUB2 y OUB5), tal como se describe en el ítem 3.2 de la sección “Materiales y Métodos”.

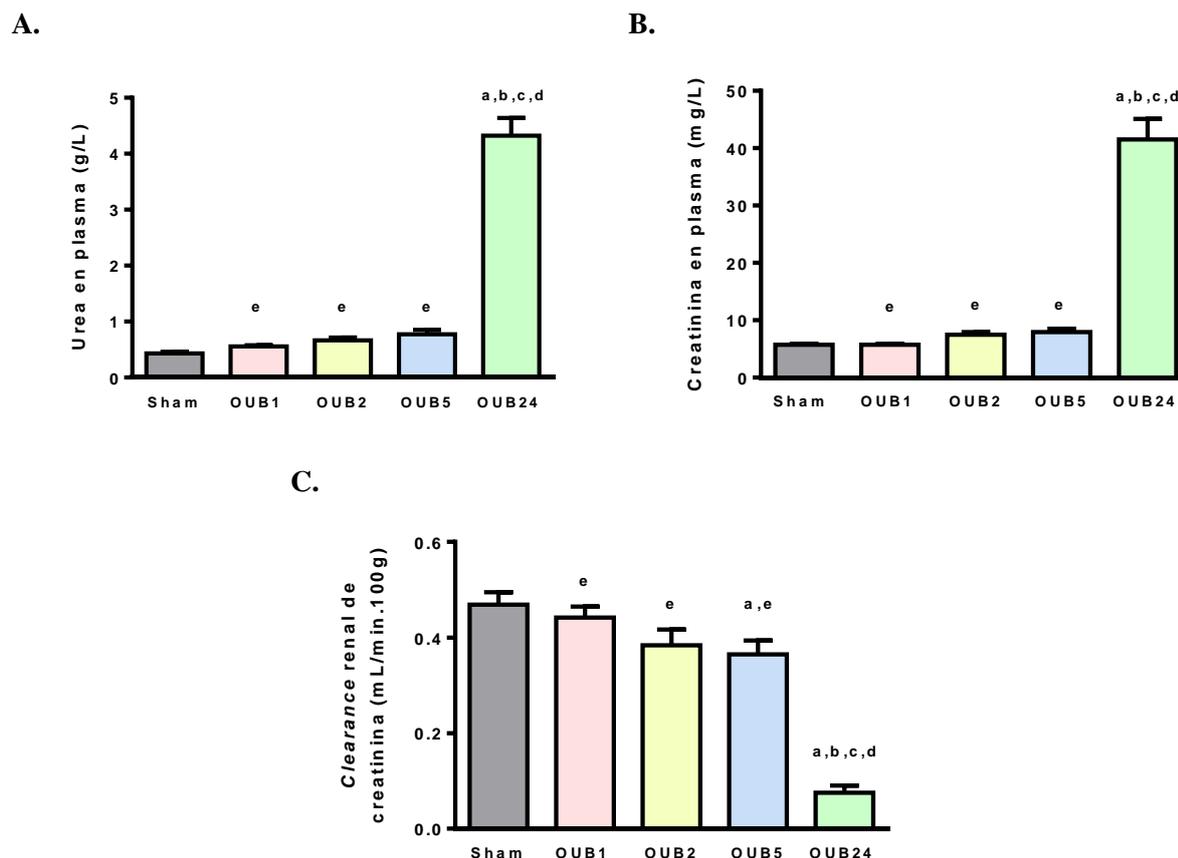
## 4.2 Evaluación de la función renal en ratas con nefropatía obstructiva de diferente periodo de evolución

En la **Tabla 4.2** se presentan los datos de la disminución de peso corporal (PC), el peso renal (Pr), la relación peso renal/peso corporal (Pr/PC) y el flujo urinario ( $U_f$ ) de los grupos Sham, OUB1, OUB2, OUB5 y OUB24. Para facilitar el análisis de los resultados, se trabajó con un grupo Sham unificado (grupo Sham, n=11), conformado por los animales Sham correspondientes a cada grupo OUB, luego de corroborar que entre ellos no existían diferencias significativas en las variables de estudio. El peso corporal disminuyó significativamente en los animales OUB24, mientras que el peso renal y el flujo urinario aumentaron significativamente en los animales OUB5 y OUB24. Estas variaciones se ven reflejadas en el aumento de la relación peso renal/peso corporal, lo cual podría asociarse a la hidronefrosis propia de los riñones obstruidos.

**Tabla 4.2:** Disminución de peso corporal (PC), peso renal (Pr), relación peso renal/peso corporal (Pr/PC) y flujo urinario ( $U_f$ ,  $\mu\text{L}/\text{min} \cdot 100\text{g}$ ) en ratas Sham, OUB1, OUB2, OUB5 y OUB24. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error estándar (SE). <sup>a</sup>  $p < 0,05$  vs. Sham; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  vs. OUB1; <sup>c</sup>  $p < 0,05$  vs. OUB2; <sup>d</sup>  $p < 0,05$  vs. OUB5; <sup>e</sup>  $p < 0,05$  vs. OUB24.

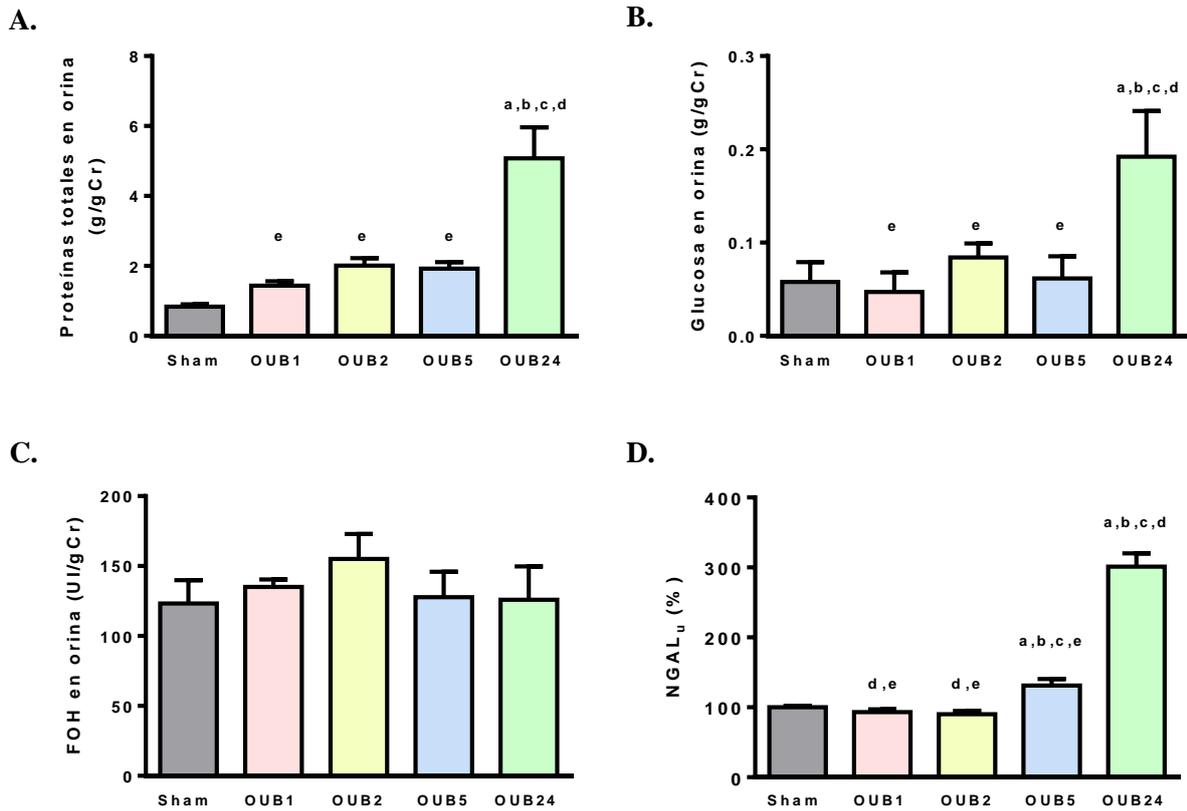
	Sham (n=11)	OUB1 (n=5)	OUB2 (n=7)	OUB5 (n=6)	OUB24 (n=6)
<b>Disminución PC (%)</b>	6,08 $\pm$ 0,34	5,39 $\pm$ 0,48 <sup>e</sup>	6,08 $\pm$ 0,56 <sup>e</sup>	6,46 $\pm$ 0,24 <sup>e</sup>	9,27 $\pm$ 1,04 <sup>a,b,c,d</sup>
<b>Pr (g)</b>	2,30 $\pm$ 0,03	2,39 $\pm$ 0,07 <sup>e</sup>	2,44 $\pm$ 0,06 <sup>e</sup>	2,62 $\pm$ 0,04 <sup>a,e</sup>	3,30 $\pm$ 0,11 <sup>a,b,c,d</sup>
<b>Pr/PC (<math>\times 10^{-3}</math>)</b>	6,56 $\pm$ 0,11	6,72 $\pm$ 0,23 <sup>d,e</sup>	6,69 $\pm$ 0,19 <sup>d,e</sup>	7,60 $\pm$ 0,19 <sup>a,b,c,e</sup>	9,41 $\pm$ 0,38 <sup>a,b,c,d</sup>
<b><math>U_f</math> (<math>\mu\text{L}/\text{min} \cdot 100\text{g}</math>)</b>	2,25 $\pm$ 0,24	3,23 $\pm$ 0,40 <sup>e</sup>	3,20 $\pm$ 0,29 <sup>e</sup>	4,59 $\pm$ 0,33 <sup>a,e</sup>	6,80 $\pm$ 1,08 <sup>a,b,c,d</sup>

Las determinaciones de los niveles plasmáticos de urea y creatinina, y el *clearance* renal de creatinina se muestran en la **Figura 4.5**. Como puede observarse, sólo el grupo OUB24 presentó aumentos significativos en los niveles de urea y creatinina plasmática, respecto del grupo Sham (**Fig. 4.5A y 4.5B**). El *clearance* renal de creatinina disminuyó significativamente en el grupo OUB5, y presentó un descenso más pronunciado en el grupo OUB24 (**Fig. 4.5C**).



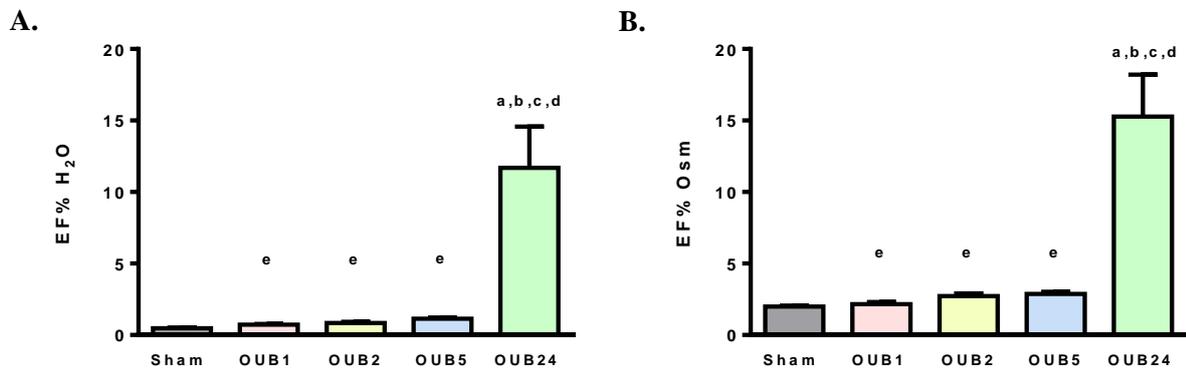
**Figura 4.5:** Niveles plasmáticos de urea (g/L) (A) y de creatinina (mg/L) (B), y *clearance* renal de creatinina (mL/min.100g) (C) en ratas Sham (n=11) y OUB (OUB1, n=5; OUB2, n=7; OUB5, n=6; OUB24, n=6). Cada columna de la gráfica representa la media  $\pm$  error estándar (SE); <sup>a</sup> p<0,05 vs. Sham; <sup>b</sup> p<0,05 vs. OUB1; <sup>c</sup> p<0,05 vs. OUB2; <sup>d</sup> p<0,05 vs. OUB5; <sup>e</sup> p<0,05 vs. OUB24.

A continuación, se midieron los niveles urinarios de proteínas totales, de glucosa, la actividad de fosfatasa alcalina en orina, y la excreción urinaria de NGAL, en los diferentes grupos experimentales (**Figura 4.6**). Los niveles de proteínas y de glucosa en orina aumentaron significativamente en los animales OUB24 (**Fig. 4.6A** y **4.6B**). También se evaluaron los niveles plasmáticos de glucosa, los cuales no evidenciaron diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales. La actividad de fosfatasa alcalina en orina (**Fig. 4.6C**) tampoco presentó alteraciones en los grupos OUB. Por otro lado, la NGAL<sub>u</sub>, aumentó significativamente en los grupos OUB5 y OUB24 respecto del grupo Sham (**Fig. 4.6D**).



**Figura 4.6:** Niveles urinarios de proteínas totales (g/gCr) (A), glucosa (g/gCr) (B), actividad de fosfatasa alcalina en orina (FOH, UI/gCr) (C), y excreción urinaria de NGAL (NGAL<sub>u</sub>, %) (D), normalizados a los valores de creatinina (Cr) urinaria en ratas Sham (n=11) y OUB (OUB1, n=5; OUB2, n=7; OUB5, n=6; OUB24, n=6). Cada columna de la gráfica representa la media  $\pm$  error estándar (SE); <sup>a</sup> p<0,05 vs. Sham; <sup>b</sup> p<0,05 vs. OUB1; <sup>c</sup> p<0,05 vs. OUB2; <sup>d</sup> p<0,05 vs. OUB5; <sup>e</sup> p<0,05 vs. OUB24.

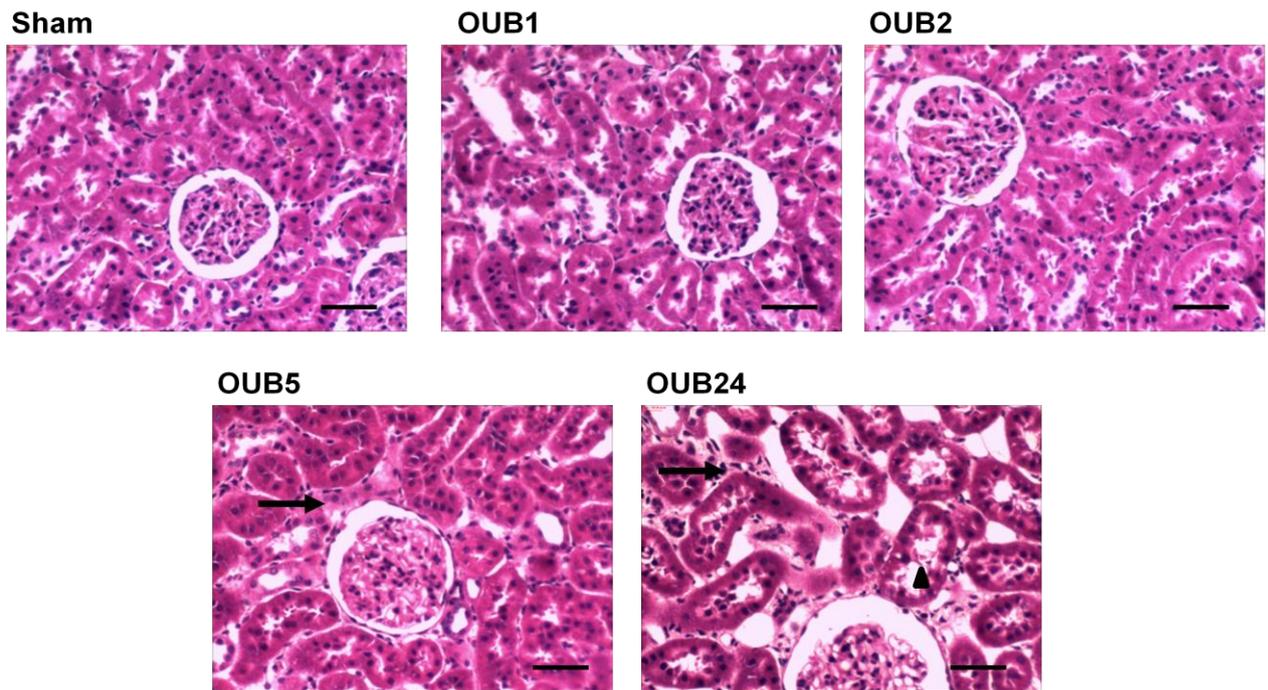
En la **Figura 4.7** se muestran los resultados obtenidos para las excreciones fraccionales de agua y osmoles. Tanto la excreción fraccional de agua (**Fig. 4.7A**) como la de osmoles (**Fig. 4.7B**) mostraron un aumento sólo en el grupo OUB24.



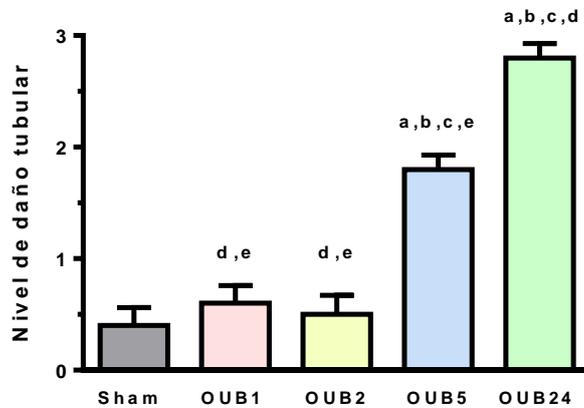
**Figura 4.7:** Excreciones fraccionales de agua (EF% H<sub>2</sub>O) (A) y de osmoles (EF% Osm) (B) en ratas Sham (n=11) y OUB (OUB1, n=5; OUB2, n=7; OUB5, n=6; OUB24, n=6). Cada columna de la gráfica representa la media  $\pm$  error estándar (SE); <sup>a</sup> p<0,05 vs. Sham; <sup>b</sup> p<0,05 vs. OUB1; <sup>c</sup> p<0,05 vs. OUB2; <sup>d</sup> p<0,05 vs. OUB5; <sup>e</sup> p<0,05 vs. OUB24.

Para completar el análisis de la función renal en los animales Sham y en los diferentes grupos OUB, se realizaron estudios histopatológicos en cortes de riñón, mediante tinción con hematoxilina-eosina. Las imágenes obtenidas mostraron fibrosis intersticial y descamación celular en los grupos OUB5 y OUB24, además de una marcada dilatación tubular en OUB24 (*Figura 4.8*). Por otro lado, la cuantificación de las alteraciones mediante el establecimiento de un *score* de daño tubular mostró que las lesiones en la arquitectura renal fueron estadísticamente significativas en los grupos OUB5 y OUB24.

A.



B.



**Figura 4.8:** (A) Cortes histológicos de tejido renal de ratas Sham, OUB1, OUB2, OUB5 y OUB24, coloreados con hematoxilina-eosina (n=4, para cada grupo experimental). En OUB5 y OUB24 se observan áreas de fibrosis intersticial (flecha) y descamación celular (cabeza de flecha). Nótese la marcada dilatación tubular en OUB24. Estas

imágenes son representativas de muestras de cuatro animales para cada grupo experimental. Magnificación 200X. Barra: 40  $\mu$ m. **(B)** Cuantificación de la lesión tubular en cortes renales. La puntuación varía de 0 para una histología completamente normal a 3 para una lesión máxima y generalizada. Las alteraciones tubulares (por ejemplo, dilatación tubular, pérdida del borde en cepillo, desprendimiento celular y fibrosis) se clasificaron de la siguiente manera: 0, menos del 5%; 1, 5–33%; 2, 34–66% y 3, más del 66%. Cada columna de la gráfica representa la media  $\pm$  error estándar (SE); <sup>a</sup> p<0,05 vs. Sham; <sup>b</sup> p<0,05 vs. OUB1; <sup>c</sup> p<0,05 vs. OUB2; <sup>d</sup> p<0,05 vs. OUB5; <sup>e</sup> p<0,05 vs. OUB24.

*En esta sección del trabajo de Tesis se profundizó en la fisiopatología de la enfermedad renal obstructiva analizando las alteraciones ocurridas luego de diferentes periodos de tiempo de obstrucción de uréteres. Particularmente, se trabajó con grupos de animales sujetos a periodos cortos (1, 2 o 5 horas) o periodos más prolongados (24 horas) de obstrucción ureteral. Las alteraciones observadas en los parámetros tradicionales de función renal, y aquellas evidenciadas en otros marcadores de lesión renal, como la excreción urinaria de NGAL, permitieron constatar la instauración del cuadro de nefropatía obstructiva sólo en los animales sujetos a 5 y 24 horas de obstrucción de uréteres (OUB5 y OUB24). Los estudios histológicos realizados acompañaron estos resultados, mostrando marcadas alteraciones en la arquitectura renal de estos dos grupos experimentales.*

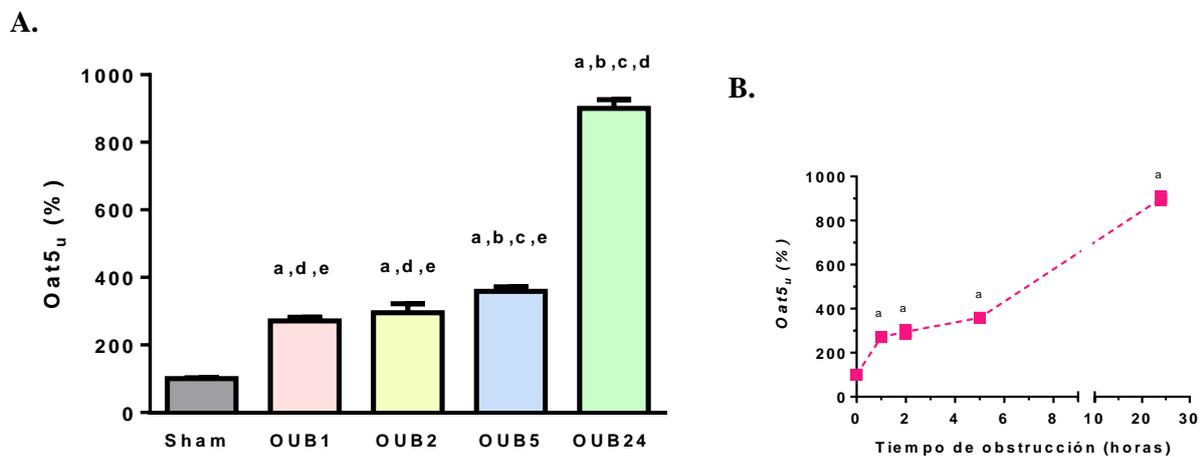
*A continuación, se procedió a evaluar la excreción urinaria de tres proteínas, transportadoras de aniones orgánicos en células renales, con el objetivo de determinar su potencialidad como biomarcadores tempranos de daño renal obstructivo: el **Transportador de aniones orgánicos 5 (Oat5)**, el **Cotransportador Na<sup>+</sup>/Dicarboxilatos 1 (NaDC1)** y el **Polipéptido transportador de aniones orgánicos 1 (Oatp1)**.*

### 4.3 Excreción urinaria y expresión renal del Transportador de aniones orgánicos 5 (Oat5) en ratas con nefropatía obstructiva

#### 4.3.1 Excreción urinaria de Oat5 en ratas con nefropatía obstructiva

La determinación de la excreción urinaria de la proteína Oat5 (Oat5<sub>u</sub>) se llevó a cabo mediante la técnica de electroforesis y *Western blotting*, tal como se describe en el ítem 3.8 del capítulo “Materiales y Métodos”, empleando para ello un anticuerpo policlonal no comercial anti-Oat5.

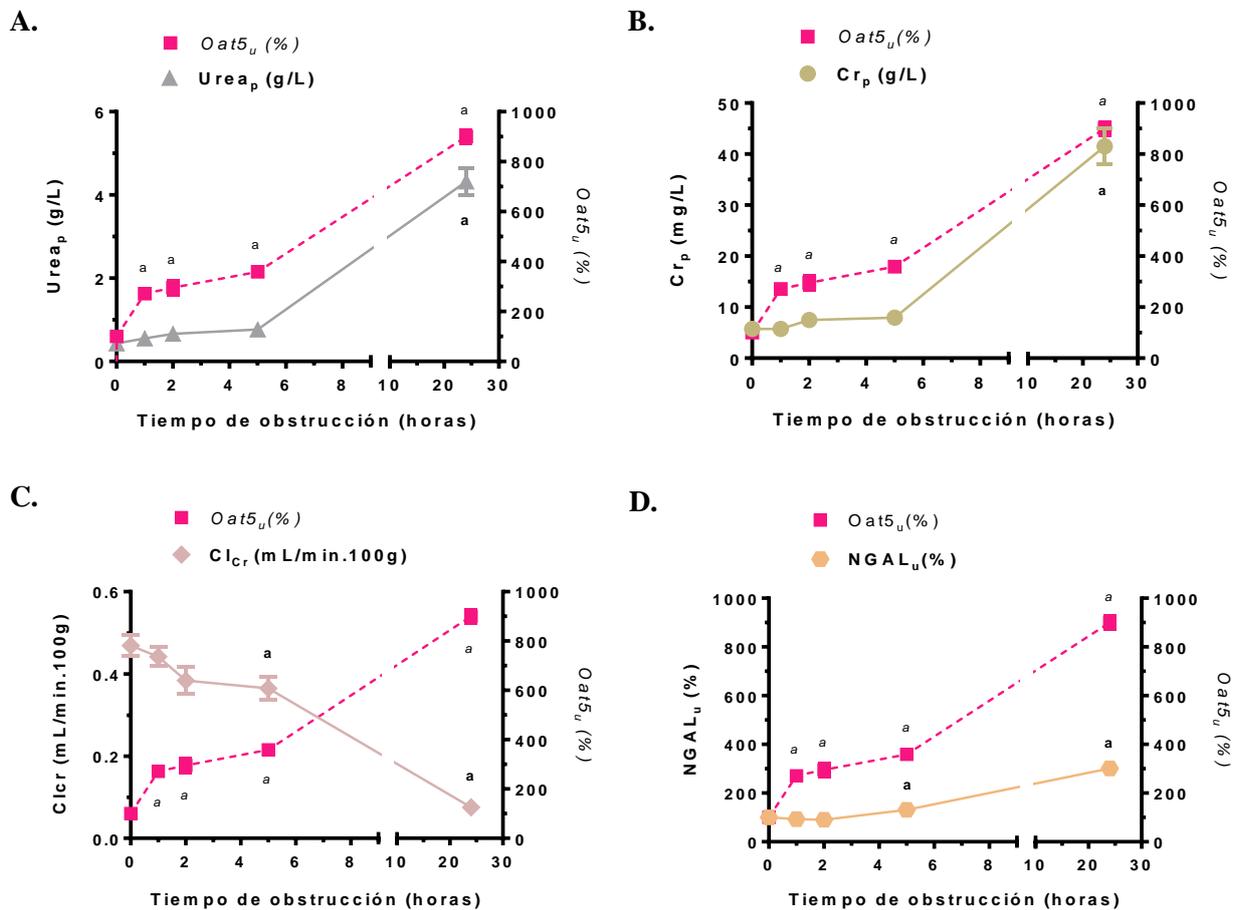
Se detectó una banda inmunoreactiva de aproximadamente 72 kDa en las muestras de orina de todos los grupos experimentales. Dichas bandas fueron analizadas por densitometría y el resultado obtenido, expresado en unidades arbitrarias, se normalizó según los niveles urinarios de creatinina de cada muestra, tal como se ha descrito previamente para otros biomarcadores en orina. En la **Figura 4.9** se muestran los resultados obtenidos. La excreción urinaria de Oat5 aumentó significativamente en todos los grupos experimentales, respecto de lo observado en el grupo Sham. Los incrementos hallados fueron del 271, 295, 359 y 900% para los grupos OUB1, OUB2, OUB5 y OUB24, respectivamente, con respecto al valor Sham (considerado como 100%).



**Figura 4.9:** Excreción urinaria de Oat5 para los grupos Sham (n=11) y OUB (OUB1, n=5; OUB2, n=7; OUB5, n=6; OUB24, n=6). El análisis densitométrico de las bandas inmunoreactivas de Oat5 normalizadas según los valores de creatinina en orina se expresó en barras (A) y como línea de tiempo (B). Los resultados se calcularon como porcentajes, considerando el nivel del grupo Sham como el 100%. Cada columna (A) o punto (B) de la gráfica representa la media  $\pm$  error estándar (SE); <sup>a</sup> p<0,05 vs. Sham; <sup>b</sup> p<0,05 vs. OUB1; <sup>c</sup> p<0,05 vs. OUB2; <sup>d</sup> p<0,05 vs. OUB5; <sup>e</sup> p<0,05 vs. OUB24. (En la gráfica B sólo se muestra la diferencia significativa respecto del grupo Sham).

### 4.3.1.1 Comparación de la Oat5<sub>u</sub> con parámetros tradicionales de daño renal

Luego, se comparó la Oat5<sub>u</sub> con algunos de los parámetros tradicionales de daño renal, determinados anteriormente para todos los grupos experimentales. Como puede observarse en la **Figura 4.10**, los niveles plasmáticos de urea (**Fig. 4.10A**) y creatinina (**Fig. 4.10B**) aumentaron significativamente en el grupo OUB24, y el *clearance* renal de creatinina (**Fig. 4.10C**) disminuyó sólo en algunos grupos OUB (OUB5 y OUB24). Por el contrario, la excreción urinaria de Oat5 se incrementó significativamente en las muestras de orina de todos los grupos analizados, incluso en el grupo con periodo de tiempo de obstrucción más corto (OUB1). También, se comparó la Oat5<sub>u</sub> con la excreción urinaria de NGAL. A diferencia de lo que se observó previamente para Oat5<sub>u</sub>, la NGAL<sub>u</sub> aumentó significativamente sólo en los grupos OUB5 y OUB24 (**Fig. 4.10D**).



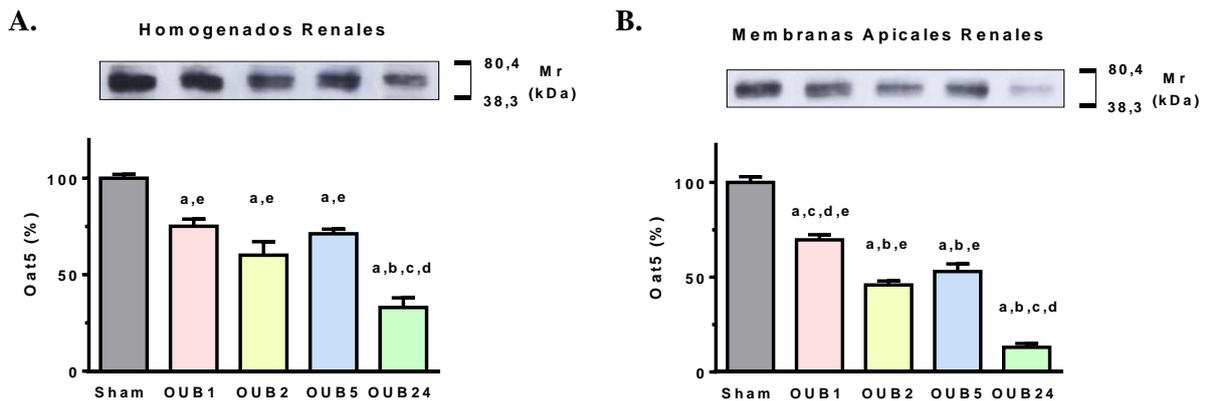
**Figura 4.10:** Comparación de los niveles plasmáticos de urea (Urea<sub>p</sub>) y creatinina (Cr<sub>p</sub>), *clearance* renal de creatinina (Cl<sub>Cr</sub>) y NGAL<sub>u</sub>, con la abundancia urinaria de Oat5 para los grupos Sham (n=11) y OUB (OUB1, n=5; OUB2, n=7; OUB5, n=6; OUB24, n=6). Los niveles plasmáticos de urea (**A**) y creatinina (**B**), el *clearance* de creatinina (**C**) y la NGAL<sub>u</sub> (**D**) se expresan en el eje Y izquierdo con línea continua. La Oat5<sub>u</sub> se expresa en el eje Y derecho con línea discontinua. Cada punto de la gráfica representa la media ± error estándar (SE); a p < 0,05 vs. Sham (se muestra sólo la diferencia significativa respecto del grupo Sham).

### 4.3.2 Expresión renal de Oat5 en ratas con nefropatía obstructiva

#### 4.3.2.1 Evaluación de la expresión renal de Oat5 mediante la técnica de electroforesis y *Western blotting*

A fin de indagar acerca del origen del aumento evidenciado en la excreción urinaria de Oat5, se evaluó la expresión renal de dicho transportador. Se trabajó con muestras de homogenados totales de riñón y de membranas apicales renales aisladas de los diferentes grupos experimentales, empleando la técnica de electroforesis y *Western blotting* (ítem 3.8 del capítulo “Materiales y Métodos”). El uso de un anticuerpo policlonal no comercial anti-Oat5 permitió la detección de una banda inmunoreactiva de 72 kDa, correspondiente a la proteína Oat5, en todos los grupos analizados.

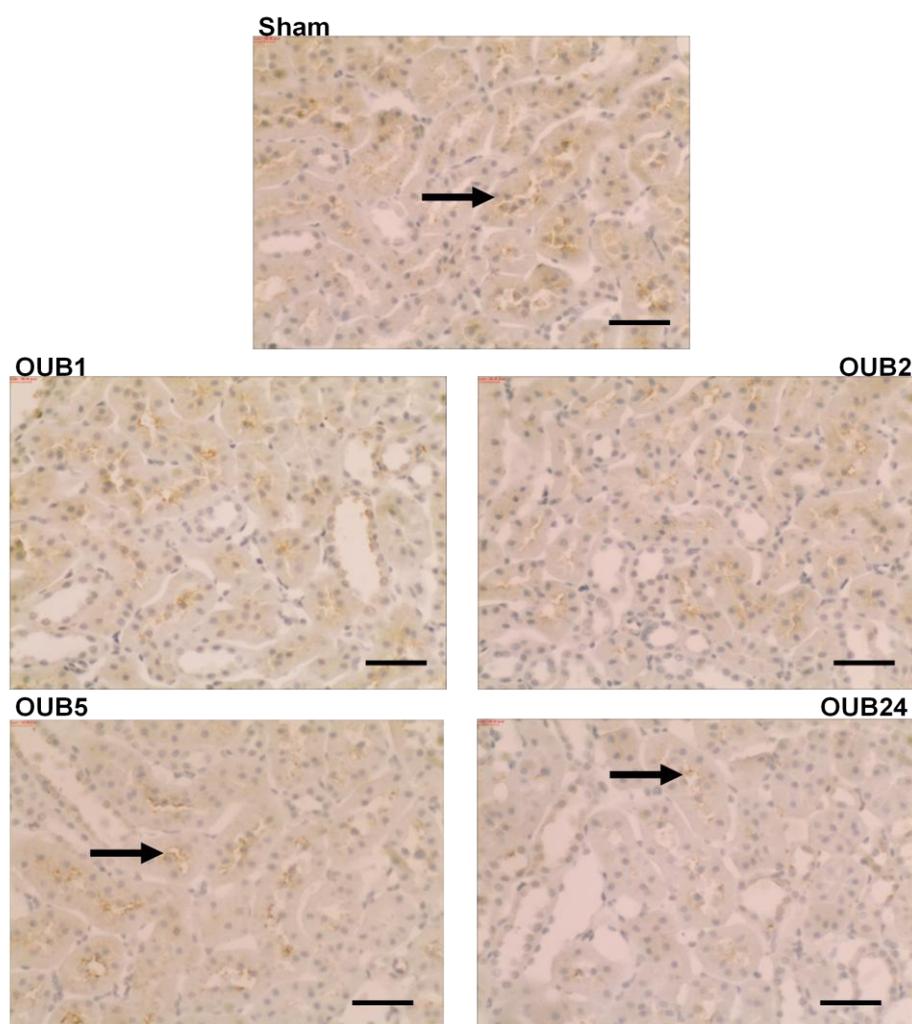
En la **Figura 4.11** se muestran los resultados obtenidos. En la parte superior se muestran las bandas correspondientes a la proteína Oat5 mientras que en la parte inferior se graficó el análisis densitométrico correspondiente. Tanto en los homogenados totales como en las membranas apicales renales se evidenció una disminución en la expresión de Oat5 en todos los grupos OUB. En los homogenados totales (**Fig. 4.11A**), las disminuciones halladas fueron del 25, 40, 29 y 67% para los grupos OUB1, OUB2, OUB5 y OUB24, respectivamente, en comparación con el valor Sham (considerado como 100%). A nivel de las membranas apicales (**Fig. 4.11B**), la expresión de Oat5 disminuyó en un 30, 54, 47 y 87% para los grupos OUB1, OUB2, OUB5 y OUB24, respectivamente.



**Figura 4.11:** Expresión de la proteína Oat5 en muestras de homogenados renales (20  $\mu$ g de proteína) (A) y membranas apicales renales (16  $\mu$ g de proteína) (B) para los grupos Sham (n=11) y OUB (OUB1, n=5; OUB2, n=7; OUB5, n=6; OUB24, n=6). *Parte superior de la figura:* bandas inmunoreactivas correspondientes a la proteína Oat5. A la derecha se indican los estándares de peso molecular (Mr) correspondientes a la albúmina de suero bovino (80,4 kDa) y a la anhidrasa carbónica (38,3 kDa). *Parte inferior de la figura:* análisis densitométrico de Oat5. Los resultados se calcularon como porcentajes, considerando el nivel del grupo Sham como el 100%. Cada columna de la gráfica representa la media  $\pm$  error estándar (SE); <sup>a</sup> p<0,05 vs. Sham; <sup>b</sup> p<0,05 vs. OUB1; <sup>c</sup> p<0,05 vs. OUB2; <sup>d</sup> p<0,05 vs. OUB5; <sup>e</sup> p<0,05 vs. OUB24.

### 4.3.2.2 Evaluación de la expresión renal de Oat5 mediante la técnica de inmunohistoquímica

A fin de corroborar los resultados obtenidos a través de la técnica de *Western blotting*, se analizó la expresión de Oat5 mediante estudios comparativos de inmunohistoquímica en cortes de tejido renal pertenecientes a animales Sham y OUB. Como puede observarse en la **Figura 4.12**, la marcación se localizó a nivel de la membrana apical de las células del túbulo proximal, sitio donde se ha descrito que esta proteína es funcional (Anzai N *et al.*, 2005). Particularmente, en los riñones OUB, la marcación disminuyó respecto de lo observado en los riñones Sham. Además, en OUB24 la señal prácticamente desapareció de la membrana apical, apareciendo algo difusa en el interior celular.



**Figura 4.12:** Inmunohistoquímica para evaluar la expresión de Oat5 en tejido renal de animales Sham, OUB1, OUB2, OUB5 y OUB24 (n=4, para cada grupo experimental). Las secciones de cada riñón fueron incubadas con un anticuerpo policlonal no comercial anti-Oat5. La marcación se observó en la membrana apical de las células de túbulo proximal (*flecha*) y la intensidad de la misma disminuyó en los riñones OUB respecto de lo observado en los riñones Sham. En OUB24, la marcación prácticamente desapareció de la membrana apical, apareciendo algo difusa en el interior celular. Estas imágenes son representativas de muestras de cuatro animales para cada grupo experimental. Magnificación 200X. Barra: 40  $\mu$ m.

*La excreción urinaria de Oat5 aumentó significativamente en todos los grupos experimentales, respecto de lo observado en el grupo Sham. En paralelo, la expresión renal de esta proteína disminuyó tanto en los homogenados renales como en las membranas apicales renales, lo cual podría explicar, al menos en parte, el aumento observado en la excreción urinaria de Oat5.*

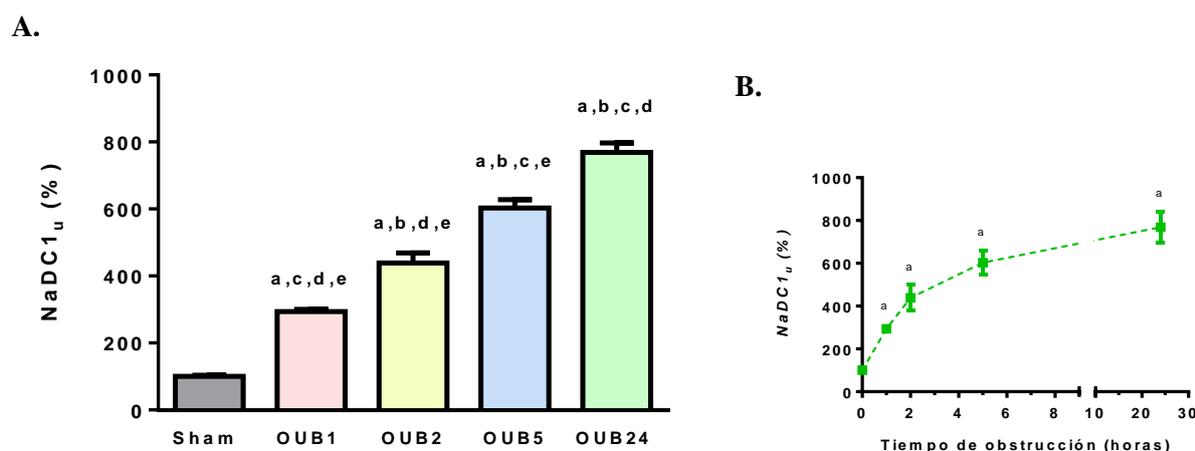
*Por otro lado, otros marcadores de daño renal, como la urea y la creatinina plasmática o la NGAL<sub>u</sub>, presentaron alteraciones sólo en los grupos OUB5 y OUB24, mientras que la Oat5<sub>u</sub> presentó alteraciones más tempranamente, aún cuando el tiempo de obstrucción de uréteres fue muy corto (OUB1 y OUB2).*

*Por lo tanto, teniendo en cuenta estos resultados, la Oat5<sub>u</sub> podría ser postulada como un biomarcador temprano de lesión renal obstructiva, dado que aumentó a periodos muy cortos de obstrucción (1 y 2 horas), cuando aún no se evidenciaron alteraciones en los otros parámetros de lesión renal evaluados.*

## 4.4 Excreción urinaria y expresión renal del Cotransportador Na<sup>+</sup>/Dicarboxilatos 1 (NaDC1) en ratas con nefropatía obstructiva

### 4.4.1 Excreción urinaria de NaDC1 en ratas con nefropatía obstructiva

Mediante la técnica de electroforesis y *Western blotting* (ítem 3.8 del capítulo “Materiales y Métodos”) se determinó la excreción urinaria de la proteína NaDC1 (NaDC1<sub>u</sub>). Para ello se empleó un anticuerpo policlonal no comercial anti-NaDC1 que permitió detectar una banda inmunoreactiva de aproximadamente 75 kDa en las muestras de orina de todos los grupos experimentales. Dichas bandas fueron analizadas por densitometría y el resultado obtenido, expresado en unidades arbitrarias, se normalizó según los niveles urinarios de creatinina de cada muestra. En la **Figura 4.13** se puede observar que la excreción urinaria de NaDC1 aumentó significativamente en todos los grupos experimentales, respecto de lo observado en el grupo Sham. Los incrementos hallados fueron del 294, 439, 603 y 769% para los grupos OUB1, OUB2, OUB5 y OUB24, respectivamente, con respecto al valor Sham.

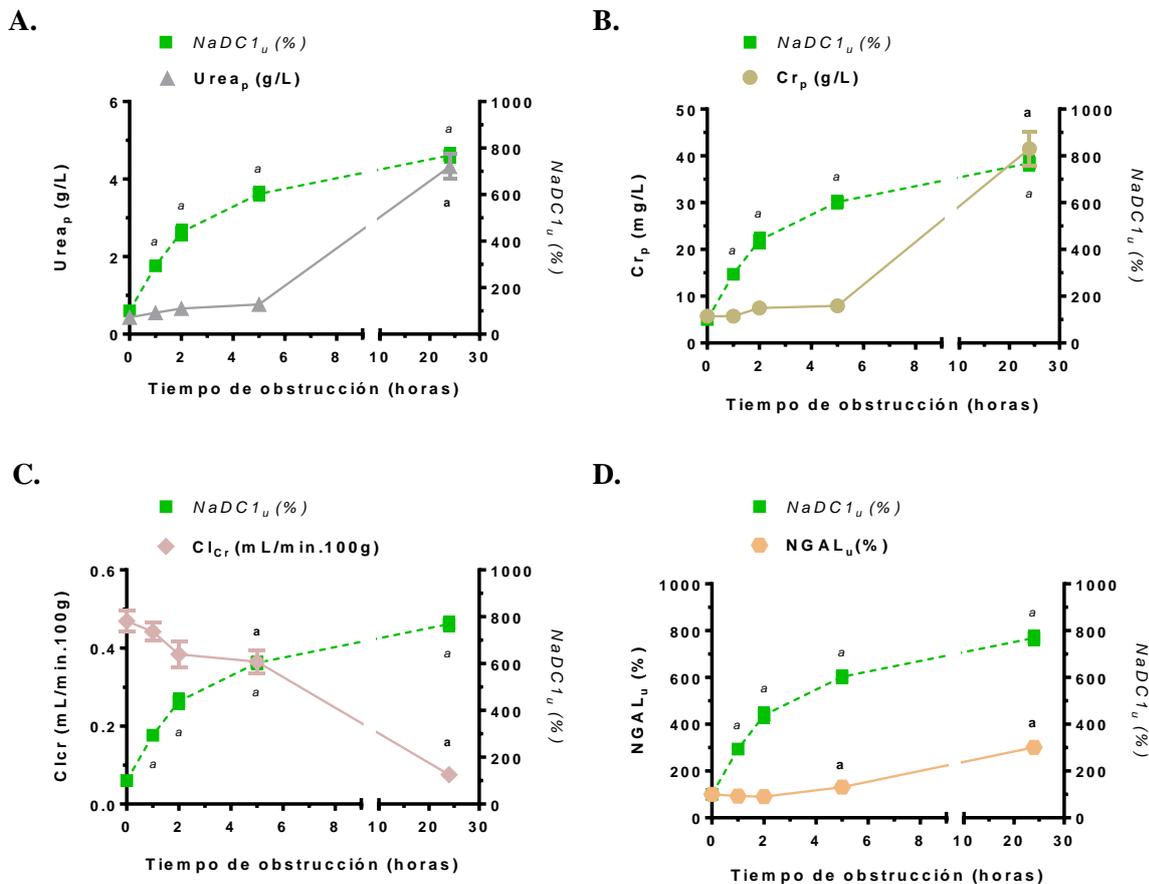


**Figura 4.13:** Excreción urinaria de NaDC1 para los grupos Sham (n=11) y OUB (OUB1, n=5; OUB2, n=7; OUB5, n=6; OUB24, n=6). El análisis densitométrico de las bandas inmunoreactivas de NaDC1 normalizadas según los valores de creatinina en orina se expresó en barras (A) y como línea de tiempo (B). Los resultados se calcularon como porcentajes, considerando el nivel del grupo Sham como el 100%. Cada columna (A) o punto (B) de la gráfica representa la media  $\pm$  error estándar (SE); <sup>a</sup> p<0,05 vs. Sham; <sup>b</sup> p<0,05 vs. OUB1; <sup>c</sup> p<0,05 vs. OUB2; <sup>d</sup> p<0,05 vs. OUB5; <sup>e</sup> p<0,05 vs. OUB24. (En la gráfica B sólo se muestra la diferencia significativa respecto del grupo Sham).

#### 4.4.1.1 Comparación de la NaDC1<sub>u</sub> con parámetros tradicionales de daño renal

Luego, la excreción urinaria de NaDC1 se comparó con los parámetros de daño renal previamente determinados en todos los grupos experimentales. La **Figura 4.14** muestra los niveles plasmáticos de urea (**Fig. 4.14A**) y creatinina (**Fig. 4.14B**), el *clearance* renal de

creatinina (**Fig. 4.14C**) y la excreción urinaria de NGAL (**Fig. 4.14D**) en comparación con la  $\text{NaDC1}_u$ . Como se puede observar, tanto la urea como la creatinina aumentaron significativamente en el grupo OUB24, y el *clearance* renal de creatinina disminuyó sólo en algunos grupos OUB (OUB5 y OUB24). Por el contrario, la proteína  $\text{NaDC1}$  aumentó significativamente en las muestras de orina de todos los grupos analizados, incluso en el grupo con periodo de tiempo de obstrucción más corto (OUB1). Por su parte, la  $\text{NGAL}_u$  aumentó significativamente sólo en los grupos OUB5 y OUB24, a diferencia de lo observado previamente para  $\text{NaDC1}_u$ .



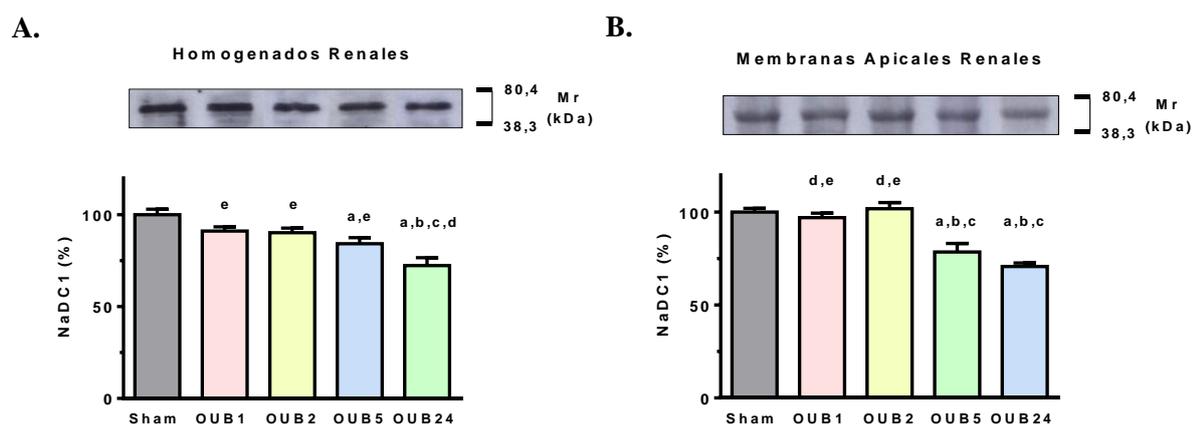
**Figura 4.14:** Comparación de los niveles plasmáticos de urea ( $\text{Urea}_p$ ) y creatinina ( $\text{Cr}_p$ ), *clearance* renal de creatinina ( $\text{Cl}_{cr}$ ) y  $\text{NGAL}_u$ , con la excreción urinaria de  $\text{NaDC1}$  para los grupos Sham (n=11) y OUB (OUB1, n=5; OUB2, n=7; OUB5, n=6; OUB24, n=6). Los niveles plasmáticos de urea (**A**) y creatinina (**B**), el *clearance* renal de creatinina (**C**) y la  $\text{NGAL}_u$  (**D**) se expresan en el eje Y izquierdo con línea continua. La  $\text{NaDC1}_u$  se expresa en el eje Y derecho con línea discontinua. Cada punto de la gráfica representa la media  $\pm$  error estándar (SE); a  $p < 0,05$  vs. Sham (se muestra sólo la diferencia significativa respecto del grupo Sham).

#### 4.4.2 Expresión renal de NaDC1 en ratas con nefropatía obstructiva

##### 4.4.2.1 Evaluación de la expresión renal de NaDC1 mediante la técnica de electroforesis y *Western blotting*

La expresión renal de NaDC1 se analizó en muestras de homogenados totales de riñón y de membranas apicales renales aisladas de los diferentes grupos experimentales, empleando la técnica de electroforesis y *Western blotting* (ítem 3.8 del apartado “Materiales y Métodos”). Para ello se empleó un anticuerpo policlonal no comercial anti-NaDC1 el cual permitió detectar una banda inmunoreactiva de 75 kDa, correspondiente a la proteína NaDC1, en todos los grupos analizados.

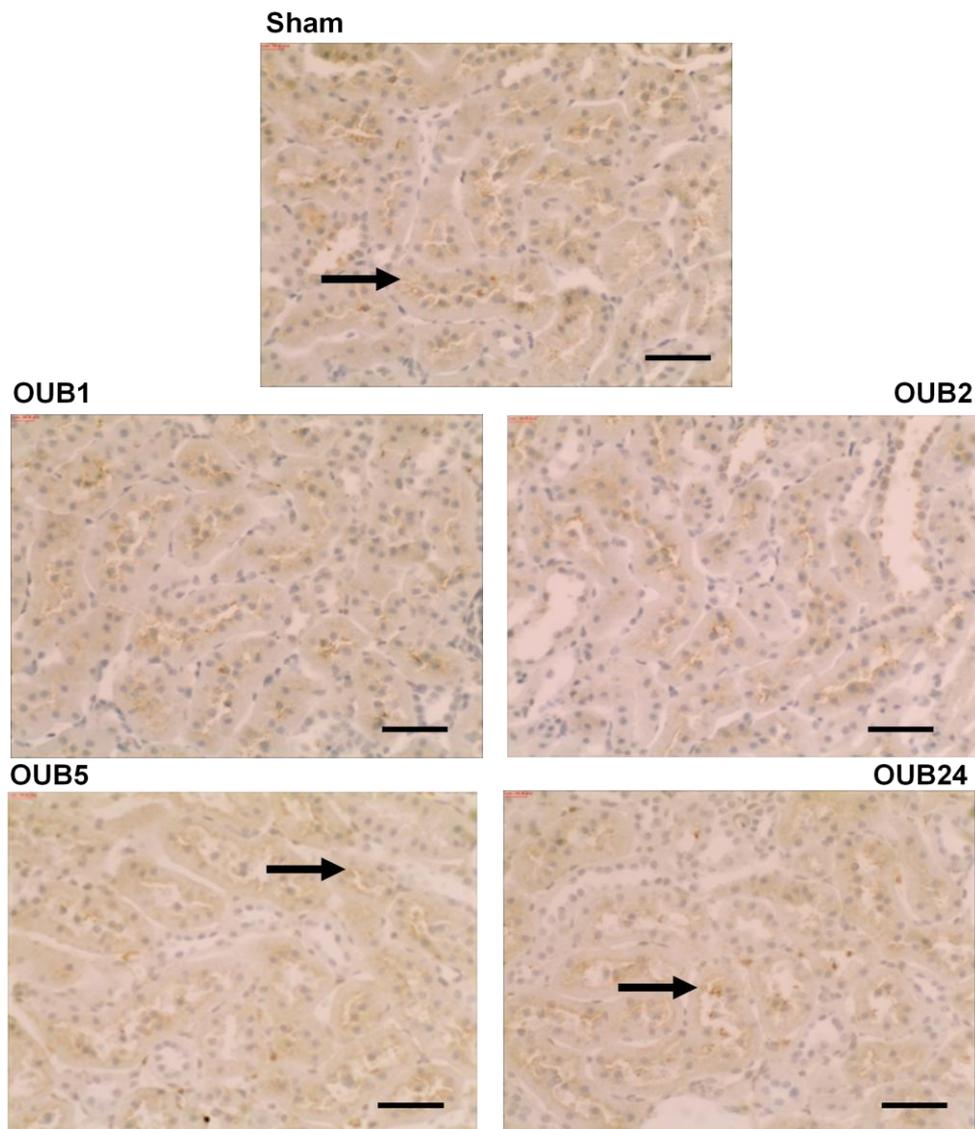
En la **Figura 4.15** se muestran los resultados obtenidos. En la parte superior se muestran las bandas correspondientes a la proteína NaDC1 mientras que en la parte inferior se graficó el análisis densitométrico correspondiente. Tanto en los homogenados totales como en las membranas apicales renales se evidenció una disminución significativa en la expresión de NaDC1 sólo en los grupos OUB5 y OUB24. En los homogenados totales (**Fig. 4.15A**), las disminuciones halladas fueron del 16 y 28% para los grupos OUB5 y OUB24, respectivamente, en comparación con el valor Sham (considerado como 100%). A nivel de las membranas apicales (**Fig. 4.15B**), la expresión de NaDC1 disminuyó en un 21 y 29% para los grupos OUB5 y OUB24, respectivamente.



**Figura 4.15:** Expresión de la proteína NaDC1 en muestras de homogenados renales (20  $\mu$ g de proteína) (A) y membranas apicales renales (16  $\mu$ g de proteína) (B) para los grupos Sham (n=11) y OUB (OUB1, n=5; OUB2, n=7; OUB5, n=6; OUB24, n=6). *Parte superior de la figura:* bandas inmunoreactivas correspondientes a la proteína NaDC1. A la derecha se indican los estándares de peso molecular (Mr) correspondientes a la albúmina de suero bovino (80,4 kDa) y a la anhidrasa carbónica (38,3 kDa). *Parte inferior de la figura:* análisis densitométrico de NaDC1. Los resultados se calcularon como porcentajes, considerando el nivel del grupo Sham como el 100%. Cada columna de la gráfica representa la media  $\pm$  error estándar (SE); <sup>a</sup> p<0,05 vs. Sham; <sup>b</sup> p<0,05 vs. OUB1; <sup>c</sup> p<0,05 vs. OUB2; <sup>d</sup> p<0,05 vs. OUB5; <sup>e</sup> p<0,05 vs. OUB24.

#### 4.4.2.2 Evaluación de la expresión renal de NaDC1 mediante la técnica de inmunohistoquímica

Mediante la técnica inmunohistoquímica realizada en cortes de tejido renal de animales Sham y OUB, se pudo observar una marcación a nivel de la membrana apical de las células del túbulo proximal, lugar donde se ha descrito la localización de esta proteína (Sekine T *et al.*, 1998). La marcación de NaDC1 disminuyó en los riñones OUB5 y OUB24, en comparación a lo observado en los riñones Sham, OUB1 y OUB2 (**Figura 4.16**). Estos resultados estarían en concordancia con lo hallado mediante la técnica de *Western blotting*.

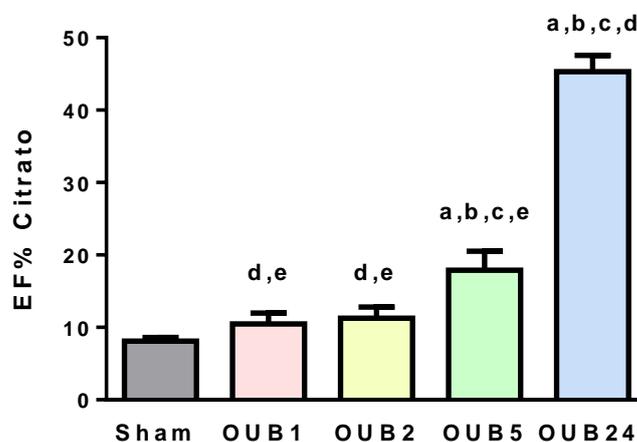


**Figura 4.16:** Inmunohistoquímica para evaluar la expresión de NaDC1 en tejido renal de animales Sham, OUB1, OUB2, OUB5 y OUB24 (n=4, para cada grupo experimental). Las secciones de cada riñón fueron incubadas con un anticuerpo policlonal no comercial anti-NaDC1. La marcación se observó en la membrana apical de las células de túbulo proximal (*flecha*) y la intensidad de la misma disminuyó en los riñones OUB5 y OUB24 respecto de lo observado en el resto de los grupos experimentales. Estas imágenes son representativas de muestras de cuatro animales para cada grupo experimental. Magnificación 200X. Barra: 40  $\mu$ m.

Como se mencionó en el ítem 1.5.2 del capítulo “Introducción”, NaDC1 es un transportador de dicarboxilatos acoplado al movimiento de sodio. Una de sus principales funciones es la de reabsorber los intermediarios del ciclo de Krebs, como succinato,  $\alpha$ -cetoglutarato y citrato, que son filtrados libremente a través de la nefrona. Particularmente, el citrato es un metabolito que participa en la regulación del metabolismo oxidativo renal y además, cobra relevancia en el presente trabajo de Tesis debido a que, dadas sus propiedades como agente quelante de calcio, es considerado un importante inhibidor de la formación de cálculos renales (Pajor AM, 2016). A continuación, con el fin de indagar acerca de la función de NaDC1, se analizó la excreción urinaria de citrato (uno de sus principales sustratos) en el contexto de la enfermedad renal obstructiva.

#### 4.4.3 Excreción urinaria de citrato

La excreción fraccional de citrato se muestra en la **Figura 4.17**. Como se puede observar, el citrato urinario aumentó significativamente sólo en los grupos OUB5 y OUB24. Se observaron incrementos estadísticamente significativos del 9,8% y 37,22% para los grupos OUB5 y OUB24, respectivamente, con respecto al valor Sham.



**Figura 4.17:** Excreción fraccional de citrato en ratas Sham (n=11) y OUB (OUB1, n=5; OUB2, n=7; OUB5, n=6; OUB24, n=6). Cada columna de la gráfica representa la media  $\pm$  error estándar (SE); <sup>a</sup> p<0,05 vs. Sham; <sup>b</sup> p<0,05 vs. OUB1; <sup>c</sup> p<0,05 vs. OUB2; <sup>d</sup> p<0,05 vs. OUB5; <sup>e</sup> p<0,05 vs. OUB24.

*La excreción urinaria de NaDC1 aumentó significativamente en todos los grupos experimentales, respecto del grupo Sham. En contraste con lo observado para otros marcadores de daño renal, como la urea y la creatinina plasmáticas, el clearance renal de creatinina y la NGAL<sub>u</sub>, la excreción urinaria de NaDC1 mostró un aumento temprano (OUB1) y progresivo a lo largo de todos los grupos experimentales analizados, sugiriendo una potencial correlación entre esta variable y el tiempo de obstrucción ureteral.*

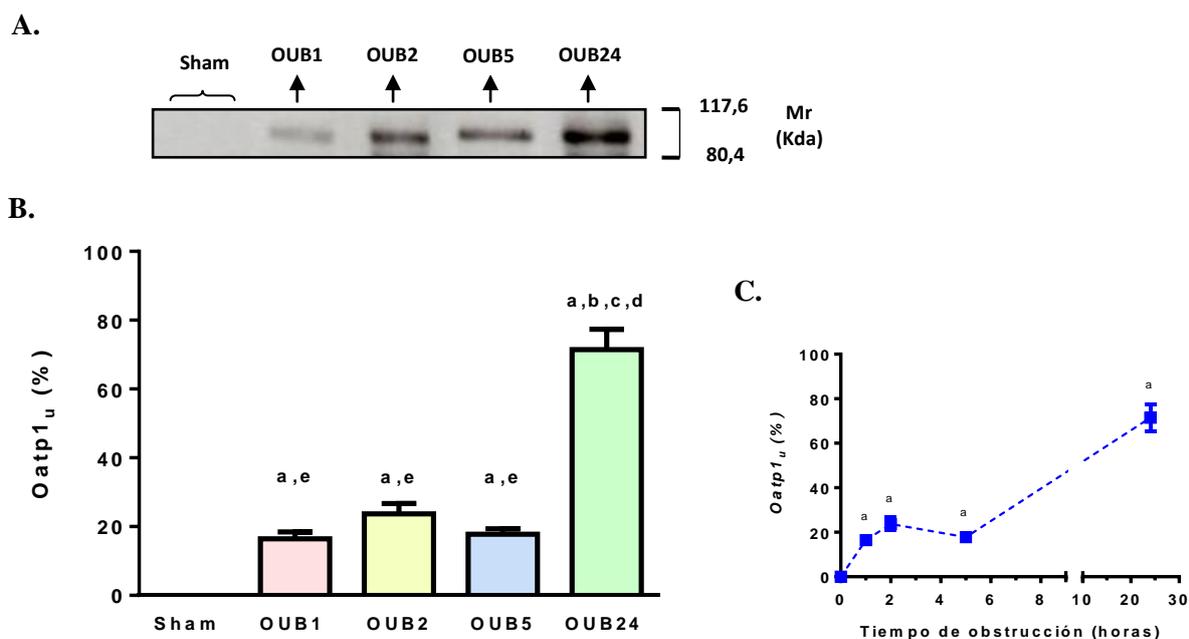
*Por otro lado, la expresión renal de NaDC1 disminuyó significativamente en los grupos OUB5 y OUB24, en paralelo con el aumento en la excreción urinaria de uno de sus principales metabolitos sustrato, el citrato. Este aumento en la excreción fraccional de citrato podría explicarse, al menos en parte, por la disminución en la abundancia de NaDC1 en las membranas apicales renales, lugar donde la proteína es funcional.*

*Con base en los resultados expuestos hasta aquí, podría considerarse a la excreción urinaria de NaDC1 como un biomarcador temprano de lesión renal obstructiva, con el potencial de brindar información acerca del tiempo de duración de la obstrucción ureteral.*

## 4.5 Excreción urinaria y expresión renal del Polipéptido transportador de aniones orgánicos 1 (Oatp1) en ratas con nefropatía obstructiva

### 4.5.1 Excreción urinaria de Oatp1 en ratas con nefropatía obstructiva

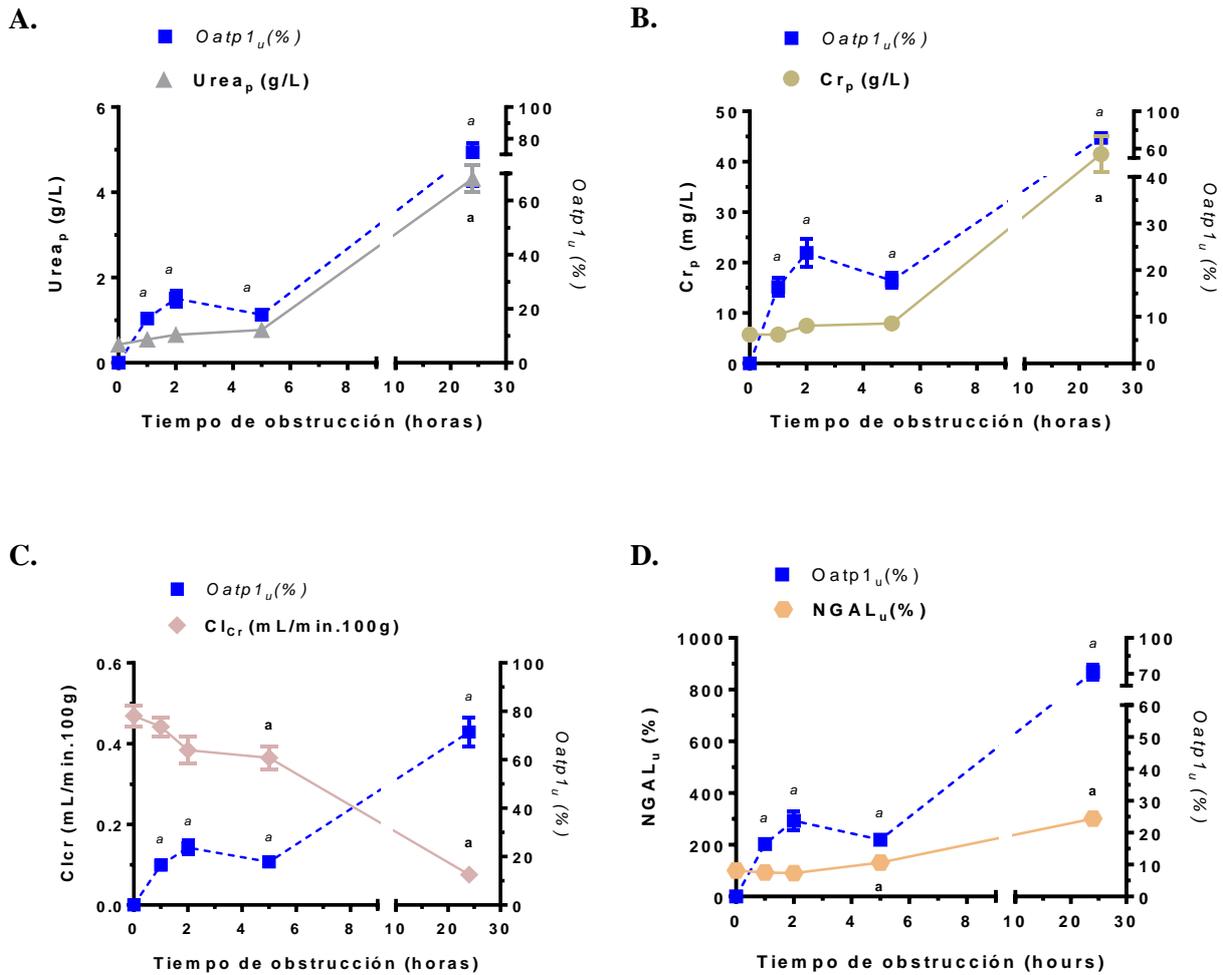
La excreción urinaria de la proteína Oatp1 (Oatp1<sub>u</sub>) se evaluó mediante la técnica de electroforesis y *Western blotting* (ítem 3.8 del capítulo “Materiales y Métodos”) (**Figura 4.18**). Mediante el empleo de un anticuerpo policlonal comercial anti-Oatp1 se detectó una banda inmunoreactiva de aproximadamente 85 kDa en las muestras de orina de los animales OUB, que coincide con el peso molecular descrito para Oatp1 (Lee TK *et al.*, 2003). Dicha banda no se detectó en la orina de las ratas Sham (**Fig. 4.18A**), pero se observó en las orinas de los animales con nefropatía obstructiva, independientemente del tiempo de duración de la obstrucción. Con el objetivo de comparar la excreción urinaria de Oatp1 entre los grupos OUB y para cuantificar la abundancia urinaria relativa de la proteína Oatp1, se diseñó un experimento de *Western blotting* extra, en el cual las muestras de orina de los animales OUB se sembraron en un gel SDS-PAGE junto con una muestra control de membranas apicales renales de animales Sham, a fin de contar con un valor de referencia al cual considerar como 100%. El resultado obtenido se expresó en unidades arbitrarias y, en el caso de las muestras de orina, dicho valor se normalizó según los niveles urinarios de creatinina de cada muestra. Como puede observarse en la **Fig. 4.18B y C**, no se encontraron diferencias significativas en la excreción urinaria de Oatp1 entre los grupos OUB1, OUB2 y OUB5. Por el contrario, el grupo OUB24, presentó un aumento significativo de la Oatp1<sub>u</sub> respecto de los otros grupos experimentales.



**Figura 4.18:** (A) Excreción urinaria de Oatp1 para los grupos Sham (n=11) y OUB (OUB1, n=5; OUB2, n=7; OUB5, n=6; OUB24, n=6). A la derecha se indican los estándares de peso molecular (Mr) correspondientes a la  $\beta$ -galactosidasa (117,6 kDa) y a la albúmina de suero bovino (80,4 kDa). Análisis densitométrico de las bandas inmunoreactivas de Oatp1 normalizadas según los valores de creatinina en orina, expresado en barras (B) y como línea de tiempo (C). Los resultados se calcularon como porcentajes, considerando el nivel de la muestra control de membranas apicales. Cada columna (B) o punto (C) de la gráfica representa la media  $\pm$  error estándar (SE); <sup>a</sup> p<0,05 vs. Sham; <sup>b</sup> p<0,05 vs. OUB1; <sup>c</sup> p<0,05 vs. OUB2; <sup>d</sup> p<0,05 vs. OUB5; <sup>e</sup> p<0,05 vs. OUB24. (En la gráfica C sólo se muestra la diferencia significativa respecto del grupo Sham).

#### 4.5.1.1 Comparación de la Oatp1<sub>u</sub> con parámetros tradicionales de daño renal

La **Figura 4.19** muestra los niveles plasmáticos de urea (**Fig. 4.19A**) y creatinina (**Fig. 4.19B**), el *clearance* renal de creatinina (**Fig. 4.19C**) y la excreción urinaria de NGAL (**Fig. 4.19D**) en comparación con la Oatp1<sub>u</sub>. Tal y como se observó previamente, tanto la urea como la creatinina aumentaron significativamente en el grupo OUB24, y el *clearance* renal de creatinina disminuyó sólo en algunos grupos OUB (OUB5 y OUB24). Por el contrario, la proteína Oatp1 se evidenció sólo en las muestras de orina de los grupos de animales con obstrucción ureteral bilateral. Por su parte, la NGAL<sub>u</sub> aumentó significativamente sólo en los grupos OUB5 y OUB24, a diferencia de lo observado para Oatp1<sub>u</sub>.



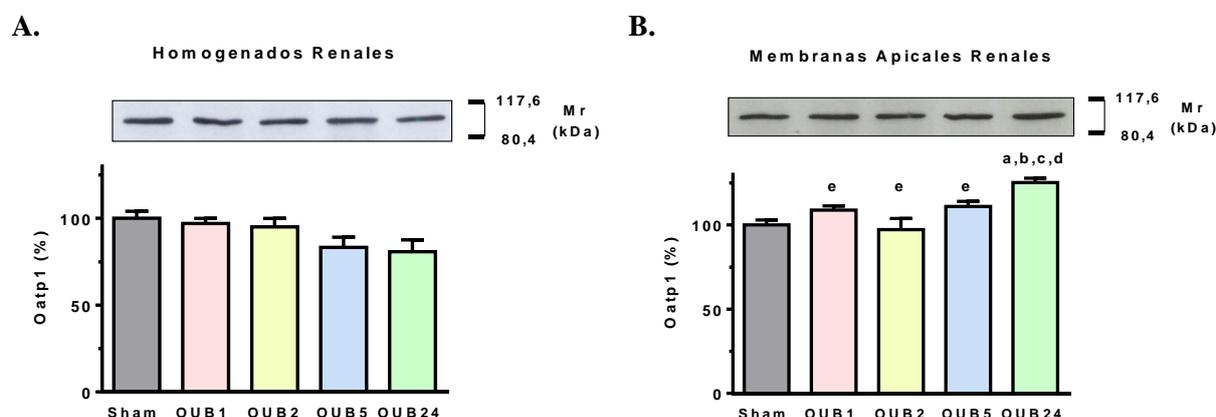
**Figura 4.19:** Comparación de los niveles plasmáticos de urea (Urea<sub>p</sub>) y creatinina (Cr<sub>p</sub>), *clearance* renal de creatinina (Cl<sub>Cr</sub>) y NGAL<sub>u</sub>, con la abundancia urinaria de Oatp1 para los grupos Sham (n=11) y OUB (OUB1, n=5; OUB2, n=7; OUB5, n=6; OUB24, n=6). Los niveles plasmáticos de urea (A) y creatinina (B), el *clearance* renal de creatinina (C) y la NGAL<sub>u</sub> (D) se expresan en el eje Y izquierdo con línea continua. La Oatp1<sub>u</sub> se expresa en el eje Y derecho con línea discontinua. Cada punto de la gráfica representa la media ± error estándar (SE); a p<0,05 vs. Sham (se muestra sólo la diferencia significativa respecto del grupo Sham).

## 4.5.2 Expresión renal de Oatp1 en ratas con nefropatía obstructiva

### 4.5.2.1 Evaluación de la expresión renal de Oatp1 mediante la técnica de electroforesis y *Western blotting*

La **Figura 4.20** muestra la expresión renal de Oatp1, analizada en muestras de homogenados totales de riñón y en membranas apicales renales aisladas de los diferentes grupos experimentales. Se empleó la técnica de electroforesis y *Western blotting* (ítem 3.8 del capítulo “Materiales y Métodos”) y mediante el uso de un anticuerpo policlonal comercial anti-Oatp1 se detectó una banda inmunoreactiva de 85 kDa, en todos los grupos experimentales analizados.

En los homogenados totales (**Fig. 4.20A**) no se observaron diferencias significativas entre los grupos OUB. Por el contrario, en las membranas apicales renales (**Fig. 4.20B**) se observó un aumento en la expresión de Oatp1 en el grupo OUB24. Dicho incremento fue del 25%, respecto del grupo Sham (considerado como 100%).

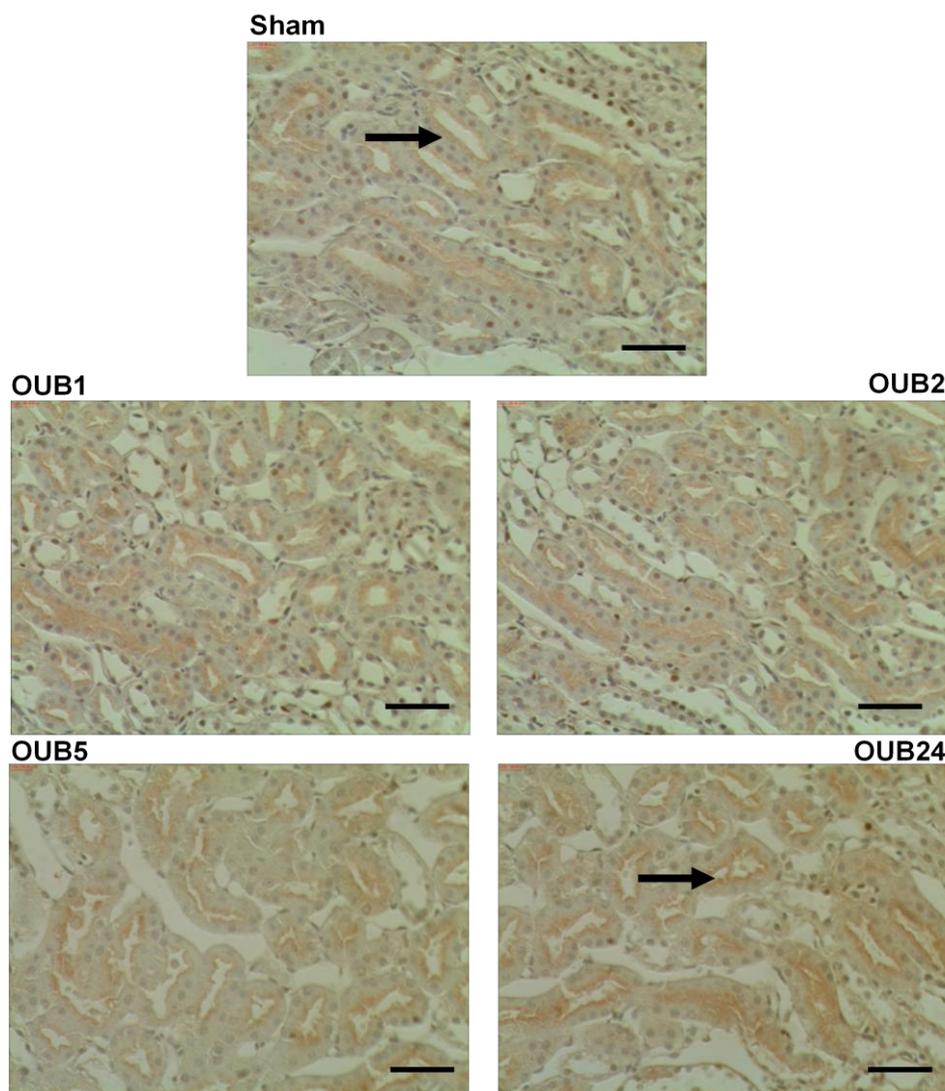


**Figura 4.20:** Expresión de la proteína Oatp1 en muestras de homogenados renales (20  $\mu$ g de proteína) (**A**) y membranas apicales renales (16  $\mu$ g de proteína) (**B**) para los grupos Sham (n=11) y OUB (OUB1, n=5; OUB2, n=7; OUB5, n=6; OUB24, n=6). *Parte superior de la figura:* bandas inmunoreactivas correspondientes a la proteína Oatp1. A la derecha se indican los estándares de peso molecular (Mr) correspondientes a la  $\beta$ -galactosidasa (117,6 kDa) y a la albúmina de suero bovino (80,4 kDa). *Parte inferior de la figura:* análisis densitométrico de Oatp1. Los resultados se calcularon como porcentajes, considerando el nivel del grupo Sham como el 100%. Cada columna de la gráfica representa la media  $\pm$  error estándar (SE); <sup>a</sup> p<0,05 vs. Sham; <sup>b</sup> p<0,05 vs. OUB1; <sup>c</sup> p<0,05 vs. OUB2; <sup>d</sup> p<0,05 vs. OUB5; <sup>e</sup> p<0,05 vs. OUB24.

#### 4.5.2.2 Evaluación de la expresión renal de Oatp1 mediante la técnica de inmunohistoquímica

La expresión renal de Oatp1 también se evaluó a través de la técnica inmunohistoquímica.

Se observó un aumento de la marcación específica para Oatp1 en las membranas apicales del grupo OUB24 respecto de los otros grupos experimentales (**Figura 4.21**). Estos resultados se encuentran en concordancia con los obtenidos mediante la técnica de *Western blotting*.



**Figura 4.21:** Inmunohistoquímica para evaluar la expresión de Oatp1 en tejido renal de animales Sham, OUB1, OUB2, OUB5 y OUB24 (n=4, para cada grupo experimental). Las secciones de cada riñón fueron teñidas con un anticuerpo policlonal comercial anti-Oatp1. La marcación se observó en la membrana apical de las células de túbulo proximal (*flecha*) y la intensidad de la misma aumentó en los riñones OUB24 respecto de lo observado en el resto de los grupos experimentales. Estas imágenes son representativas de muestras de cuatro animales para cada grupo experimental. Magnificación 200X. Barra: 40  $\mu$ m.

*Según nuestros conocimientos, este es el primer estudio que reporta la detección de Oatp1 en muestras de orina. Las muestras de orina de los animales OUB mostraron una banda inmunoreactiva de aproximadamente 85 kDa (peso molecular descrito para Oatp1), pero dicha banda no se detectó en la orina de los animales Sham. Por otro lado, la excreción urinaria de Oatp1 fue de similar magnitud en los grupos OUB1, OUB2 y OUB5, mientras que en el grupo OUB24 dicha excreción fue marcadamente superior. Por lo tanto, los resultados presentados en esta sección, nos permitirían postular a la excreción urinaria de Oatp1 como un biomarcador*

*diagnóstico y temprano de la enfermedad renal obstructiva, con el potencial de informarnos acerca del grado de daño sufrido por el riñón hasta ese momento (leve o severo).*

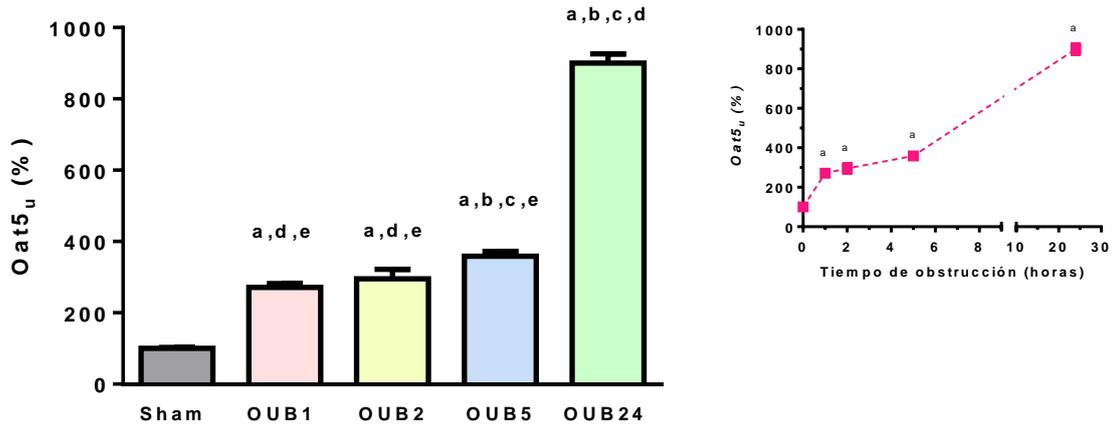
*En paralelo, el análisis de la expresión tisular de Oatp1 también presentó alteraciones. Se observó un aumento significativo de Oatp1 en las membranas apicales renales del grupo OUB24.*

#### **4.6 Análisis comparativo de la excreción urinaria de potenciales biomarcadores de lesión renal en ratas con nefropatía obstructiva**

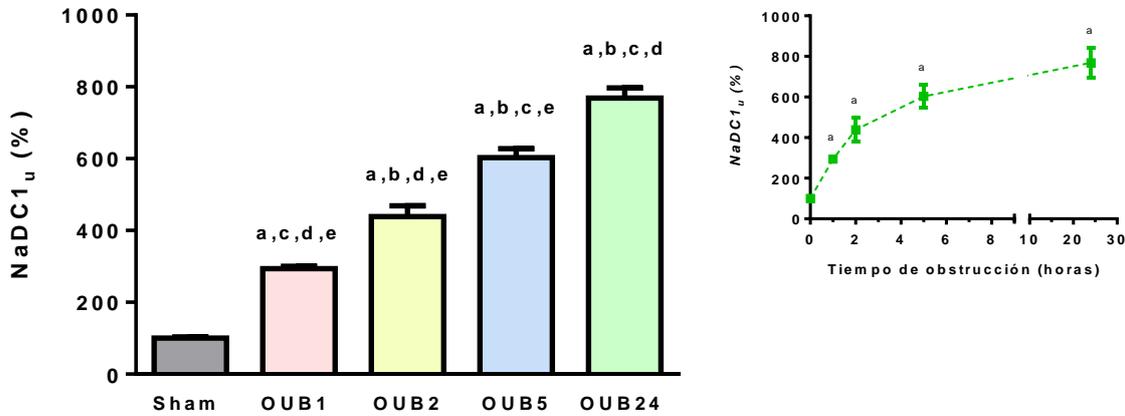
En el presente trabajo de Tesis se evaluaron las excreciones urinarias de tres proteínas transportadoras de aniones orgánicos: el **Transportador de aniones orgánicos 5 (Oat5)**, el **Cotransportador Na<sup>+</sup>/Dicarboxilatos 1 (NaDC1)** y el **Polipéptido transportador de aniones orgánicos 1 (Oatp1)**. En la **Figura 4.21** se recapitulan los resultados obtenidos. Como puede observarse, los niveles urinarios de Oat5 y NaDC1 aumentaron significativamente en todos los grupos experimentales a los cuales se les practicó la cirugía de obstrucción de uréteres, sin embargo, el patrón de excreción en función del tiempo seguido por estas dos proteínas, no fue el mismo. Además, Oat5<sub>u</sub> (**Fig. 4.21A**) aumentó marcadamente en el grupo OUB24, alcanzando un valor de alrededor del 900% respecto del grupo Sham, mientras que la NaDC1<sub>u</sub> (**Fig. 4.21B**) mostró un aumento progresivo a lo largo de todos los grupos experimentales analizados, llegando a una meseta en el grupo OUB24.

Por su parte, la proteína Oatp1 (**Fig. 4.21C**) se observó sólo en las muestras de orina de los grupos OUB, no evidenciándose banda reactiva en los animales Sham. En este caso, los incrementos observados fueron similares para los grupos OUB1, OUB2 y OUB5 y de mayor magnitud para OUB24, registrándose valores de hasta un 70%.

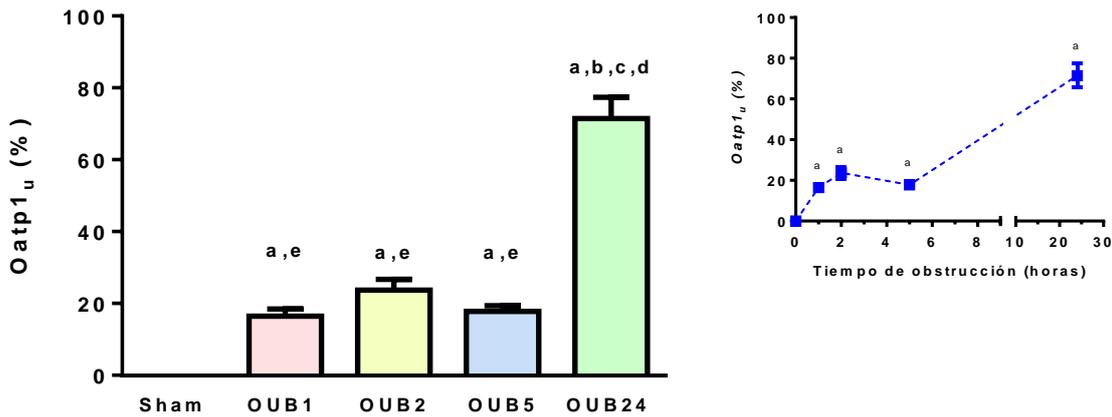
A.



B.

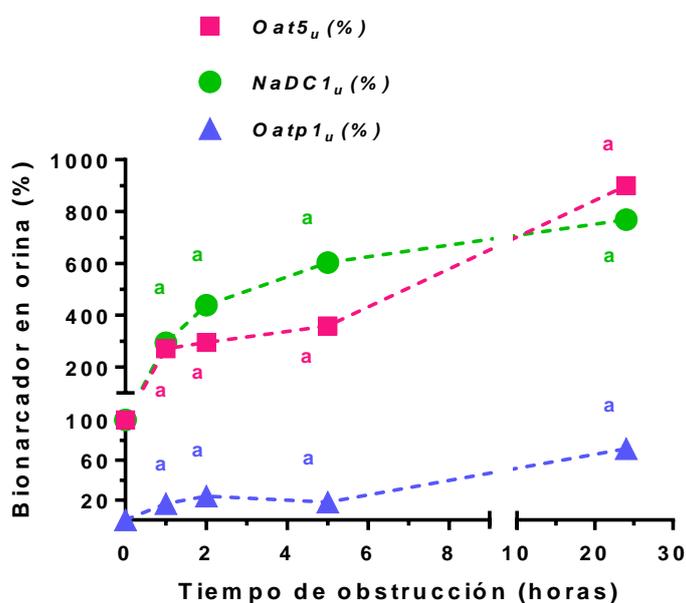


C.



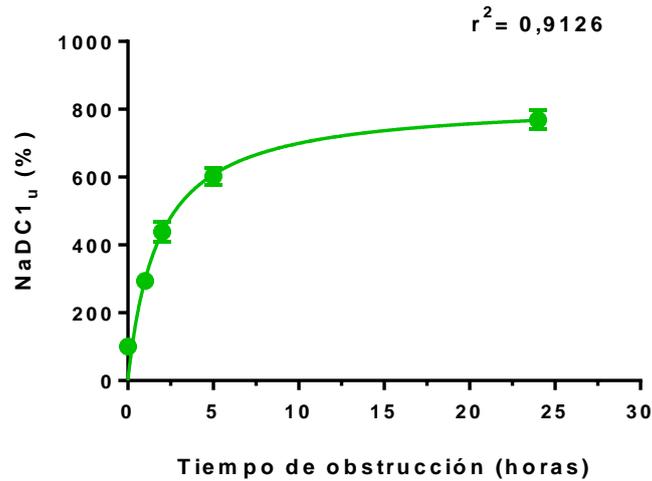
**Figura 4.21:** Excreción urinaria de Oat5 (A), NaDC1 (B) y Oatp1 (C) para los grupos Sham (n=11) y OUB (OUB1, n=5; OUB2, n=7; OUB5, n=6; OUB24, n=6). El análisis densitométrico de las bandas inmunoreactivas de cada proteína normalizadas según los valores de creatinina en orina se expresó en barras y como línea de tiempo. Los resultados se calcularon como porcentajes, considerando el nivel del grupo Sham como el 100%. Cada columna o punto de la gráfica representa la media  $\pm$  error estándar (SE); <sup>a</sup> p<0,05 vs. Sham; <sup>b</sup> p<0,05 vs. OUB1; <sup>c</sup> p<0,05 vs. OUB2; <sup>d</sup> p<0,05 vs. OUB5; <sup>e</sup> p<0,05 vs. OUB24. (En las gráficas de la derecha sólo se muestra la diferencia significativa respecto del grupo Sham).

En la **Figura 4.22** se muestran comparativamente las excreciones urinarias de Oat5, NaDC1 y Oatp1. Las tres proteínas presentaron diferencias significativas respecto del grupo Sham en todos los grupos experimentales, inclusive en aquellos grupos de tiempos cortos de obstrucción (OUB1 y OUB2).



**Figura 4.22:** Análisis comparativo de la excreción urinaria de potenciales biomarcadores en función del periodo de tiempo de obstrucción ureteral. Cada punto de la gráfica representa la media  $\pm$  error estándar (SE); a  $p < 0,05$  vs. Sham (se muestra sólo la diferencia significativa respecto del grupo Sham).

Como se mencionó previamente, la excreción urinaria de NaDC1 mostró un comportamiento particular: a medida que aumentó el periodo de tiempo de obstrucción ureteral, la abundancia urinaria de NaDC1 fue mayor, mostrando un patrón de incremento aparentemente regular a lo largo de todos los grupos experimentales analizados. Por lo tanto, se decidió profundizar estos estudios realizando un análisis de regresión, para evaluar una posible correlación entre las variables “NaDC1<sub>u</sub>” y “duración de la obstrucción”. En la **Figura 4.23** se muestran los resultados obtenidos. Como puede observarse, se confirmó la correlación positiva entre la NaDC1<sub>u</sub> y la duración de la obstrucción, con un alto grado de significancia ( $r^2 = 0,9126$ ;  $p < 0,05$ ). Además, la gráfica de la regresión mostró un comportamiento del tipo hiperbólico. Por lo tanto, cuando la obstrucción es prolongada (OUB24), la abundancia de NaDC1 en la orina alcanzaría una meseta, lo que puede interpretarse como un límite en la cantidad de proteína que se vuelca a la orina una vez alcanzado determinado nivel de daño renal.



**Figura 4.23:** Correlación entre NaDC1<sub>u</sub> y el tiempo de obstrucción. El coeficiente de correlación ( $r^2$ ) fue de 0,9126 ( $p < 0,05$ . Sham,  $n=11$ ; OUB1,  $n=5$ ; OUB2,  $n=7$ ; OUB5,  $n=6$ ; OUB24,  $n=6$ ), aplicando una regresión no lineal. Cada punto de la gráfica representa la media  $\pm$  error estándar (SE).

*A modo de resumen entonces, tanto la Oat5<sub>u</sub> como la NaDC1<sub>u</sub> y la Oatp1<sub>u</sub> podrían ser consideradas como biomarcadores tempranos de nefropatía obstructiva. Además, la NaDC1<sub>u</sub> tendría la capacidad de brindar información acerca del tiempo de duración de la obstrucción.*

## **5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES**

La nefropatía obstructiva es una condición clínica aguda, inherente al ámbito de la nefrología y la urología, que debe ser diagnosticada y resuelta con rapidez. Epidemiológicamente, representa el 10% de las causas de lesión renal aguda y el 4% de los casos de lesión renal crónica en etapa terminal (Mourmouris PI *et al.*, 2014; Meola M *et al.*, 2016; Farrar A, 2018). Las principales etiologías de la nefropatía obstructiva varían con la edad del paciente. Las anomalías anatómicas, como obstrucciones de la unión ureterovesical, válvulas uretrales posteriores, estenosis y vejiga neuropática, son más frecuentes en los niños; mientras que las condiciones adquiridas, tales como obstrucción de la próstata, tumores, nefrolitiasis, y fibrosis retroperitoneal, prevalecen en los adultos (Tseng TY y Stoller ML, 2009; Ucerro AC *et al.*, 2010; Mourmouris PI *et al.*, 2014).

Como resultado de los estudios desarrollados en diferentes modelos experimentales de nefropatía obstructiva, se sabe que los cambios en el flujo sanguíneo renal, la tasa de filtración glomerular y la función tubular son alteraciones inmediatas luego de una obstrucción ureteral. La gravedad de estos cambios depende en gran medida del grado de obstrucción (parcial frente a completa), su proximidad al riñón y la duración de la obstrucción. En general, cuanto más completa es la obstrucción, más cerca está del riñón y cuanto más larga es la duración, más severos y menos reversibles se vuelven los cambios de la función renal. El aumento de la presión hidrostática intratubular y la isquemia secundaria inducen la destrucción de las nefronas y estos eventos se magnifican posteriormente por procesos celulares que ampliamente se pueden clasificar en tres categorías: inflamación tubulointersticial, muerte celular o apoptosis y fibrosis intersticial (Mei W *et al.*, 2015; Nilsson L *et al.*, 2015; Pap D *et al.*, 2017; Braga TT *et al.*, 2018; Kim S *et al.*, 2018; Li SS *et al.*, 2018; Waasdorp M *et al.*, 2019).

Las principales anomalías en la función tubular que se desarrollan como consecuencia de la lesión de las células tubulares son el deterioro en la reabsorción de agua y solutos, y la capacidad reducida para concentrar y acidificar la orina. La mayoría de estas anomalías son especialmente evidentes en el periodo postobstructivo y pueden persistir como defectos permanentes, dependiendo de la severidad del cuadro. A estos fenómenos se los conoce en conjunto con el término de “diuresis postobstructiva” (Wang G *et al.*, 2008; Zhang Y *et al.*, 2010; Stødkilde L *et al.*, 2011; Brandoni A y Torres AM, 2017).

Las patologías renales obstructivas vienen siendo estudiadas desde hace aproximadamente 50 años. Los primeros trabajos datan de la década del 70, y estuvieron enfocados principalmente en conocer las consecuencias hemodinámicas y funcionales de las obstrucciones del tracto urinario

sobre el riñón. En los últimos 30 años, las líneas de investigación han abordado nuevos aspectos, como las vías celulares y moleculares que subyacen al desarrollo del daño, el diagnóstico mediado por biomarcadores y la optimización de los tratamientos, profundizando de esta manera, no sólo el conocimiento acerca de la fisiopatología de la enfermedad, sino también optimizando su manejo y resolución (Wang SJ *et al.*, 2012; Kawahara T *et al.*, 2015; Olvera-Posada D *et al.*, 2017; Bienias B y Sikora P, 2018; Yu L *et al.*, 2018; Koratala A y Morales Lappot J, 2019).

La disponibilidad de biomarcadores sensibles y específicos constituye una necesidad urgente en el campo de la enfermedad renal. La búsqueda de nuevos biomarcadores se basa en la identificación de moléculas clave para la patogénesis de la enfermedad en modelos animales y su posterior investigación en estudios clínicos. Este enfoque ha permitido la identificación de varias moléculas prometedoras como TGF- $\beta$ 1, MCP-1, EGF y diversas proteínas tubulares (Lucarelli G *et al.*, 2014; Mohammadjafari H *et al.*, 2014; Gerber C *et al.*, 2016; Spaggiari E *et al.*, 2017). Además, con el advenimiento de las nuevas técnicas de proteómica se ha podido caracterizar en profundidad el perfil proteico de la orina y el plasma, aportando nuevas moléculas con potencialidad de biomarcador (Stødkilde L *et al.*, 2013; Lacroix C *et al.*, 2014; Schanstra JP y Mischak H, 2015).

En general, los biomarcadores individuales no son suficientes para describir condiciones complejas como las enfermedades renales. En esos casos, es preferible contar con un *set* o panel de biomarcadores, dado que en general, cada uno de ellos aporta un tipo de información particular, ya sea brindando información acerca del grado de la lesión y del deterioro funcional, o permitiendo la determinación del pronóstico de la enfermedad (Xie Y *et al.*, 2014; McCaffrey J *et al.*, 2015; Gunnerson KJ *et al.*, 2016).

Con base en todo lo expuesto, el objetivo principal del presente trabajo de Tesis fue ***evaluar la excreción urinaria de tres proteínas transportadoras de aniones orgánicos (Oat5, NaDC1 y Oatp1) en un modelo experimental de nefropatía obstructiva, con el fin de determinar su potencialidad como biomarcadores de lesión renal obstructiva.***

## **5.1 Caracterización del modelo experimental de nefropatía obstructiva**

Para el estudio de la nefropatía obstructiva se emplean tres modelos experimentales: modelos genéticos, modelos de nefrolitiasis inducida y modelos quirúrgicos. En el presente trabajo de Tesis se trabajó con un modelo quirúrgico de OUB, seguido de un periodo postobstructivo de 24 horas, diseño que permitió la obtención de las muestras de orina necesarias para cumplir con el objetivo planteado. Dicho modelo ha sido empleado previamente por diversos autores, con

algunas variantes en cuanto a la duración del tiempo de la obstrucción, o al momento de la toma de las muestras. La mayoría de los trabajos encontrados en la literatura se basan en obstrucciones ureterales completas de 24 o 48 horas, con toma de muestras (tisulares y de plasma) al finalizar este periodo (Kim SW *et al.*, 2001, 2004; Nørregaard R *et al.*, 2005; Stødkilde L *et al.*, 2011), o a distintos tiempos luego de la liberación de la misma (periodo postobstructivo, por ejemplo: 1, 2, 3, 14 y hasta 30 días) (Villar SR *et al.*, 2004, 2005, 2008; Li C *et al.*, 2007; Nørregaard R *et al.*, 2007; Di Giusto G y Torres AM, 2009; Jensen AM *et al.*, 2009; Danilovic A *et al.*, 2012). Estos últimos han permitido evaluar la evolución del daño a lo largo del tiempo luego de que el evento obstructivo fuera resuelto.

En este trabajo, se comenzó empleando un grupo experimental de 24 horas de obstrucción ureteral (OUB24) y posteriormente se agregaron tres grupos experimentales más, con periodos de tiempo de obstrucción más cortos (1, 2 y 5 horas; OUB1, OUB2 y OUB5 respectivamente) (ver “Materiales y Métodos”), que permitieron reproducir distintos niveles de gravedad de la patología. Los estudios se realizaron en todos los grupos experimentales luego de 24 h de liberada la obstrucción.

El peso corporal disminuyó significativamente en los animales OUB24, probablemente debido al aumento de la diuresis observado en este grupo. Por su parte, el peso renal aumentó significativamente en los animales OUB5 y OUB24, y por consiguiente, también se registraron aumentos en la relación peso renal/peso corporal de estos dos grupos. El aumento del peso renal y de la relación peso renal/peso corporal podría asociarse al cuadro de hidronefrosis debido a la acumulación de fluidos dentro de los riñones obstruidos; mientras que el aumento del flujo urinario observado en estos grupos respondería al síndrome de diuresis postobstructiva propio de la patología (Kim SW *et al.*, 2001).

El daño renal obstructivo ocasiona una disminución abrupta en la velocidad de filtración glomerular por vasoconstricción de las arteriolas aferentes. En consecuencia, la capacidad funcional de los riñones también disminuye. Como resultado se produce la retención y el acúmulo en sangre de diferentes compuestos nitrogenados que normalmente son eliminados por el organismo, como la urea y la creatinina (Klahr S, 2000). Por eso, valores elevados de estas moléculas en sangre suelen ser indicativas de disfunción renal. Alteraciones en los niveles plasmáticos de urea y creatinina, así como en el *clearance* renal de creatinina, ya han sido descriptas en otros estudios, para animales OUB24 (Villar SR *et al.*, 2004, 2005, 2008). En este trabajo, el grupo OUB24 presentó aumentos significativos de la urea y la creatinina en plasma y disminución del *clearance* renal de creatinina. Por su parte, el *clearance* renal de creatinina también disminuyó en el grupo OUB5.

El valor predictivo y diagnóstico de los parámetros recién mencionados es limitado debido a que, entre otras cosas, son poco específicos y relativamente insensibles a pequeñas variaciones de la función renal. Por ello, diversas investigaciones proponen nuevos marcadores capaces de predecir las alteraciones de forma más temprana. Entre ellos, la excreción urinaria de NGAL (NGAL<sub>u</sub>) ha sido estudiada exhaustivamente en modelos experimentales y clínicos, como marcador de daño renal agudo inducido por diferentes agentes (Urbschat A *et al.*, 2014; Huang HF *et al.*, 2017). También, ha sido evaluada en el contexto de la nefropatía obstructiva, particularmente en casos congénitos de obstrucción de la unión ureteropélvica (UPJO), en donde la NGAL<sub>u</sub> se encuentra aumentada (Lucarelli G *et al.*, 2014; Noyan A *et al.*, 2015; Bienias B and Sikora P, 2018). En el modelo experimental de nefropatía obstructiva empleado en este trabajo, se observó un aumento de la NGAL<sub>u</sub> en los grupos OUB5 y OUB24.

La habilidad para regular la excreción de agua y electrolitos es una de las funciones esenciales del riñón. Los procesos de dilución y concentración de la orina dependen de la función coordinada de dos segmentos clave de la nefrona, el asa de Henle y el túbulo colector. En la médula externa, la rama ascendente gruesa del asa de Henle absorbe activamente NaCl (pero no agua), diluyendo el fluido luminal y proveyendo de NaCl para aumentar la osmolaridad del intersticio medular. La configuración en contracorriente de los túbulos y los vasos sanguíneos, junto con la permeabilidad selectiva de los segmentos nefronales, permiten la generación de un gradiente osmótico a lo largo del eje corticomedular. Por su parte, el túbulo colector permite la reabsorción de niveles variables de agua a través de la acción de la hormona antidiurética (ADH), que incrementa la permeabilidad al agua de las células principales, al estimular la inserción de moléculas de acuaporinas en el epitelio luminal (Sands JM y Layton HE, 2000). Luego de una obstrucción ureteral, varios de estos mecanismos se encuentran deteriorados. La reabsorción de sal por la rama ascendente gruesa esta disminuida lo que resulta en una depleción de solutos en el intersticio medular, lo que disminuye la extracción de agua de la rama descendente del asa de Henle (Nørregaard R *et al.*, 2007). Numerosos estudios muestran que la obstrucción conduce a una disminución en la expresión de diferentes transportadores de Na<sup>+</sup>, tales como el transportador Na-K-2Cl, en la porción gruesa del asa ascendente de Henle (Zhang Y *et al.*, 2015; Brandoni A y Torres AM, 2017; Liu M *et al.*, 2017), y a un aumento concomitante en la excreción de electrolitos, tales como Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>, entes osmóticamente activos (Villar SR *et al.*, 2004). Además, hay una disminución de la respuesta de los conductos colectores corticales a la acción de la ADH, junto con una reducción en la expresión de acuaporinas a lo largo de toda la nefrona (Wang W *et al.*, 2015; Sun Y *et al.*, 2016; Liu M *et al.*, 2018). Todos estos fenómenos contribuyen al notable aumento de la diuresis, observado en la

fase postobstructiva (Villar SR *et al.*, 2004), y tanto el incremento de la diuresis como la disminución de la osmolaridad de la orina perduran hasta que el equilibrio de los solutos se ha normalizado (Wang W *et al.*, 2015; Zhang Y *et al.*, 2015; Sun Y *et al.*, 2016; Liu M *et al.*, 2017; Liu M *et al.*, 2018). En este modelo experimental, las excreciones fraccionales de agua y osmoles mostraron aumentos significativos en los animales OUB24. Es probable que, en los riñones que estuvieron obstruidos por un periodo de tiempo prolongado (OUB24) no se haya formado un gradiente osmótico corticomedular apropiado para la reabsorción de agua, debido probablemente al lavado del gradiente corticomedular generado principalmente por el aumento del flujo medular y por la presencia de factores diuréticos y natriuréticos como la urea (notablemente aumentada en este grupo) que actúa como un potente agente osmótico. Los resultados obtenidos en el grupo OUB24 reflejan fielmente el fenómeno diurético postobstructivo.

Los riñones reabsorben el 99,9% y 99% de la carga filtrada total de glucosa y aminoácidos respectivamente. Ambas moléculas son filtradas libremente por el glomérulo y entran en el lumen del túbulo proximal a una concentración equivalente a la de sus concentraciones plasmáticas. En la membrana apical de las células del túbulo proximal, estos solutos son generalmente captados acoplados al sodio, por cotransportadores específicos, y acumulados dentro del citoplasma. Una vez allí, pueden difundir atravesando la membrana basolateral a través de transportadores específicos. La reabsorción de la glucosa filtrada depende de varios factores: del número de transportadores expresados en la superficie luminal, de su afinidad por la glucosa y del mantenimiento de un gradiente electroquímico para el  $\text{Na}^+$ . Además, depende de la integridad estructural de las membranas y sus transportadores. Cada uno de estos factores contribuye a la determinación de la capacidad reabsorbativa tubular máxima, de tal manera que, en situaciones normales, la glucosa filtrada es completamente reabsorbida, y nada se excreta por orina (Mather A y Pollock C, 2011). La situación más común que lleva a la saturación de los sistemas y al derrame de glucosa en la orina, ocurre cuando aumenta la carga filtrada en respuesta a aumentos en las concentraciones de glucosa plasmática, como ocurre en la diabetes mellitus. En estas condiciones, no estaría involucrado ninguno de los componentes del mecanismo de reabsorción tubular. Sin embargo, en ciertos casos, como en las situaciones de LRA, la glucosa se excreta por la orina, a pesar de observarse niveles normales de glucosa plasmática (Mather A y Pollock C, 2011).

Por otro lado, la reabsorción de aminoácidos y péptidos ocurre a nivel del túbulo proximal y del asa de Henle. El transporte es muy específico y en general se considera que los túbulos reabsorben el 99% de la carga filtrada de aminoácidos. Además, existen peptidasas a nivel de las

membranas en ribete de cepillo, capaces de clivar oligopéptidos (glutación, angiotensina y muchas otras) y volcarlos al interior del lumen, de manera extremadamente rápida. En consecuencia, existe una pequeña cantidad de aminoácidos y péptidos capaces de aparecer en la orina final. Esta aminoaciduria fisiológica se puede transformar en hiperaminoaciduria si los mecanismos de reabsorción son defectuosos o se encuentran anulados por una carga filtrada elevada de aminoácidos (hiperaminoaciduria renal o prerrenal respectivamente) (Magalhães P *et al.*, 2018).

Los animales OUB24 presentaron glucosuria y proteinuria. La lesión renal obstructiva se manifiesta principalmente a nivel del sistema tubular de la nefrona. En general, las células epiteliales pueden presentar varias modificaciones degenerativas y perder las estructuras del ribete en cepillo (Forbes MS *et al.*, 2012; Xu Y *et al.*, 2013). Sin embargo, cuando la obstrucción es prolongada (días a semanas), el glomérulo también puede verse seriamente afectado. Se ha descrito que el estrés oxidativo y la muerte masiva de células tubulares ocasionan una remodelación en la unión glomerulotubular que conduce a la separación completa del glomérulo del túbulo proximal y a la formación de glomérulos atubulares. Además, los glomérulos reducen su tamaño considerablemente y adquieren forma de “s” (Chevalier RL *et al.*, 2011). En los animales OUB24 los aumentos observados en los niveles de glucosa y proteínas totales en orina podrían deberse tanto a daño tubular como glomerular. Probablemente exista una disrupción de la membrana de ultrafiltración a nivel glomerular y/o alteraciones en los transportadores de glucosa y proteínas, ocasionados por la pérdida de integridad estructural de las membranas, que estén ocasionando el aumento de los niveles de glucosa y proteínas en orina.

La fosfatasa alcalina es una hidrolasa presente en casi todos los tejidos del organismo, especialmente en el epitelio de los túbulos proximales renales. Se ha descrito que la detección de actividad urinaria de esta enzima es consecuencia de lesiones en la membrana apical que originan pérdidas de integridad en la estructura de las microvellosidades de las células del túbulo proximal, por lo que usualmente es utilizada como un marcador de daño a nivel proximal (Di Carlo *et al.*, 2007). Cuando se analizó la actividad de esta enzima en la orina de los animales OUB, no se registraron aumentos significativos para ninguno de los grupos experimentales analizados. Al respecto, cabe aclarar que, en muchas ocasiones, la actividad de diversas proteínas en orina puede verse afectada por la presencia de moléculas interferentes y por las características fisicoquímicas propias de dicho fluido, generando pérdidas de actividad y dificultad en la detección (Han WK *et al.*, 2002). Por tal motivo, en este modelo experimental, la actividad de fosfatasa alcalina en orina no sería un buen parámetro para la detección de la lesión renal obstructiva, debido a su falta de sensibilidad.

Para completar el análisis de la función renal, se realizaron estudios histopatológicos en cortes de riñón, mediante tinción con hematoxilina-eosina. Las imágenes obtenidas mostraron fibrosis intersticial y descamación celular en los grupos OUB5 y OUB24, además de una marcada dilatación tubular en OUB24. Por otro lado, la cuantificación de las alteraciones mediante el establecimiento de un *score* de daño tubular mostró que las lesiones en la arquitectura renal fueron más severas para estos dos grupos, en comparación con la histología normal observada en los grupos Sham, OUB1 y OUB2.

*Esta primera etapa permitió la caracterización del modelo experimental de nefropatía obstructiva. Los animales sometidos a 5 y 24 horas de obstrucción de uréteres (OUB5 y OUB24) presentaron alteraciones en los marcadores de lesión renal evaluados, como urea y creatinina en plasma, clearance renal de creatinina y NGAL<sub>ur</sub>. Además, el análisis de las excreciones fraccionales de agua y osmoles, así como la evaluación de otros parámetros en orina, permitieron constatar la instauración del cuadro de diuresis postobstructiva en estos dos grupos experimentales. Por otro lado, los estudios histológicos mostraron lesiones estructurales de relevancia en el tejido renal de ambos grupos.*

## **5.2 Excreción urinaria y expresión renal del Transportador de aniones orgánicos 5 (Oat5) en ratas con nefropatía obstructiva**

El Transportador de aniones orgánicos 5 (Oat5, Slc22a19) es uno de los miembros de la familia de Transportadores de Aniones Orgánicos (Oat<sub>s</sub>) que se expresa exclusivamente en el riñón, en las membranas apicales de los túbulos proximales (principalmente segmentos S2 y S3). Allí, actúa como un intercambiador de aniones orgánicos por dicarboxilatos de 4 y 5 carbonos (como succinato y  $\alpha$ -cetoglutarato), y es capaz de interactuar con una variedad heterogénea de compuestos, tanto metabolitos endógenos como agentes tóxicos. Entre ellos se destacan importantes hormonas esteroideas, como los sulfatos de estrona y dehidroepiandrosterona, y la ocratoxina A, una toxina producida por diferentes especies de *Aspergillus* y *Penicillium*, responsables de la contaminación alimentaria. Además, se ha observado que Oat5 tiene la capacidad de transportar determinados compuestos farmacológicos de importancia clínica tales como la furosemida, la bumetanida, la penicilina G y los fármacos antiinflamatorios no esteroides. Sin embargo, una característica que lo distingue de los demás miembros de su familia es su incapacidad para transportar el anión paraaminohipurato (PAH), un sustrato prototipo de los Oat<sub>s</sub> (Youngblood GL y Sweet DH, 2004; Anzai N *et al.*, 2005; Kwak JO *et al.*, 2005).

La detección urinaria de Oat5 se describió por primera vez en un estudio previo de nuestro laboratorio (Di Giusto G *et al.*, 2009). Este transportador ha sido extensamente estudiado en diversos modelos preclínicos de daño renal agudo, y su excreción urinaria (Oat5<sub>u</sub>) ha sido propuesta como un novedoso biomarcador temprano de lesión renal isquémica (Di Giusto G *et al.*, 2009), lesión renal inducida por calcificación vascular (Hazelhoff MH *et al.*, 2013) y nefrotoxicidad inducida por cloruro mercúrico (Di Giusto G y Torres AM, 2010), cisplatino (Bulacio RP y Torres AM, 2013, 2015; Bulacio RP *et al.*, 2015) y metrotexate (Severin MJ *et al.*, 2016, 2019).

En el presente trabajo de Tesis, uno de los objetivos fue determinar si la excreción urinaria de Oat5 (Oat5<sub>u</sub>) también podría ser considerada como un biomarcador de lesión renal obstructiva. Cabe destacar que este es el primer trabajo que estudia la excreción urinaria y la expresión renal de Oat5 en patologías renales obstructivas. Para ello, se determinó la abundancia urinaria de Oat5 en diferentes grupos de animales sujetos a 1, 2, 5 y 24 horas de OUB (ver capítulo “Materiales y Métodos”) y se la comparó con los marcadores tradicionales de daño renal (urea y creatinina), y con un marcador más reciente, la excreción urinaria de la Lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL<sub>u</sub>). Oat5<sub>u</sub> aumentó significativamente en todos los grupos experimentales (OUB1, OUB2, OUB5 y OUB24), en comparación con los animales Sham. Por su parte, la urea y la creatinina aumentaron sólo cuando el daño fue severo (OUB24), y el *clearance* renal de creatinina sólo disminuyó en algunos grupos OUB (OUB5 y OUB24). En contraste con los niveles plasmáticos de urea y creatinina y el *clearance* renal de creatinina, Oat5<sub>u</sub> mostró alteraciones incluso a tiempos cortos de obstrucción ureteral (OUB1), grupo experimental en el cuál no se detectaron cambios en los otros parámetros evaluados.

Por otro lado, como se mencionó en el capítulo “Introducción”, NGAL es una proteína pequeña (25 kDa) que se induce tempranamente en el riñón, en respuesta al daño tubular. Varios estudios reportaron aumentos en los niveles urinarios de esta proteína mucho antes de que se evidenciaran alteraciones en los niveles de creatinina plasmática (Mishra J *et al.*, 2003, 2004). Por ello, actualmente la NGAL<sub>u</sub> es considerada como un prometedor biomarcador temprano y sensible para el diagnóstico de la lesión renal aguda. Además, recientemente se ha informado un aumento en la excreción urinaria de NGAL en el contexto de la obstrucción de la unión ureteropélvica (UPJO) y en cuadros de nefropatía obstructiva aguda (Lucarelli G *et al.*, 2014; Urbschat A *et al.*, 2014). En este trabajo, también se evaluó la excreción urinaria de NGAL y se observó un aumento significativo sólo en los grupos OUB5 y OUB24. Los grupos OUB1 y OUB2 no mostraron modificaciones en la NGAL<sub>u</sub> y, si se comparan la excreción urinaria de Oat5 con la de NGAL se puede observar que, aunque los niveles urinarios de ambas proteínas

aumentaron significativamente en OUB5 y OUB24, el aumento fue mucho mayor para Oat5 (>800%) que para NGAL (~300%), en OUB24 por ejemplo. Por lo tanto, con estos resultados, se podría sugerir que a tiempos prolongados de obstrucción (24 horas), la **Oat5<sub>u</sub> detecta el daño renal obstructivo con una mayor sensibilidad** que la que ofrecen otros biomarcadores como la NGAL<sub>u</sub>. Por otro lado, cuando el tiempo de obstrucción fue muy corto (OUB1), el único parámetro modificado fue Oat5<sub>u</sub>. Ni los indicadores clásicos de disfunción renal, como la urea o la creatinina en plasma, el *clearance* renal de creatinina, los niveles urinarios de glucosa o proteínas totales, la actividad de fosfatasa alcalina en orina o las excreciones fraccionales de H<sub>2</sub>O y osmoles; ni otros biomarcadores descritos más recientemente, como la NGAL<sub>u</sub>, se alteraron en respuesta a la lesión renal obstructiva. Por lo tanto, **Oat5<sub>u</sub> podría ser considerada también como un biomarcador temprano y más sensible que otros indicadores para predecir la lesión renal obstructiva.**

Con el fin de indagar acerca del origen del aumento observado en la excreción urinaria de Oat5, y para caracterizar las modificaciones en la expresión renal de este transportador en condiciones de enfermedad renal obstructiva, se evaluó su abundancia proteica en homogenados totales de riñón y en membranas apicales renales, obtenidas según lo descrito en el ítem 3.7.2 del capítulo “Materiales y Métodos”. Tanto en los homogenados totales como en las membranas apicales renales, Oat5 disminuyó progresivamente en todos los grupos experimentales analizados. Esto podría explicarse por un aumento en los procesos de degradación o una disminución en la síntesis de *ново* de la proteína, inducidos por la nefropatía obstructiva, ó por el vertido de la proteína hacia la luz tubular. En las membranas apicales, la disminución de Oat5 fue más pronunciada que en los homogenados totales. Por lo tanto, esta disminución podría ser consecuencia de un aumento en el proceso de endocitosis y/o una disminución en la translocación del transportador hacia la membrana plasmática, también inducidos por la condición patológica.

Los resultados obtenidos a través de la técnica de electroforesis y *Western blotting* fueron corroborados mediante estudios comparativos de inmunohistoquímica en cortes de tejido renal. Las imágenes de microscopía óptica mostraron una marcación a nivel de la membrana apical de las células del túbulo proximal, sitio donde se ha descrito que esta proteína es funcional (Anzai N *et al.*, 2005). Particularmente, en los riñones de todos los grupos OUB, la marcación disminuyó respecto de lo observado en los riñones Sham. Además, en OUB24 la señal prácticamente desapareció de la membrana apical, apareciendo algo difusa en el interior celular.

Estos resultados respaldan a los obtenidos mediante la técnica de electroforesis y *Western blotting*.

Otros estudios han examinado el efecto de la obstrucción bilateral de uréteres sobre la expresión renal de diferentes miembros de la familia Oat. En un modelo de 24 horas de OUB seguido de 24 horas de recuperación, Villar SR *et al.* (2005, 2008) observaron una disminución en la expresión de Oat1 y Oat3 en la membrana basolateral. Además, se sabe que la disminución en la expresión renal de Oat1 está mediada por la acción de angiotensina II y la activación de la vía de la proteínquinasa C (PKC) (VanWert AL *et al.*, 2010). Al respecto, también es sabido que la nefropatía obstructiva ocasiona un aumento en la expresión de angiotensina II, agente vasoconstrictor de relevancia por su papel en la regulación de la hemodinámica renal (Ucero AC *et al.*, 2010). Según los resultados obtenidos en este trabajo, se podría sugerir que las alteraciones observadas en la expresión renal de Oat5 siguen un patrón de respuesta similar al manifestado por otros miembros de la familia Oat (Oat1/Oat3), frente a la lesión renal obstructiva, y que este comportamiento también podría estar desencadenado por angiotensina II y mediado por la activación de PKC. Sin embargo, se necesitan más estudios para comprobar esta hipótesis.

Las alteraciones observadas en la expresión renal de Oat5 adquieren relevancia farmacocinética ya que, en situaciones de daño renal obstructivo, pueden ocurrir modificaciones en el manejo renal de los metabolitos y/o agentes farmacológicos transportados por Oat5. En pacientes con nefropatía obstructiva, medicamentos como la furosemida, la penicilina G o los antiinflamatorios no esteroideos pueden presentar modificaciones en distintas variables farmacocinéticas, entre ellas el tiempo de vida media de eliminación, y por lo tanto, aumentar el riesgo de efectos adversos. Estas cuestiones deberían ser tenidas en cuenta al diseñar las pautas de dosificación y los planes terapéuticos en estos pacientes, para evitar futuras complicaciones.

*Con base en los resultados expuestos hasta aquí, la Oat5<sub>u</sub> podría ser considerada como un biomarcador diagnóstico temprano y sensible de lesión renal obstructiva, dado que aumentó a periodos muy cortos de obstrucción (1 hora) y en mayor proporción respecto de otros, aún cuando no se evidenciaron alteraciones en los parámetros tradicionales de lesión renal, como la urea y la creatinina en plasma, el clearance renal de creatinina, los niveles urinarios de glucosa y proteínas totales, la actividad de fosfatasa alcalina en orina o las excreciones fraccionales de H<sub>2</sub>O y osmoles; ni en otros biomarcadores de daño renal caracterizados más recientemente, como la NGAL<sub>u</sub>.*

*Por otro lado, se pudo observar que ocurren modificaciones en la expresión renal de Oat5 en situaciones de daño renal obstructivo, por lo tanto es probable que los fármacos transportados por esta proteína presenten alteraciones en alguna de sus propiedades farmacocinéticas, cuestión de relevancia en el diseño de planes terapéuticos para pacientes con nefropatía obstructiva.*

### **5.3 Excreción urinaria y expresión renal del Cotransportador Na<sup>+</sup>/Dicarboxilatos 1 (NaDC1) en ratas con nefropatía obstructiva**

El Cotransportador Na<sup>+</sup>/Dicarboxilatos 1 (NaDC1, Slc13a2) es el miembro mejor caracterizado de la familia de transportadores para dicarboxilatos y tricarboxilatos en mamíferos. Se localiza en la membrana apical de las células del túbulo proximal renal y en las células del intestino delgado, donde media la absorción de intermediarios del ciclo de Krebs, como succinato y citrato. Dado que NaDC1 se expresa principalmente en aquellos epitelios que tienen altas necesidades metabólicas, se considera que desempeña un rol importante en el mantenimiento del metabolismo oxidativo celular. Sin embargo, su papel fisiológico principal es el manejo renal del citrato (Berjeron MJ *et al.*, 2013; Pajor AM, 2014; Colas C *et al.*, 2017).

La detección urinaria de NaDC1 se describió por primera vez en un estudio previo de nuestro laboratorio (Di Giusto G *et al.*, 2009). Existen algunos trabajos que analizan el comportamiento de este transportador en situaciones patológicas tales como la colestasis extrahepática o el daño renal isquémico (Di Giusto G *et al.*, 2009; Brandoni A y Torres AM, 2015). Sin embargo, se desconocen las modificaciones que ocurren en la excreción urinaria y/o en la expresión renal de NaDC1 durante el daño renal obstructivo. Por lo tanto, otro de los objetivos del presente trabajo de Tesis, fue analizar el potencial de la excreción urinaria de NaDC1 (NaDC1<sub>u</sub>) como biomarcador de nefropatía obstructiva, y ahondar en el conocimiento acerca de su expresión renal en situaciones de obstrucción bilateral de uréteres.

La excreción urinaria de NaDC1 se analizó en los diferentes grupos experimentales y posteriormente se la comparó con los niveles plasmáticos de urea y creatinina, con el *clearance* renal de creatinina, y con el biomarcador de lesión renal NGAL<sub>u</sub>. NaDC1<sub>u</sub> aumentó significativamente en todos los grupos experimentales, inclusive en aquellos con periodos de tiempo cortos de obstrucción (OUB1). Además, el aumento relativo registrado para NaDC1<sub>u</sub> fue mucho mayor que el observado para NGAL<sub>u</sub> (>700% vs. ~300% respectivamente, en OUB24). Estos resultados permitirían sugerir que, al igual que la Oat5<sub>u</sub>, **la NaDC1<sub>u</sub> tendría la capacidad de detectar la lesión renal obstructiva con una mayor sensibilidad**, respecto de otros

biomarcadores ya descriptos. Además, el hecho de que  $\text{NaDC1}_u$  haya aumentado en OUB1, aún cuando la urea y la creatinina en plasma, el *clearance* renal de creatinina, los niveles urinarios de glucosa y proteínas totales, la actividad de fosfatasa alcalina en orina, las excreciones fraccionales de  $\text{H}_2\text{O}$  y osmoles y la  $\text{NGAL}_u$  no presentaron modificaciones, permitirían postular a la **excreción urinaria de esta proteína como un biomarcador temprano de lesión renal obstructiva**.

Por otro lado, se observó que a medida que aumentaba el período de obstrucción ureteral,  $\text{NaDC1}_u$  fue mayor, mostrando un patrón de incremento aparentemente regular a lo largo de todos los grupos experimentales analizados. Estos resultados motivaron la indagación acerca de una probable correlación entre  $\text{NaDC1}_u$  y el tiempo de obstrucción. Se realizó un análisis de regresión no lineal, particularmente una regresión del tipo Michaelis-Menten, la cual permitió confirmar la correlación positiva entre ambas variables, con un alto grado de significación ( $r^2=0,9126$ ;  $p<0,05$ ). Además, cuando la obstrucción fue prolongada (OUB24), la abundancia de  $\text{NaDC1}$  en la orina alcanzó una meseta, lo que podría interpretarse como un límite en la cantidad de proteína que puede ser volcada en la orina. Estos resultados indican que el periodo de tiempo de obstrucción determina la cantidad de  $\text{NaDC1}$  que aparece en la orina. Por lo tanto, conociendo la abundancia urinaria de este transportador, se podría predecir el tiempo de duración de la obstrucción renal. Es importante señalar que la nefropatía obstructiva es una patología evolutiva, es decir, que una vez que el daño renal ha alcanzado un cierto nivel, la función renal disminuirá de manera irreversible independientemente de la presencia o ausencia de los eventos primarios que hayan iniciado el proceso (Villar SR *et al.*, 2008). En este sentido, se ha demostrado que el tiempo de liberación de la obstrucción es un factor relevante en el pronóstico del deterioro de la función renal a largo plazo (Klahr S, 2000). Teniendo en cuenta que la duración de la obstrucción es uno de los factores determinantes del deterioro y de la capacidad de recuperación renal,  $\text{NaDC1}_u$  también podría ser considerado como un excelente **biomarcador del tiempo transcurrido desde el inicio de la lesión obstructiva**. Serán necesarios otros estudios para determinar si la  $\text{NaDC1}_u$  también es capaz de identificar un umbral por encima del cual el daño renal se vuelve irreversible, a pesar de que los conductos urinarios ya hayan sido liberados.

En el riñón, las funciones de  $\text{NaDC1}$  de mayor relevancia clínica son la regulación de las concentraciones urinarias de citrato y la generación de un gradiente de dicarboxilatos necesario para el correcto funcionamiento de otros transportadores renales como el transportador de aniones orgánicos Oat5 (Berjeron MJ *et al.*, 2013; Pajor AM, 2014; Colas C *et al.*, 2017). Por otro lado, la regulación de los niveles intrarenales de dicarboxilatos es crucial en situaciones

patológicas debido a que estos metabolitos son esenciales para la reparación del tejido después de una lesión (Weinberg JM *et al.*, 2000). Por ello, en una segunda instancia, para profundizar en el conocimiento acerca de los mecanismos fisiopatológicos involucrados en el desarrollo de la lesión renal obstructiva, se evaluó la expresión renal de NaDC1 y su función, a través del estudio de la excreción urinaria de uno de sus principales sustratos, el citrato.

Trabajos previos realizados por Brandoni y Torres (2015) mostraron un aumento en la expresión renal de NaDC1 renal en correlación con una disminución de la excreción urinaria de citrato, en presencia de colestasis extrahepática. Por el contrario, Di Giusto *et al.* (2009) observaron una disminución en la expresión de NaDC1 en riñones de ratas con lesión renal isquémica. En este trabajo de Tesis, la expresión renal de NaDC1 se analizó en muestras de homogenados totales de riñón y de membranas apicales renales aisladas de los diferentes grupos experimentales. No se observaron diferencias en la expresión renal de NaDC1 entre los grupos OUB1 y OUB2. Por el contrario, NaDC1 mostró disminuciones significativas tanto en los homogenados como en las membranas apicales renales de los animales OUB5 y OUB24. Estos resultados podrían indicar que, cuando el daño es severo, los procesos de síntesis y/o degradación de la proteína pueden verse alterados; es decir, podría estar ocurriendo un aumento de la degradación o una disminución de la síntesis proteica, además del vertido de la proteína hacia la luz tubular, como posibles causas de la disminución de expresión observada. No obstante, a pesar de que la disminución en las membranas plasmáticas fue de similar magnitud respecto de los homogenados, no se puede descartar un compromiso de los mecanismos de endocitosis o de traslocación de esta proteína hacia la membrana plasmática. De todos modos, son necesarios más estudios para corroborar estas hipótesis. Por otro lado, la técnica de inmunohistoquímica realizada en cortes de tejido renal permitió observar una marcación a nivel de la membrana apical de las células del túbulo proximal. La marcación de NaDC1 disminuyó en los riñones OUB5 y OUB24, en comparación a lo observado en los riñones Sham, OUB1 y OUB2, y estos resultados estarían en concordancia con lo hallado mediante la técnica de *Western blotting*.

Asimismo, la excreción fraccional de citrato se incrementó en los animales OUB5 y OUB24. Teniendo en cuenta que la concentración final de citrato en la orina deriva principalmente de su reabsorción y metabolismo en el túbulo proximal, y que además este sitio parece ser el único segmento involucrado en el procesamiento del citrato luminal (Curthoys NP y Moe OW, 2014), el aumento observado en la excreción urinaria de citrato podría ser una consecuencia directa de la disminución de los niveles de NaDC1 en la membrana apical de la célula tubular proximal registrada en los mismos grupos experimentales.

El citrato es el ácido orgánico más abundante en la orina, capaz de formar complejos con iones de calcio y magnesio e impedir la aglomeración y el crecimiento de cristales sólidos. La relación entre la excreción urinaria de citrato y la nefrolitiasis de calcio ha sido bien documentada (Pinheiro VB *et al.*, 2013; Bos S *et al.*, 2014; Udomsilp P *et al.*, 2018; Rimer JD *et al.*, 2019). En condiciones normales, el citrato actúa como un inhibidor de la formación de cálculos renales mediante la formación de citrato de calcio en lugar de oxalato de calcio. Se ha informado que la incidencia de hipocitraturia (bajos niveles de citrato urinario) es de 20 a 60% en pacientes con nefrolitiasis cálcica (Pinheiro VB *et al.*, 2013; Bos S *et al.*, 2014; Rimer JD *et al.*, 2018; Udomsilp P *et al.*, 2018). Como se mencionó en el capítulo “Introducción”, las obstrucciones del tracto urinario pueden ser de tipo congénitas o adquiridas. Los pacientes críticamente enfermos, trasplantados o que se someten a procedimientos quirúrgicos en órganos adyacentes al riñón podrían desarrollar alguna condición física que bloquee temporalmente el flujo de orina, como cálculos renales. Por lo tanto, el aumento en la excreción urinaria de citrato podría responder a un mecanismo compensatorio del organismo para tratar de prevenir cualquier situación de obstrucción del tracto urinario.

*La NaDC1<sub>u</sub> podría ser considerada como un biomarcador diagnóstico temprano y sensible de lesión renal obstructiva, dado que aumentó a periodos muy cortos de obstrucción (OUB1) y en mayor proporción, aún cuando no se evidenciaron alteraciones en otros parámetros de lesión renal como la urea y la creatinina en plasma, el clearance renal de creatinina, los niveles urinarios de glucosa y proteínas totales, la actividad de fosfatasa alcalina en orina, las excreciones fraccionales de H<sub>2</sub>O y osmoles o la NGAL<sub>u</sub>. Además, se observó una correlación positiva entre la NaDC1<sub>u</sub> y el tiempo de obstrucción ureteral, por lo tanto, la NaDC1<sub>u</sub> también tendría el potencial de brindar información acerca del tiempo transcurrido desde el inicio de la lesión obstructiva.*

*Por otro lado, la expresión renal de NaDC1 disminuyó significativamente en paralelo con el aumento en la excreción urinaria de uno de sus principales sustrato, el citrato. Este aumento en la excreción fraccional de citrato podría explicarse, al menos en parte, por la disminución en la abundancia de NaDC1 en las membranas apicales renales, lugar donde la proteína es funcional.*

#### **5.4 Excreción urinaria y expresión renal del Polipéptido transportador de aniones orgánicos 1 (Oatp1) en ratas con nefropatía obstructiva**

El Polipéptido transportador de aniones orgánicos 1 (Oatp1, Slco1a1) es el primer miembro descrito de la familia de transportadores Oatp<sub>s</sub>. Ha sido caracterizado como un sistema de transporte bidireccional independiente de sodio, capaz de transportar una gran variedad de metabolitos endógenos y medicamentos de importancia clínica como las estatinas, antagonistas del receptor de angiotensina II, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, glucósidos cardíacos, antibióticos β-lactámicos, entre otros (Roth M *et al.*, 2012; Hagenbuch B y Stieger B, 2013; Murray M y Zhou F, 2017). Inicialmente fue aislado del hígado de rata y posteriormente detectado en células de túbulo proximal renales. En el hígado, se sabe que participa en la captación de compuestos anfipáticos unidos a la albúmina como la bilirrubina, ácidos biliares, conjugados de esteroides y hormonas tiroideas, desde la sangre hacia el interior de los hepatocitos. En el tejido renal, esta proteína transportadora es importante tanto para la secreción de compuestos que ingresan a la célula desde la membrana basolateral, como para la reabsorción de metabolitos que son filtrados a nivel glomerular (Higuchi K *et al.*, 2004; Yang CH *et al.*, 2009). Aunque comúnmente se acepta que el transporte mediado por Oatp1 es independiente de la hidrólisis de ATP y de los gradientes de sodio, cloruro o potasio, otros aspectos del mecanismo son menos conocidos. Se ha informado que el glutatión reducido (GSH) actúa como un contraión y que la actividad de Oatp1 se encuentra influenciada por los gradientes de pH (Leuthold S *et al.*, 2009).

En el presente trabajo de Tesis, se evaluó la excreción urinaria de Oatp1 (Oatp1<sub>u</sub>) para determinar su potencial como biomarcador de nefropatía obstructiva. Cuando las muestras de orina de animales OUB se corrieron en un gel de poliacrilamida, se separaron por SDS-PAGE y se sometieron a electrotransferencia en membranas de nitrocelulosa, se observó una banda definida de 85 kDa, que coincidió con el peso molecular descrito para Oatp1. Esta banda no se detectó en la orina de los animales Sham. Según nuestro conocimiento, este es el primer estudio que informa la detección de Oatp1 en muestras de orina y también el primero que analiza a este transportador en el contexto de la enfermedad renal obstructiva. Oatp1 sólo se detectó en la orina de ratas OUB, incluso cuando el tiempo de obstrucción fue corto (OUB1), grupo en el cual no se observaron alteraciones en los parámetros tradicionales de lesión renal (urea o creatinina en plasma, *clearance* renal de creatinina, niveles urinarios de glucosa o proteínas totales, actividad de fosfatasa alcalina en orina o las excreciones fraccionales de H<sub>2</sub>O y osmoles), ni en la excreción urinaria de NGAL. Aunque el resultado es preliminar, este hallazgo tiene relevancia

clínica. Cuando el monitoreo de la función renal se vuelve esencial, como en pacientes que se someten a procedimientos quirúrgicos o en aquellos que recientemente recibieron un trasplante renal (Van Lint CL *et al.*, 2015), saber si aparece Oatp1 en la orina, podría ser un indicador de que podría haber ocurrido una obstrucción renal previa. Sin embargo, serán necesarios futuros estudios para determinar si Oatp1 es también un indicador de lesión renal aguda inducida por otros agentes. Además, sólo cuando el daño fue grave (OUB24), la excreción de Oatp1 aumentó significativamente en comparación con el resto de los grupos experimentales. Por lo tanto, los niveles de excreción urinaria de Oatp1 también tienen el potencial de informar sobre la gravedad del daño renal que sufre ese riñón.

Los resultados presentados hasta aquí nos permitirían postular a la excreción urinaria de Oatp1 como un **biomarcador novedoso y temprano de nefropatía obstructiva con el potencial de informar sobre la gravedad del daño renal que sufre el riñón obstruido.**

De manera complementaria, se evaluó la expresión de Oatp1 en tejido renal mediante ensayos de *Western blotting* y técnica inmunohistoquímica. Los animales OUB24 mostraron un incremento de Oatp1 en las membranas apicales renales, aunque no hubo cambios de su abundancia en los homogenados. Es probable que después de 24 horas de obstrucción ureteral, el tráfico de Oatp1 hacia la membrana plasmática pueda verse incrementado, y en consecuencia ocurra un mayor reclutamiento de transportadores preformados en las membranas. También podría estar ocurriendo una inhibición en el proceso de internalización del transportador, ambos fenómenos inducidos por la nefropatía obstructiva. Sin embargo, para profundizar en estos aspectos son necesarios otro tipo de estudios más específicos.

Las alteraciones observadas en la expresión renal de Oatp1 son de relevancia clínica dado que, se trata de una estrategia compensatoria del organismo para hacer frente al daño renal, que en última instancia afectan al manejo renal de los metabolitos y/o fármacos que se excretan por la vía renal a través de Oatp1, y que pueden tener serias consecuencias a nivel farmacocinético.

*Según nuestros conocimientos, este es el primer estudio que reporta la detección de Oatp1 en muestras de orina. La banda inmunoreactiva de 85 kDa, esperada según el peso molecular descrito para Oatp1, no apareció en las muestras de orina de los animales Sham. Oatp1<sub>u</sub> apareció en todos los grupos OUB analizados, inclusive en aquellos que no mostraron alteraciones de la función renal. En el grupo OUB24, Oatp1<sub>u</sub> presentó un aumento marcadamente superior respecto de lo observado en el resto de los grupos OUB. Por lo tanto, los resultados presentados en esta sección, nos permitirían postular a la excreción urinaria de*

*Oatp1 como un biomarcador diagnóstico temprano de la enfermedad renal obstructiva, con el potencial de informar acerca de la severidad del daño sufrido por el riñón hasta ese momento.*

*En paralelo, el análisis de la expresión renal de Oatp1 mostró un aumento significativo en las membranas apicales renales del grupo OUB24. Por lo tanto, en presencia de obstrucciones renales prolongadas, estas alteraciones podrían tener consecuencias en el manejo renal de los metabolitos y/o fármacos transportados por Oatp1, que son excretados principalmente por la vía renal.*

### **5.5 Análisis comparativo de la excreción urinaria de potenciales biomarcadores de lesión renal en ratas con nefropatía obstructiva**

Uno de los mayores retos de la medicina actual es intentar predecir o estimar el riesgo de sufrir un evento patológico en una persona sana o en un paciente concreto. De ahí el interés creciente en el estudio y desarrollo de nuevos biomarcadores diagnósticos y pronósticos de enfermedades de complejo abordaje como la enfermedad renal.

Particularmente, la lesión renal aguda es una enfermedad de desarrollo progresivo, que evoluciona en diferentes estadios en los que se van incrementando las manifestaciones clínicas (Bellomo R *et al.*, 2012). Dichos estadios se establecen según la función renal remanente, medida a través de la estimación de la tasa de filtración glomerular. La progresión suele seguir un patrón constante, dependiendo de la etiología y de las características del paciente, pero puede verse acelerada por diferentes factores patológicos y ralentizados por medidas terapéuticas pautadas (Bellomo R *et al.*, 2012). Si bien las pruebas de laboratorio realizadas en la clínica permiten el diagnóstico y seguimiento de la lesión renal aguda, los parámetros que se miden habitualmente no son buenos indicadores de los cambios en la tasa de filtración glomerular. En general, se considera que los indicadores fisiológicos tradicionales, como la creatinina sérica y la producción de orina, son marcadores tardíos e inespecíficos de disfunción renal; sin embargo, en ausencia de mejores alternativas, siguen teniendo un uso clínico generalizado (Bellomo R *et al.*, 2012).

Cuando se registran las primeras alteraciones en los niveles plasmáticos de urea y creatinina, el deterioro de la función renal ya es manifiesto y se considera que se ha perdido más del 50% de la tasa de filtración glomerular. En este punto, también es posible detectar otro tipo de alteraciones fisiológicas y metabólicas tales como hiperlipidemia, hiperuricemia, alteraciones leves del metabolismo fosfo-cálcico, disminución de la capacidad de concentración urinaria

(poliuria), entre otras (Seijas M *et al.*, 2014). Sin embargo, en los primeros estadios de la enfermedad, la función adaptativa de las nefronas permite mantener una función renal global estable, suficiente como para mantener al paciente asintomático, sin síntomas patológicos visibles. A estas situaciones se las conoce con el término de “subclínicas”. En estos estadios tempranos, existen otros indicadores tanto en plasma como en orina, que comienzan a manifestar alteraciones indicando el comienzo del desarrollo de la lesión renal: aumento en la excreción urinaria de determinadas proteínas (estructurales y/o enzimas) del túbulo proximal (por ejemplo, N-acetil-β-D-glucosaminidasa), inducción de la transcripción génica y de la traducción de determinados ARN mensajeros que solo se expresan como respuesta a la lesión (por ejemplo KIM-1, MCP-1), el aumento en los niveles plasmáticos y urinarios de ciertas moléculas (proteínas, péptidos, ARN mensajeros) que pueden considerarse indicadores de lesión renal (NGAL, cistatina C), entre otras. Es por ello que, actualmente muchas de estas moléculas son consideradas como marcadores de diagnóstico temprano de la enfermedad renal (Seijas M *et al.*, 2014).

En el presente trabajo de Tesis se evaluaron las excreciones urinarias de tres proteínas transportadoras de aniones orgánicos: el Transportador de aniones orgánicos 5 (Oat5), el Cotransportador Na<sup>+</sup>/Dicarboxilatos 1 (NaDC1) y el Polipéptido transportador de aniones orgánicos 1 (Oatp1), en un modelo experimental de nefropatía obstructiva de diferentes niveles de severidad. La obstrucción completa de ambos uréteres durante 24 horas (OUB24) ocasionó un cuadro de daño renal de gravedad, manifestado por el marcado aumento en los niveles plasmáticos de urea y creatinina, la disminución del *clearance* renal de creatinina, el aumento en la excreción urinaria de NGAL, el aumento de las proteínas totales y la glucosa en orina, el aumento en la EF% H<sub>2</sub>O y EF% Osm, y la presencia de alteraciones histopatológicas severas. Además, la excreción urinaria de las tres proteínas analizadas aumentó significativamente en este grupo experimental, respecto del grupo Sham.

En contraposición, cuando la obstrucción ureteral fue de muy corta duración (1 hora, OUB1), ninguno de los parámetros anteriormente mencionados presentó alteraciones, excepto las excreciones urinarias de Oat5, NaDC1 y Oatp1, las cuales presentaron aumentos de considerable magnitud. Es decir, Oat5<sub>u</sub>, NaDC1<sub>u</sub> y Oatp1<sub>u</sub> no sólo se modificaron en paralelo con la alteración en los demás indicadores, cuando el tiempo de obstrucción fue largo y el daño al tejido renal severo (OUB24), sino que también cuando dicho periodo de tiempo fue muy corto (OUB1) y aún no se habían registrado alteraciones en el resto de los parámetros de función renal analizados. Este hecho demuestra la alta sensibilidad de las tres proteínas como biomarcadores tempranos de lesión renal obstructiva.

Cabe destacar que en este modelo experimental de nefropatía obstructiva, el patrón de excreción seguido por las tres proteínas no fue el mismo. La Oat5<sub>u</sub> aumentó en todos los grupos experimentales, apareciendo tempranamente en la orina de los grupos con daño leve y mostrando un pico más marcado en el grupo de mayor compromiso renal. En otros modelos experimentales de lesión renal aguda de diferente etiología, llevados a cabo en nuestro laboratorio, se observó un comportamiento similar de la Oat5<sub>u</sub>. Bulacio RP y Torres AM (2013) trabajaron con un modelo de nefrotoxicidad inducida por dosis crecientes del antineoplásico cisplatino y observaron aumentos tempranos de la Oat5<sub>u</sub> en todos los grupos experimentales analizados, con un pico máximo de excreción con la dosis mayor de cisplatino utilizada (10 mg/kg p.c.). De manera similar, Severin MJ *et al.* (2016) estudiaron la excreción urinaria de Oat5 en un modelo de nefrotoxicidad inducida por metrotexate y observaron aumentos en aquellos grupos tratados con las dosis más altas del antineoplásico, en ausencia de modificaciones en el resto de los parámetros de función renal estudiados. Por su parte, Di Giusto G *et al.* (2009, 2010) analizaron la excreción urinaria de Oat5 en el contexto de la nefrotoxicidad inducida por cloruro mercúrico (Di Giusto G y Torres AM, 2010) y la nefropatía isquémica (Di Giusto G *et al.*, 2009), y observaron aumentos significativos respecto del grupo Sham, a todas las dosis y tiempos ensayados, mientras que la creatinina plasmática y los estudios histopatológicos sólo se alteraron significativamente en el grupo tratado con la dosis más alta de cloruro mercúrico (5 mg/kg p.c.) y en el grupo sometido al periodo isquémico más largo (60 minutos), respectivamente. Todos estos trabajos emplearon modelos experimentales de lesión renal de gravedad creciente y mostraron que la Oat5<sub>u</sub> aumentó tempranamente cuando el grado de daño renal fue leve y presentó un máximo en los casos más severos, momento en el cual comenzaron a observarse las alteraciones en el resto de los parámetros de función renal analizados. Parecería entonces que, independientemente de la causa desencadenante, la determinación de los niveles urinarios de Oat5 serviría como un biomarcador temprano de daño renal de diferentes etiologías, y sería una herramienta eficaz para diferenciar cuadros leves de severos.

Por otro lado, la excreción urinaria de NaDC1 también ha sido estudiada previamente en nuestro laboratorio, en otros modelos de daño renal agudo, para evaluar su potencial como biomarcador (Di Giusto G *et al.*, 2009; Di Giusto G y Torres AM, 2010). En ratas sometidas a periodos de isquemia renal de corta (5 minutos, I5R60) y larga duración (60 minutos, I60R60), NaDC1<sub>u</sub> aumentó significativamente sólo en el grupo experimental I60R60. Asimismo, en ratas tratadas con dosis crecientes de cloruro mercúrico, NaDC1<sub>u</sub> aumentó significativamente sólo en el grupo experimental que recibió la dosis mayor del agente nefrotóxico (5 mg/kg p.c.). A diferencia de lo observado en estos trabajos, en el modelo experimental de nefropatía obstructiva

empleado aquí, la NaDC1<sub>u</sub> mostró un aumento progresivo, con diferencias significativas en todos los grupos experimentales analizados. El análisis de regresión mostró que la concentración urinaria de NaDC1 está correlacionada positivamente con el tiempo de obstrucción ureteral, de manera tal que, la NaDC1<sub>u</sub>, además de ser un indicador con la capacidad de diagnosticar cuadros de daño renal obstructivo leves (OUB1) y severos (OUB24), también tendría la capacidad de predecir cuadros de daño renal de intensidad moderada, de menos de 24 horas, causados por periodos de tiempo de obstrucción variables. Además, cuando la obstrucción fue prolongada (OUB24), la abundancia de NaDC1 en la orina alcanzó una meseta, lo cual indicaría que obstrucciones de más de 24 horas no modifican la cantidad de proteína que puede ser volcada en la orina. Por lo tanto, determinados niveles NaDC1<sub>u</sub> podrían dar indicios acerca de la gravedad del cuadro y la probabilidad de recuperación de la función renal. Es decir, conociendo la abundancia urinaria de este transportador, se podría estimar por cuánto tiempo ese riñón permaneció obstruido y el pronóstico de la enfermedad. Sin embargo, a pesar de lo prometedor de estos resultados, se requieren de más estudios para confirmar esta hipótesis.

Por su parte, la proteína Oatp1 mostró una particularidad: si bien los incrementos observados fueron de menor magnitud respecto de las otras dos proteínas evaluadas (por ejemplo en OUB24: Oat5<sub>u</sub>= 900%; NaDC1<sub>u</sub>= 769%; versus Oatp1<sub>u</sub>= 71%), la banda reactiva apareció sólo en las muestras de orina de los grupos OUB, no observándose señal en las muestras de los animales Sham. Además, al igual que para los casos anteriores, la Oatp1<sub>u</sub> se detectó incluso cuando el tiempo de obstrucción fue muy corto (OUB1), grupo en el cual no se observaron alteraciones en los parámetros tradicionales de función renal, ni en la excreción urinaria de NGAL. Por lo tanto, la Oatp1<sub>u</sub> demostró ser también un biomarcador de diagnóstico temprano de nefropatía obstructiva. Por otro lado, los grupos OUB1, OUB2 y OUB5 mostraron incrementos de similar magnitud, a diferencia de lo observado en el grupo OUB24, en donde la abundancia urinaria de Oatp1 fue significativamente mayor. Al igual que para Oat5<sub>u</sub>, los niveles de excreción urinaria de Oatp1 también tendrían el potencial de informar acerca de la gravedad del daño renal que ha sufrido ese riñón.

A modo de resumen entonces, tanto la Oat5<sub>u</sub> como la NaDC1<sub>u</sub> y la Oatp1<sub>u</sub> podrían ser consideradas como biomarcadores de diagnóstico temprano de nefropatía obstructiva. Los niveles urinarios alcanzados por Oat5 y Oatp1 permitirían diferenciar casos leves de severos, mientras que, la NaDC1<sub>u</sub> tendría la capacidad además de discriminar cuadros de severidad moderada. Y particularmente, la evaluación de la abundancia urinaria de Oatp1 podría considerarse como una herramienta de alta especificidad para detectar la lesión renal obstructiva, dado que sólo apareció en orina cuando ocurrió el evento obstructivo (*Tabla 5.1*).

	<b>Nefropatía Obstructiva</b>
<b>Oat5<sub>u</sub></b>	Diagnóstico Temprano
<b>NaDC1<sub>u</sub></b>	Diagnóstico Temprano Duración de la obstrucción
<b>Oatp1<sub>u</sub></b>	Diagnóstico Temprano

*Tabla 5.1:* Comparación de potenciales biomarcadores urinarios de nefropatía obstructiva

## 5.6 Conclusiones finales

El objetivo del presente trabajo de Tesis consistió en evaluar los niveles urinarios de Oat5, NaDC1 y Oatp1 como potenciales biomarcadores de enfermedad renal obstructiva, empleándose para ello un modelo experimental de nefropatía obstructiva en ratas, basado en la obstrucción completa de ambos uréteres durante diferentes periodos de tiempo de obstrucción. Los distintos experimentos realizados aquí permitieron **caracterizar el comportamiento de las excreciones urinarias de Oat5, NaDC1 y Oatp1**, y los resultados pueden resumirse de la siguiente manera:

- ✓ La **excreción de Oat5 por orina** podría ser utilizada como un **biomarcador diagnóstico de nefropatía obstructiva**, dado que se encontró aumentada en todos los grupos experimentales analizados, luego de periodos de obstrucción ureteral de corta y larga duración. Además, en los grupos con daño renal leve, la Oat5<sub>u</sub> aumentó cuando todavía no se habían hallado alteraciones en otros parámetros tradicionalmente utilizados para evaluar daño renal, por lo que también podría considerarse como un **biomarcador de diagnóstico temprano**.
  
- ✓ La **excreción urinaria de NaDC1** podría ser utilizada como un **biomarcador diagnóstico de nefropatía obstructiva**, dado que se encontró aumentada en todos los grupos experimentales analizados, siguiendo un patrón de crecimiento regular, **correlacionado positivamente con el tiempo de la obstrucción ureteral**. Además, en los grupos con daño renal leve, la NaDC1<sub>u</sub> aumentó cuando todavía no se habían hallado alteraciones en otros parámetros tradicionalmente utilizados para evaluar daño renal, por lo que también podría considerarse como un **biomarcador de diagnóstico temprano**.

✓ La excreción urinaria de Oatp1 podría ser utilizada como un **biomarcador diagnóstico de nefropatía obstructiva**, dado que se encontró **aumentada sólo en los grupos experimentales OUB**, luego de periodos de obstrucción ureteral de corta y larga duración. Además, en los grupos con daño renal leve, la Oatp1<sub>u</sub> aumentó cuando todavía no se habían hallado alteraciones en otros parámetros tradicionalmente utilizados para evaluar lesión renal, por lo que también podría considerarse como un **biomarcador de diagnóstico temprano**.

Los nuevos biomarcadores de lesión renal son herramientas mucho más precisas y sensibles que los marcadores utilizados actualmente en la clínica médica, para el diagnóstico de la lesión renal aguda. Las investigaciones tendientes a su desarrollo están en auge, debido a que la posibilidad futura de incorporarlos en la práctica médica diaria, en forma de *test* de rutina, ofrece una serie de ventajas muy prometedoras: permitirán reconocer diferentes etiologías de lesión renal, establecer la severidad del daño y predecir un posible pronóstico, monitorear la efectividad de un tratamiento, determinar específicamente el sitio donde se produce la injuria, entre otras (Andreucci M *et al.*, 2017; Teo SH *et al.*, 2017; Antonelli A *et al.*, 2018; Beker BM *et al.*, 2018).

Sin embargo, para que un determinado biomarcador pueda ser efectivamente utilizado como un *test* de rutina, debería ser capaz de detectar la enfermedad mediante una técnica relativamente simple y factible. Además, dicho biomarcador debería cumplir con una serie de características: ser específico, sensible, predictivo, rápido y económico, estable *in vivo* e *in vitro*, no invasivo, y tener suficiente relevancia preclínica y clínica como para modificar las decisiones relativas al proceso patológico en que se aplica (Beker BM *et al.*, 2018). Encontrar un único biomarcador que reúna todas estas condiciones y que sea capaz de describir un estado patológico particular en su totalidad no es tarea sencilla. Casi podría considerarse una utopía. En realidad, lo que ocurre generalmente es que los biomarcadores individuales son capaces de mostrar diferentes aspectos de la lesión renal. Algunos muestran el sitio y la extensión del daño, otros reflejan las consecuencias funcionales del daño tubular. Por ejemplo, concentraciones séricas elevadas de cistatina C son indicadoras de cambios en la tasa de filtración glomerular, mientras que las concentraciones urinarias de NGAL están relacionadas con el estrés o la lesión a nivel tubular (Beker BM *et al.*, 2018). Además, cada uno de ellos presenta un perfil de comportamiento particular según el origen y el desarrollo de la enfermedad renal (Beker BM *et al.*, 2018).

Dado que la manifestación de la lesión renal aguda es el resultado final de la interacción compleja y multidimensional de diferentes vías celulares y moleculares, es poco probable que un solo biomarcador proporcione una herramienta de diagnóstico integral. Por ende, se ha propuesto el uso de un conjunto o “panel” de varios biomarcadores, que podría proporcionar un abordaje

más integral acerca del origen y el desarrollo de la enfermedad renal, permitiendo mejoras en el diagnóstico, la toma de decisiones y en la definición de predicciones (Lee CW *et al.*, 2018; McCaffrey J *et al.*, 2015). La capacidad de establecer dichos paneles requiere de la extrapolación de los resultados obtenidos en la investigación preclínica, en estudios clínicos en humanos, que incluyan datos poblacionales y seguimientos a lo largo del tiempo. Dichos estudios permitirán no sólo determinar la utilidad de cada uno de los diferentes biomarcadores, sino que también ayudarán al desarrollo de las intervenciones terapéuticas para mejorar el pronóstico de los pacientes.

El presente trabajo de Tesis aporta nueva información respecto del comportamiento de tres proteínas transportadoras de aniones orgánicos, localizadas en el riñón, en el contexto de la nefropatía obstructiva. Los resultados obtenidos aquí intentan ser el primer paso hacia la construcción de un nuevo panel de biomarcadores de lesión renal obstructiva, para optimizar el diagnóstico y la prognosis de esta enfermedad.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

**Abella, V.; Scotece, M.; Conde, J.; Gómez, R.; Lois, A.; Pino, J.; Gómez-Reino, J.J.; Lago, F.; Mobasher, A.; Gualillo, O. (2015)** The potential of lipocalin-2/NGAL as biomarker for inflammatory and metabolic diseases. *Biomarkers*. 20:565-571.

**Adiyanti, S.S.; Loho, T. (2012)** Acute kidney injury (AKI) biomarker. *Acta Med Indones*. 44:246-255.

**Andreucci, M.; Faga, T.; Pisani, A.; Perticone, M.; Michael, A. (2017)** The ischemic/nephrotoxic acute kidney injury and the use of renal biomarkers in clinical practice. *Eur J Intern Med*. 39:1-8.

**Antonelli, A.; Allinovi, M.; Cocci, A.; Russo, G.I.; Schiavina, R.; Rocco, B.; Giovannalberto, P.; Celia, A.; Galfano, A.; Varca, V.; Bozzini, G.; Ceruti, C.; Greco, F.; Verze, P.; Pastore, A.L.; Porreca, A.; Minervini, A.; AGILE Group (2018)** The predictive role of biomarkers for the detection of acute kidney injury after partial or radical nephrectomy: a systematic review of the literature. *Eur Urol Focus*. S2405-4569(18)30293-1.

**Anzai, N.; Jutabha, P.; Enomoto, A.; Yokoyama, H.; Nonoguchi, H.; Hirata, T.; Shiraya, K.; He, X.; Cha, S.H.; Takeda, M.; Miyazaki, H.; Sakata, 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.

**Bartoli, F.; Penza, R.; Aceto, G.; Niglio, F.; D'Addato, O.; Pastore, V.; Campanella, V.; Magaldi, S.; Lasalandra, C.; Di Bitonto, G.; Gesualdo, L. (2011)** Urinary epidermal growth factor, monocyte chemotactic protein-1, and  $\beta$ 2-microglobulin in children with ureteropelvic junction obstruction. *J Pediatr Surg*. 46:530-536.

**Beker, B.M.; Corleto, M.G.; Fieiras, C.; Musso, C.G. (2018)** Novel acute kidney injury biomarkers: their characteristics, utility and concerns. *Int Urol Nephrol*. 50:705-713.

**Bellomo, R.; Kellum, J.A.; Ronco, C. (2012)** Acute kidney injury. *Lancet*. 380:756-766.

**Bergeron, M.J.; Cléménçon, B.; Hediger, M.A.; Markovich, D. (2013)** SLC13 family of Na<sup>+</sup>-coupled di- and tri-carboxylate/sulfate transporters. *Mol Aspects Med*. 34:299-312.

**Bieniaś, B.; Sikora, P. (2018)** Potential novel biomarkers of obstructive nephropathy in children with hydronephrosis. *Dis Markers*. 2018:1015726.

**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.

**Bos, S.; Nap, R.R.; Wouters, R.S.; Van der Kleij, F.G. (2014)** Hypocitraturia: a common but not well-known cause of nephrolithiasis. *Neth J Med*. 72:545-547.

**Braga, T.T.; Correa-Costa, M.; Silva, R.C.; Cruz, M.C.; Hiyane, M.I.; Da Silva, J.S.; Perez, K.R.; Cuccovia, I.M.; Camara, N.O.S. (2018)** CCR2 contributes to the recruitment of monocytes and leads to kidney inflammation and fibrosis development. *Inflammopharmacology*. 26:403-411.

**Brandoni, A.; Torres, A.M. (2015)** Expression of renal Oat5 and NaDC1 transporters in rats with acute biliary obstruction. *World J Gastroenterol*. 21:8817-8825.

**Brandoni, A.; Torres, A.M. (2017)** Renal expression and urinary excretion of Na-K-2Cl cotransporter in obstructive nephropathy. *Biomed Res Int*. 2017:7171928.

**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.

**Bulacio, R.P.; Anzai, N.; Ouchi, M.; Torres, A.M. (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. *Chem Res Toxicol*. 28:1595-1602.

**Bulacio, R.P.; Torres, A.M. (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*. 87:1953-1962.

**Bulacio, R.P.; Torres, A.M. (2015)** 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*. 89:1359-1369.

**Burckhardt, G. (2012)** Drug transport by organic anion transporters (OATs). *Pharmacol Ther*. 136:106-130.

**Cai, L.; Rubin, J.; Han, W.; Venge, P.; Xu, S. (2010)** The origin of multiple molecular forms in urine of HNL/NGAL. *Clin J Am Soc Nephrol*. 5:2229-2235.

**Califf, R.M. (2018)** Biomarker definitions and their applications. *Exp Biol Med (Maywood)*. 243:213-221.

**Caudarella, R.; Vescini, F.; Buffa, A.; Stefoni, S. (2003)** Citrate and mineral metabolism: kidney stones and bone disease. *Front Biosci*. 8:1084-1106.

**Chevalier, R.L. (2006)** Obstructive nephropathy: towards biomarker discovery and gene therapy. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2:157-168.

**Chevalier, R.L. (2016)** Prognostic factors and biomarkers of congenital obstructive nephropathy. *Pediatr Nephrol*. 31:1411-1420.

**Chevalier, R.L.; Forbes, M.S.; Thornhill, B.A. (2011)** Formation of atubular glomeruli in the developing kidney following chronic urinary tract obstruction. *Pediatr Nephrol*. 26:1381-1385.

- Colas, C.; Schlessinger, A.; Pajor, A.M. (2017)** Mapping functionally important residues in the Na<sup>+</sup>/dicarboxylate cotransporter, NaDC1. *Biochemistry*. 56:4432-4441.
- Curthoys, N.P.; Moe, O.W. (2014)** Proximal tubule function and response to acidosis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 9:1627-1638.
- Czuba, L.C.; Hillgren, K.M.; Swaan, P.W. (2018)** Post-translational modifications of transporters. *Pharmacol Ther*. 192:88-99.
- Danilovic, A.; Lopes, R.I.; Sanches, T.R.; Shimizu, M.H.; Oshiro, F.M.; Andrade, L.; Dénes, F.T.; Seguro, A.C. (2012)** Atorvastatin prevents the downregulation of aquaporin-2 receptor after bilateral ureteral obstruction and protects renal function in a rat model. *Urology*. 80:485.e15-20.
- Decramer, S., Gonzalez de Peredo, A.; Breuil, B.; Mischak, H.; Monsarrat, B.; Bascands, J.L.; Schanstra, J.P. (2008)** Urine in clinical proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 7:1850-1862.
- Devarajan, P.; Murray, P. (2014)** Biomarkers in acute kidney injury: are we ready for prime time? *Nephron Clin Pract*. 127:176-179.
- Di Carlo, M.B.; Gomez, A.G.; Madalena, L.B.; Facio, M.L.; Pizzolato, M.A.; Negri, G.A. (2007)** Utility of urinary alkaline phosphatase as early biomarker of renal tubular failure. *Acta Bioquím Clín Latinoam*. 41, 369-377.
- 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.
- Di Giusto, G.; Torres, A.M. (2009)** Capítulo 34: Acute renal failure models. En: "Experimental surgical models in the laboratory rat". Eds.: Rigalli, A. y Di Loreto, V.E. pp. 177-182. Ed. CRC Press. Taylor & Francis group, U.S.A.
- 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.
- Druml, W. (2014)** Systemic consequences of acute kidney injury. *Curr Opin Crit Care*. 20:613-619.
- Eckhardt, U.; Schroeder, A.; Stieger, B.; Höchli, M.; Landmann, L.; Tynes, R.; Meier, P.J.; Hagenbuch, B. (1999)** Polyspecific substrate uptake by the hepatic organic anion transporter Oatp1 in stably transfected CHO cells. *Am J Physiol*. 276:G1037-G1042.
- Eskild-Jensen, A.; Paulsen, L.F.; Wogensen, L.; Olesen, P.; Pedersen, L.; Frøkiaer, J.; Nyengaard, J.R. (2007)** AT1 receptor blockade prevents interstitial and glomerular apoptosis but not fibrosis in pigs with neonatal induced partial unilateral ureteral obstruction. *Am J Physiol*. 292:F1771-F1781.

**Evans, W.H. (1987)** Capítulo 1: Organelles and membranes of animal cells. En: “Biological membranes. A practical approach”. Eds.: Findlay, J.B. y Evans, W.H. pp. 1-31. Ed. IRL Press, Oxford, Washington DC, U.S.A.

**Farrar, A. (2018)** Acute kidney injury. *Nurs Clin North Am.* 53:499-510.

**Forbes, M.S.; Thornhill, B.A.; Minor, J.J.; Gordon, K.A.; Galarreta, C.I.; Chevalier, R.L. (2012)** Fight-or-flight: murine unilateral ureteral obstruction causes extensive proximal tubular degeneration, collecting duct dilatation, and minimal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 303:F120-F129.

**García Caballero, T.; Gallego, R.; Morel, G. (2012)** Capítulo 1: Técnicas inmunohistoquímicas. En: “Atlas de inmunohistoquímica”. Eds.: Martín-Lacave, I. y García-Caballero, T. pp. 3-73. Ed. Ediciones Díaz de Santos, Madrid, España.

**Geneser, F. (2008)** Capítulo 2: Métodos histológicos. En: “Histología”. Eds.: Geneser, F. pp. 31-62. 3<sup>ra</sup> edición. Ed. Panamericana, Buenos Aires, Argentina.

**Gerber, C.; Harel, M.; Lynch, M.L.; Herbst, K.W.; Ferrer, F.A.; Shapiro, L.H. (2016)** Proximal tubule proteins are significantly elevated in bladder urine of patients with ureteropelvic junction obstruction and may represent novel biomarkers: a pilot study. *J Pediatr Urol.* 12:120.e1-7.

**Gotoh, Y.; Kato, Y.; Stieger, B.; Meier, P.J.; Sugiyama, Y. (2002)** Gender difference in the Oatp1-mediated tubular reabsorption of estradiol 17beta-D-glucuronide in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 282:E1245-E1254.

**Grams, M.E.; Rabb, H. (2012)** The distant organ effects of acute kidney injury. *Kidney Int.* 81:942-948.

**Grandaliano, G.; Gesualdo, L.; Bartoli, F.; Ranieri, E.; Monno, R.; Leggio, A.; Paradies, G.; Caldarulo, E.; Infante, B.; Schena, F.P. (2000)** MCP-1 and EGF renal expression and urine excretion in human congenital obstructive nephropathy. *Kidney Int.* 58:182-192.

**Gunnerson, K.J.; Shaw, A.D.; Chawla, L.S.; Bihorac, A.; Al-Khafaji, A.; Kashani, K.; Lissauer, M.; Shi, J.; Walker, M.G.; Kellum, J.A.; Sapphire Topaz investigators (2016)** TIMP2•IGFBP7 biomarker panel accurately predicts acute kidney injury in high-risk surgical patients. *J Trauma Acute Care Surg.* 80:243-249.

**Hagenbuch, B.; Meier, P.J. (2004)** Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflügers Arch.* 447:653-665.

**Hagenbuch, B.; Stieger, B. (2013)** The SLCO (former SLC21) superfamily of transporters. *Mol Aspects Med.* 34:396-412.

**Han, W.K.; Bailly, V.; Abichandani, R.; Thadhani, R.; Bonventre, J.V. (2002)** Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int.* 62:237-244.

**Hata, S.; Wang, P.; Eftychiou, N.; Ananthanarayanan, M.; Batta, A.; Salen, G.; Pang, K.S.; Wolkoff, A.W. (2003)** Substrate specificities of rat oatp1 and ntcp: implications for hepatic organic anion uptake. *Am J Physiol.* 285:G829-G839.

**Hazelhoff, M.H.; Bulacio, R.P.; Chevalier, A.; Torres, A.M. (2018)** Renal expression of organic anion transporters is modified after mercuric chloride exposure: gender-related differences. *Toxicol Lett.* 295:390-396.

**Hazelhoff, M.H.; Bulacio, R.P.; Torres, A.M. (2013)** Organic anion transporter 5 renal expression and urinary excretion in rats with vascular calcification. *Biomed Res Int.* 2013:283429.

**Hering-Smith, K.S.; Gambala, C.T.; Hamm, L.L. (2000)** Citrate and succinate transport in proximal tubule cells. *Am J Physiol.* 278:F492-F498.

**Hermens, J.S.; Thelen, P.; Ringert, R.H.; Seseke, F. (2007)** Alterations of selected genes of the Wnt signal chain in rat kidneys with spontaneous congenital obstructive uropathy. *J Pediatr Urol.* 3:86-95.

**Higashi, T.; Urai, M.; Taguchi, M.; Hashimoto, Y. (2005)** Mechanism responsible for the decreased hepatic NADPH generation rate in rats with bilateral ureter ligation-induced renal failure. *Biol Pharm Bull.* 28:1809-1812.

**Higuchi, K.; Kobayashi, Y.; Kuroda, M.; Tanaka, Y.; Itani, T.; Araki, J.; Mifuji, R.; Kaito, M.; Adachi, Y. (2004)** Modulation of organic anion transporting polypeptide 1 and multidrug resistance protein 3 expression in the liver and kidney of Gunn rats. *Hepatol Res.* 29:60-66.

**Huang, H.F.; Zhou, J.Y.; Chen, J.H. (2017)** Biomarkers for early diagnosis of acute kidney injury: current progress and clinical prospects. *Curr Protein Pept Sci.* 18:1205-1210.

**Inazaki, K.; Kanamaru, Y.; Kojima, Y.; Sueyoshi, N.; Okumura, K.; Kaneko, K.; Yamashiro, Y.; Ogawa, H.; Nakao, A. (2004)** Smad3 deficiency attenuates renal fibrosis, inflammation, and apoptosis after unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int.* 66:597-604.

**Jacquemin, E.; Hagenbuch, B.; Stieger, B.; Wolkoff, A.W.; Meier, P.J. (1994)** Expression cloning of a rat liver Na(+)-independent organic anion transporter. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91:133-137.

**Jang, H.S.; Padanilam, B.J. (2015)** Simultaneous deletion of Bax and Bak is required to prevent apoptosis and interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *Am J Physiol.* 309:F540-F550.

**Jensen, A.M.; Bae, E.H.; Fenton, R.A.; Nørregaard, R.; Nielsen, S.; Kim, S.W.; Frøkiaer, J. (2009)** Angiotensin II regulates V2 receptor and pAQP2 during ureteral obstruction. *Am J Physiol.* 296:F127-F134.

**Kawahara, T.; Ito, H.; Terao, H.; Uemura, H.; Kubota, Y.; Matsuzaki, J. (2015)** Ureterscopy-assisted retrograde nephrostomy for a large and obstructive renal pelvic stone: a case report. *J Med Case Rep.* 9:44.

- Kim, S.; Jung, E.S.; Lee, J.; Heo, N.J.; Na, K.Y.; Han, J.S. (2018)** Effects of colchicine on renal fibrosis and apoptosis in obstructed kidneys. *Korean J Intern Med.* 33:568-576.
- Kim, S.W.; Lee, J.; Jung, K.; Ma, S.K.; Oh, Y.; Kim, W.Y.; Choi, K.C.; Kim, J. (2004)** Diminished expression of sodium transporters in the ureteral obstructed kidney in rats. *Nephron Exp Nephrol.* 96:e67-76.
- Kim, S.W.; Lee, J.; Park, J.W.; Hong, J.H.; Kook, H.; Choi, C.; Choi, K.C. (2001)** Increased expression of atrial natriuretic peptide in the kidney of rats with bilateral ureteral obstruction. *Kidney Int.* 59:1274-1282.
- Klahr, S. (2000)** Capítulo 89: Obstructive uropathy. En: "The kidney. Physiology and pathology". Eds.: Seldin, D.W. y Giebisch, G. pp. 2473-2512. 3<sup>ra</sup> edición. Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia PA, U.S.A.
- Klein, J.; Gonzalez, J.; Miravete, M.; Caubet, C.; Chaaya, R.; Decramer, S.; Bandin, F.; Bascands, J.L.; Buffin-Meyer, B.; Schanstra, J.P. (2011)** Congenital ureteropelvic junction obstruction: human disease and animal models. *Int J Exp Pathol.* 92:168-192.
- Koepsell, H. (2013)** The SLC22 family with transporters of organic cations, anions and zwitterions. *Mol Aspects Med.* 34:413-435.
- Koyner, J.L.; Shaw, A.D.; Chawla, L.S.; Hoste, E.A.; Bihorac, A.; Kashani, K.; Haase, M.; Shi, J.; Kellum, J.A. (2015)** Sapphire Investigators. Tissue inhibitor metalloproteinase-2 (TIMP-2)·IGF-binding protein-7 (IGFBP7) levels are associated with adverse long term outcomes in patients with AKI. *J Am Soc Nephrol.* 26:1747-1754.
- Koratala, A.; Morales Lappot, J. (2019)** Obstructive nephropathy: simple yet complicated! *Intern Emerg Med.* 14:315-317.
- Kurien, B.T.; Everds, N.E.; Scofield, R.H. (2004)** Experimental animal urine collection: a review. *Lab Anim.* 38:333-361.
- Kwak, J.O.; Kim, H.W.; Oh, K.J.; Ko, C.B.; Park, H.; Cha, S.H. (2005)** Characterization of mouse organic anion transporter 5 as a renal steroid sulfate transporter. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 97:369-375.
- Lacroix, C.; Caubet, C.; Gonzalez-de-Peredo, A.; Breuil, B.; Bouyssié, D.; Stella, A.; Garrigues, L.; Le Gall, C.; Raavel, A.; Massoubre, A.; Klein, J.; Decramer, S.; Sabourdy, F.; Bandin, F.; Burlet-Schiltz, O.; Monsarrat, B.; Schanstra, J.P.; Bascands, J.L. (2014)** Label-free quantitative urinary proteomics identifies the arginase pathway as a new player in congenital obstructive nephropathy. *Mol Cell Proteomics.* 13:3421-3434.
- Layton, A.T.; Bankir, L. (2013)** Impacts of active urea secretion into pars recta on urine concentration and urea excretion rate. *Physiol Rep.* 1 pii: e00034.
- Lee, C.W.; Kou, H.W.; Chou, H.S.; Chou, H.H.; Huang, S.F.; Chang, C.H.; Wu, C.H.; Yu, M.C.; Tsai, H.I. (2018)** A combination of SOFA score and biomarkers gives a better prediction of septic AKI and in-hospital mortality in critically ill surgical patients: a pilot study. *World J Emerg Surg.* 13:41.

- Lee, T.K.; Koh, A.S.; Cui, Z.; Pierce, R.H.; Ballatori, N. (2003)** N-glycosylation controls functional activity of Oatp1, an organic anion transporter. *Am J Physiol.* 285:G371-G381.
- Leuthold, S.; Hagenbuch, B.; Mohebbi, N.; Wagner, C.A.; Meier, P.J.; Stieger, B. (2009)** Mechanisms of pH-gradient driven transport mediated by organic anion polypeptide transporters. *Am J Physiol.* 296:C570-C582.
- Li, A.; Zhang, X.; Shu, M.; Wu, M.; Wang, J.; Zhang, J.; Wang, R.; Li, P.; Wang, Y. (2017)** Arctigenin suppresses renal interstitial fibrosis in a rat model of obstructive nephropathy. *Phytomedicine.* 30:28-41.
- Li, C.; Wang, W.; Norregaard, R.; Knepper, M.A.; Nielsen, S.; Frøkiaer, J. (2007)** Altered expression of epithelial sodium channel in rats with bilateral or unilateral ureteral obstruction. *Am J Physiol.* 293:F333-F341.
- Li, S.S.; He, A.L.; Deng, Z.Y.; Liu, Q.F. (2018)** Ginsenoside-Rg1 protects against renal fibrosis by regulating the Klotho/TGF- $\beta$ 1/Smad signaling pathway in rats with obstructive nephropathy. *Biol Pharm Bull.* 41:585-591.
- Li, W.Q.; Dong, Z.Q.; Zhou, X.B.; Long, B.; Zhang, L.S.; Yang, J.; Zhou, X.G.; Zheng, R.P.; Zhang, J. (2014)** Renovascular morphological changes in a rabbit model of hydronephrosis. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 34:575-581.
- Liu, C.; Lu, X.; Mao, Z.; Kang, H.; Liu, H.; Pan, L.; Hu, J.; Wang, L.; Zhou, F. (2017)** The diagnostic accuracy of urinary [TIMP-2]·[IGFBP7] for acute kidney injury in adults: A PRISMA compliant metaanalysis. *Medicine.* 96:e7484 (Baltimore).
- Liu, M.; Sun, Y.; Xu, M.; Yu, X.; Zhang, Y.; Huang, S.; Ding, G.; Zhang, A.; Jia, Z. (2018)** Role of mitochondrial oxidative stress in modulating the expressions of aquaporins in obstructive kidney disease. *Am J Physiol.* 314:F658-F666.
- Liu, M.; Zhu, Y.; Sun, Y.; Wen, Z.; Huang, S.; Ding, G.; Zhang, A.; Jia, Z.; Zhang, Y. (2017)** MnTBAP therapy attenuates the downregulation of sodium transporters in obstructive kidney disease. *Oncotarget.* 9:394-403.
- Lucarelli, G.; Mancini, V.; Gallegiante, V.; Rutigliano, M.; Vavallo, A.; Battaglia, M.; Ditonno, P. (2014)** Emerging urinary markers of renal injury in obstructive nephropathy. *Biomed Res Int.* 2014:303298.
- Madsen, M.G. (2013)** Urinary biomarkers in hydronephrosis. *Dan Med J.* 60:B4582.
- Magalhães, P.; Pontillo, C.; Pejchinovski, M.; Siwy, J.; Krochmal, M.; Makridakis, M.; Carrick, E.; Klein, J.; Mullen, W.; Jankowski, J.; Vlahou, A.; Mischak, H.; Schanstra, J.P.; Züribig, P.; Pape, L. (2018)** Comparison of urine and plasma peptidome indicates selectivity in renal peptide handling. *Proteomics Clin Appl.* 12:e1700163.
- Mahmood, T.; Yang, P.C. (2012)** Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci.* 4:429-434.

- Mårtensson, J.; Bellomo, R. (2014)** The rise and fall of NGAL in acute kidney injury. *Blood Purif.* 37:304-310.
- Mather, A.; Pollock, C. (2011)** Glucose handling by the kidney. *Kidney Int.* 120:S1-S6.
- Matsuyama, M.; Nomori, A.; Nakakuni, K.; Shimono, A.; Fukushima, M. (2014)** Secreted Frizzled-related protein 1 (Sfrp1) regulates the progression of renal fibrosis in a mouse model of obstructive nephropathy. *J Biol Chem.* 289:31526-31533.
- McCaffrey, J.; Coupes, B.; Chaloner, C.; Webb, N.J.; Barber, R.; Lennon, R. (2015)** Towards a biomarker panel for the assessment of AKI in children receiving intensive care. *Pediatr Nephrol.* 30:1861-1871.
- Mei, W.; Peng, Z.; Lu, M.; Liu, C.; Deng, Z.; Xiao, Y.; Liu, J.; He, Y.; Yuan, Q.; Yuan, X.; Tang, D.; Yang, H.; Tao, L. (2015)** Peroxiredoxin 1 inhibits the oxidative stress induced apoptosis in renal tubulointerstitial fibrosis. *Nephrology (Carlton).* 20:832-842.
- Meola, M.; Samoni, S.; Petrucci, I.; Ronco, C. (2016)** Clinical scenarios in acute kidney injury: post-renal acute kidney injury. *Contrib Nephrol.* 188:64-68.
- Mischak, H. (2015)** Pro: urine proteomics as a liquid kidney biopsy: no more kidney punctures!. *Nephrol Dial Transplant.* 30:532-537.
- 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.
- 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.
- Mohammadjafari, H.; Rafiei, A.; Kosaryan, M.; Yeganeh, Y.; Hosseinimehr, S.J. (2014)** Determination of the severity of ureteropelvic junction obstruction using urinary epidermal growth factor and kidney injury molecule 1 levels. *Biomark Med.* 8:1199-1206.
- Momper, J.D.; Nigam, S.K. (2018)** Developmental regulation of kidney and liver solute carrier and ATP-binding cassette drug transporters and drug metabolizing enzymes: the role of remote organ communication. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 14:561-570.
- Montañés Bermúdez, R.; Gràcia García, S.; Pérez Surribas, D.; Martínez Castelao, A.; Bover Sanjuán, J.; Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular; Sociedad Española de Nefrología. (2011)** Consensus document. Recommendations on assessing proteinuria during the diagnosis and follow-up of chronic kidney disease. *Nefrología.* 31:331-345.
- Mourmouris, P.I.; Chiras, T.; Papatsoris, A.G. (2014)** Obstructive uropathy: from etiopathology to therapy. *World J Nephrol Urol.* 3:1-6.

**Murray, P.T.; Mehta, R.L.; Shaw, A.; Ronco, C.; Endre, Z.; Kellum, J.A.; Chawla, L.S.; Cruz, D.; Ince, C.; Okusa, M.D.; ADQI 10 workgroup (2014)** Potential use of biomarkers in acute kidney injury: report and summary of recommendations from the 10th Acute Dialysis Quality Initiative consensus conference. *Kidney Int.* 85:513-521.

**Murray, M.; Zhou, F. (2017)** Trafficking and other regulatory mechanisms for organic anion transporting polypeptides and organic anion transporters that modulate cellular drug and xenobiotic influx and that are dysregulated in disease. *Br J Pharmacol.* 174:1908-1924.

**Narváez Barros, A.; Guiteras, R.; Sola, A.; Manonelles, A.; Morote, J.; Cruzado, J.M. (2019)** Reversal unilateral ureteral obstruction: a mice experimental model. *Nephron.* 142:125-134.

**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.

**Nilsson, L.; Madsen, K.; Krag, S.; Frøkiær, J.; Jensen, B.L.; Nørregaard, R. (2015)** Disruption of cyclooxygenase type 2 exacerbates apoptosis and renal damage during obstructive nephropathy. *Am J Physiol.* 309:F1035-F1048.

**Nørregaard, R.; Jensen, B.L.; Li, C.; Wang, W.; Knepper, M.A.; Nielsen, S.; Frøkiær, J. (2005)** COX-2 inhibition prevents downregulation of key renal water and sodium transport proteins in response to bilateral ureteral obstruction. *Am J Physiol.* 289:F322-F333.

**Nørregaard, R.; Jensen, B.L.; Topcu, S.O.; Diget, M.; Schweer, H.; Knepper, M.A.; Nielsen, S.; Frøkiær, J. (2007)** COX-2 activity transiently contributes to increased water and NaCl excretion in the polyuric phase after release of ureteral obstruction. *Am J Physiol.* 292:F1322-F1333.

**Noyan, A.; Parmaksiz, G.; Dursun, H.; Ezer, S.S.; Anarat, R.; Cengiz, N. (2015)** Urinary NGAL, KIM-1 and L-FABP concentrations in antenatal hydronephrosis. *J Pediatr Urol.* 11:249.e1-6.

**Obermüller, N.; Geiger, H.; Weipert, C.; Urbschat, A. (2014)** Current developments in early diagnosis of acute kidney injury. *Int Urol Nephrol.* 46:1-7.

**Okabe, H.; Higashi, T.; Ohta, T.; Hashimoto, Y. (2004)** Intestinal absorption and hepatic extraction of propranolol and metoprolol in rats with bilateral ureteral ligation. *Biol Pharm Bull.* 27:1422-1427.

**Olvera-Posada, D.; Dayarathna, T.; Dion, M.; Alenezi, H.; Sener, A.; Denstedt, J.D.; Pautler, S.E.; Razvi, H. (2017)** KIM-1 is a potential urinary biomarker of obstruction: results from a prospective cohort study. *J Endourol.* 31:111-118.

**Pajor, A.M. (2014)** Sodium-coupled dicarboxylate and citrate transporters from the SLC13 family. *Pflügers Arch.* 466:119-130.

- Pap, D.; Sziksz, E.; Kiss, Z.; Rokonay, R.; Veres-Székely, A.; Lippai, R.; Takács, I.M.; Kis, É.; Fekete, A.; Reusz, G.; Szabó, A.J.; Vannay, A. (2017)** Microarray analysis reveals increased expression of matrix metalloproteases and cytokines of interleukin-20 subfamily in the kidneys of neonate rats underwent unilateral ureteral obstruction: a potential role of IL-24 in the regulation of inflammation and tissue remodeling. *Kidney Blood Press Res.* 42:16-32.
- Pelis, R.M.; Wright, S.H. (2014)** SLC22, SLC44, and SLC47 transporters - organic anion and cation transporters: molecular and cellular properties. *Curr Top Membr.* 73:233-261.
- 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.
- Pinheiro, V.B.; Baxmann, A.C.; Tiselius, H.G.; Heilberg, I.P. (2013)** The effect of sodium bicarbonate upon urinary citrate excretion in calcium stone formers. *Urology.* 82:33-37.
- Pope, J.C.; Brock, J.W.; Adams, M.C.; Miyazaki, Y.; Stephens, F.D.; Ichikawa, I. (2001)** Congenital anomalies of the kidney and urinary tract--role of the loss of function mutation in the pluripotent angiotensin type 2 receptor gene. *J Urol.* 165:196-202.
- Prowle, J.R.; Liu, Y.L.; Licari, E.; Bagshaw, S.M.; Egi, M.; Haase, M.; Haase-Fielitz, A.; Kellum, J.A.; Cruz, D.; Ronco, C.; Tsutsui, K.; Uchino, S.; Bellomo, R. (2011)** Oliguria as predictive biomarker of acute kidney injury in critically ill patients. *Crit Care.* 15:R172.
- Prowle, J.; Bagshaw, S.M.; Bellomo, R. (2012)** Renal blood flow, fractional excretion of sodium and acute kidney injury: time for a new paradigm? *Curr Opin Crit Care.* 18:585-592.
- Qin, T.; Du, R.; Huang, F.; Yin, S.; Yang, J.; Qin, S.; Cao, W. (2016)** Sinomenine activation of Nrf2 signaling prevents hyperactive inflammation and kidney injury in a mouse model of obstructive nephropathy. *Free Radic Biol Med.* 92:90-99.
- Quinlan, M.R.; Cronin, P.; Daly, P.J.; Watson, R.W.; Manucha, W.; Docherty, N.G.; Fitzpatrick, J.M. (2010)** A gender comparison of postobstructive injury in the rat kidney. *Kidney Blood Press Res.* 33:266-273.
- Radi, Z.A. (2018)** Immunopathogenesis of acute kidney injury. *Toxicol Pathol.* 46:930-943.
- Ralib, A.M.; Pickering, J.W.; Shaw, G.M.; Than, M.P.; George, P.M.; Endre, Z.H. (2014)** The clinical utility window for acute kidney injury biomarkers in the critically ill. *Crit Care.* 18:601.
- Refaie, M.O.; Abo-Zaid, H.; Gomma, N.A.; Aboul-Enein, H.Y. (2000)** Determination of urinary and serum beta-glucuronidase and alkaline phosphatase in various renal disease and kidney rejection transplanted patients. *Prep Biochem Biotechnol.* 30:93-106.
- Rimer, J.D.; Sakhaee, K.; Maalouf, N.M. (2019)** Citrate therapy for calcium phosphate stones. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 28:130-139.

**Robb, M.A.; McInnes, P.M.; Califf, R.M. (2016)** Biomarkers and surrogate endpoints: developing common terminology and definitions. *JAMA*. 315:1107-1108.

**Rodríguez-Suárez, E.; Siwy, J.; Zürbig, P.; Mischak, H. (2014)** Urine as a source for clinical proteome analysis: from discovery to clinical application. *Biochim Biophys Acta*.1844:884-898.

**Romero-Calvo, I.; Ocón, B.; Martínez-Moya, P.; Suárez, M.D.; Zarzuelo, A.; Martínez-Augustin, O.; De Medina, F.S. (2010)** Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal Biochem*. 401:318-320.

**Roth, M.; Obaidat, A.; Hagenbuch, B. (2012)** OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. *Br J Pharmacol*. 165:1260-1287.

**Samarakoon, R.; Overstreet, J.M.; Higgins, S.P.; Higgins, P.J. (2012)** TGF- $\beta$ 1  $\rightarrow$  SMAD/p53/USF2  $\rightarrow$  PAI-1 transcriptional axis in ureteral obstruction-induced renal fibrosis. *Cell Tissue Res*. 347:117-128.

**Sands, J.M.; Layton, H.E. (2000)** Capítulo 45: Urine concentrating mechanism and its regulation. En: "The kidney. Physiology and pathology". Eds.: Seldin, D.W. y Giebisch, G. pp. 2473-2512. 3<sup>ra</sup> edición. Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia PA, U.S.A.

**Santos, C.; Marcelino, P.; Carvalho, T.; Coelho, J.; Bispo, M.; Mourão, L.; Perdigoto, R.; Barroso, E. (2010)** The value of tubular enzymes for early detection of acute kidney injury after liver transplantation: an observational study. *Transplant Proc*. 42:3639-3643.

**Schanstra, J.P.; Mischak, H. (2015)** Proteomic urinary biomarker approach in renal disease: from discovery to implementation. *Pediatr Nephrol*. 30:713-725.

**Schmidt-Nielsen, B.; Sands, J.A. (2001)** Urea excretion in white rats and kangaroo rats as influenced by excitement and by diet. *J Am Soc Nephrol*. 12:856-864.

**Seijas, M.; Baccino, C.; Nin, N.; Lorente, J.A. (2014)** Definition and biomarkers of acute renal damage: new perspectives. *Med Intensiva*. 38:376-385.

**Sekine, T.; Cha, S.H.; Hosoyamada, M.; Kanai, Y.; Watanabe, N.; Furuta, Y.; Fukuda, K.; Igarashi, T.; Endou, H. (1998)** Cloning, functional characterization, and localization of a rat renal Na<sup>+</sup>-dicarboxylate transporter. *Am J Physiol*. 275:F298-F305.

**Seller-Pérez, G.; Más-Font, S.; Pérez-Calvo, C., Villa-Díaz, P.; Celaya-López, M.; Herrera-Gutiérrez, M.E. (2016)** Acute kidney injury: renal disease in the ICU. *Med Intensiva*. 40:374-382.

**Seseke, F.; Thelen, P.; Ringert, R.H. (2004)** Characterization of an animal model of spontaneous congenital unilateral obstructive uropathy by cDNA microarray analysis. *Eur Urol*. 45:374-381.

**Severin, M.J.; Campagno, R.V.; Brandoni, A.; Torres, A.M. (2019)** Time evolution of methotrexate-induced kidney injury: A comparative study between different biomarkers of renal damage in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 46:828-836.

**Severin, M.J.; Trebucobich, M.S.; Buszniez, P.; Brandoni, A.; Torres, A.M. (2016)** The urinary excretion of an organic anion transporter as an early biomarker of methotrexate-induced kidney injury. *Toxicol Res (Camb).* 5:530-538.

**Shang, W.; Wang, Z. (2017)** The update of NGAL in acute kidney injury. *Curr Protein Pept Sci.* 18:1211-1217.

**Sharma, M.; Kaur, T.; Singla, S.K. (2015)** Protective effects of N-acetylcysteine against hyperoxaluria induced mitochondrial dysfunction in male wistar rats. *Mol Cell Biochem.* 405:105-114.

**Shitara, Y.; Sugiyama, D.; Kusahara, H.; Kato, Y.; Abe, T.; Meier, P.J.; Itoh, T.; Sugiyama, Y. (2002)** Comparative inhibitory effects of different compounds on rat oatpl (slc21a1)- and Oatp2 (Slc21a5)-mediated transport. *Pharm Res.* 19:147-153.

**Slocum, J.L.; Heung, M.; Pennathur, S. (2012)** Marking renal injury: can we move beyond serum creatinine?. *Transl Res.* 159:277-289.

**Smith, S.W.; Croft, A.P.; Morris, H.L.; Naylor, A.J.; Huso, D.L.; Isacke, C.M.; Savage, C.O.; Buckley, C.D. (2015)** Genetic deletion of the stromal cell marker CD248 (Endosialin) protects against the development of renal fibrosis. *Nephron.* 131:265-277.

**Søvik, S.; Isachsen, M.S.; Nordhuus, K.M.; Tveiten, C.K.; Eken, T.; Sunde, K.; Brurberg, K.G.; Beitland, S. (2019)** Acute kidney injury in trauma patients admitted to the ICU: a systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med.* 45:407-419.

**Spaggiari, E.; Faure, G.; Dreux, S.; Czerkiewicz, I.; Stirnemann, J.J.; Guimiot, F.; Heidet, L.; Favre, R.; Salomon, L.J.; Oury, J.F.; Ville, Y.; Muller, F. (2017)** Sequential fetal serum  $\beta$ 2-microglobulin to predict postnatal renal function in bilateral or low urinary tract obstruction. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 49:617-622.

**Springer, A.; Kratochwill, K.; Bergmeister, H.; Csaicsich, D.; Huber, J.; Bilban, M.; Mayer, B.; Mühlberger, I.; Amann, G.; Horcher, E.; Aufricht, C. (2012)** A combined transcriptome and bioinformatics approach to unilateral ureteral obstructive uropathy in the fetal sheep model. *J Urol.* 187:751-756.

**Stanton, B.A.; Koepen, B.M. (1995)** El sistema renal. En: "Fisiología". Eds.: Berne, R.M. y Levy, M.N. pp. 416-476. Ed.: Dogma Libros, España.

**Stødkilde, L.; Madsen, M.G.; Palmfeldt, J.; Topcu, S.O.; Nørregaard, R.; Olsen, L.H.; Jørgensen, T.M.; Frøkiær, J. (2013)** Urinary proteome analysis in congenital bilateral hydronephrosis. *Scand J Urol.* 47:43-51.

**Stødkilde, L.; Nørregaard, R.; Fenton, R.A.; Wang, G.; Knepper, M.A.; Frøkiær, J. (2011)** Bilateral ureteral obstruction induces early downregulation and redistribution of AQP2 and phosphorylated AQP2. *Am J Physiol.* 301:F226-F235.

- Stoyanoff, T.R.; Todaro, J.S.; Aguirre, M.V.; Zimmermann, M.C.; Brandan, N.C. (2014)** Amelioration of lipopolysaccharide-induced acute kidney injury by erythropoietin: involvement of mitochondria-regulated apoptosis. *Toxicology*. 318:13-21.
- Sun, Y.; Zhang, Y.; Zhu, Y.; Zhang, A.; Huang, S.; Yin, X.; Ding, G.; Liu, M.; Jia, Z. (2016)** Inhibition of mitochondrial complex-1 restores the downregulation of aquaporins in obstructive nephropathy. *Am J Physiol*. 311:F777-F786.
- Svoboda, M.; Riha, J.; Wlcek, K.; Jaeger, W.; Thalhammer, T. (2011)** Organic anion transporting polypeptides (OATPs): regulation of expression and function. *Curr Drug Metab*. 12:139-153.
- Taguchi, M.; Urai, M.; Taira, S.; Tanabe, H.; Hashimoto, Y. (2006)** Endogenous uremic substances are not involved in the reduced hepatic extraction of metoprolol in bilateral ureter-ligated rats. *Drug Metab Pharmacokinet*. 21:156-164.
- Taha, M.A.; Shokeir, A.A.; Osman, H.G.; Abd El-Aziz Ael-A, Farahat, S.E. (2007)** Pelvi-ureteric junction obstruction in children: the role of urinary transforming growth factor-beta and epidermal growth factor. *BJU Int*. 99:899-903.
- Taha, M.A.; Shokeir, A.A.; Osman, H.G.M; Abd el-Aziz Ael-A, Farahat, S.E. (2007)** Diagnosis of ureteropelvic junction obstruction in children: role of endothelin-1 in voided urine. *Urology*. 69:560-565.
- Tarantal, A.F.; Han, V.K.; Cochrum, K.C.; Mok, A.; DaSilva, M.; Matsell, D.G. (2001)** Fetal rhesus monkey model of obstructive renal dysplasia. *Kidney Int*. 59:446-456.
- Teo, S.H.; Endre, Z.H. (2017)** Biomarkers in acute kidney injury (AKI). *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 31:331-344.
- Traynor, J.; Mactier, R.; Geddes, C.C.; Fox, J.G. (2006)** How to measure renal function in clinical practice. *BMJ*. 333:733-737
- Truong, L.D.; Gaber, L.; Eknayan, G. (2011)** Obstructive uropathy. *Contrib Nephrol*. 169:311-326.
- Tseng, T.Y.; Stoller, M.L. (2009)** Obstructive uropathy. *Clin Geriatr Med*. 25:437-443.
- Ucero, A.C.; Gonçalves, S.; Benito-Martin, A.; Santamaría, B.; Ramos, A.M.; Berzal, S.; Ruiz-Ortega, M.; Egido, J.; Ortiz, A. (2010)** Obstructive renal injury: from fluid mechanics to molecular cell biology. *Open Access J Urol*. 2:41-55.
- Udomsilp, P.; Saepoo, S.; Ittiwut, R.; Shotelersuk, V.; Dissayabutra, T.; Boonla, C.; Tosukhowong, P. (2018)** rs11567842 SNP in SLC13A2 gene associates with hypocitraturia in Thai patients with nephrolithiasis. *Genes Genomics*. 40:965-972.
- Unwin, R.J.; Capasso, G.; Shirley, D.G. (2004)** An overview of divalent cation and citrate handling by the kidney. *Nephron Physiol*. 98:15-20.

Urbschat, A.; Gauer, S.; Paulus, P.; Reissig, M.; Weipert, C.; Ramos-Lopez, E.; Hofmann, R.; Hadji, P.; Geiger, H.; Obermüller, N. (2014) Serum and urinary NGAL but not KIM-1 raises in human postrenal AKI. *Eur J Clin Invest.* 44:652-659.

Vaidya, V.S.; Ford, G.M.; Waikar, S.S.; Wang, Y.; Clement, M.B.; Ramirez, V.; Glaab, W.E.; Troth, S.P.; Sistare, F.D.; Prozialeck, W.C.; Edwards, J.R.; Bobadilla, N.A.; Mefferd, S.C.; Bonventre, J.V. (2009) A rapid urine test for early detection of kidney injury. *Kidney Int.* 76:108-114.

Van Lint, C.L.; Van der Boog, P.J.; Wang, W.; Brinkman, W.P.; Rövekamp, T.J.; Neerincx, M.A.; Rabelink, T.J.; Van Dijk, S. (2015) Patient experiences with self-monitoring renal function after renal transplantation: results from a single-center prospective pilot study. *Patient Prefer Adherence.* 9:1721-1731.

Vanmassenhove, J.; Vanholder, R.; Nagler, E.; Van Biesen, W. (2013) Urinary and serum biomarkers for the diagnosis of acute kidney injury: an in-depth review of the literature. *Nephrol Dial Transplant.* 28:254-273.

Van Veldhuisen, D.J.; Ruilope, L.M.; Maisel, A.S.; Damman, K. (2016) Biomarkers of renal injury and function: diagnostic, prognostic and therapeutic implications in heart failure. *Eur Heart J.* 37:2577-2585.

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.

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.

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.

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.* 110:45-56.

Waasdorp, M.; De Rooij, D.M.; Florquin, S.; Duitman, J.; Spek, C.A. (2019) Protease-activated receptor-1 contributes to renal injury and interstitial fibrosis during chronic obstructive nephropathy. *J Cell Mol Med.* 23:1268-1279.

Waikar, S.S.; Bonventre, J.V. (2006) Can we rely on blood urea nitrogen as a biomarker to determine when to initiate dialysis? *Clin J Am Soc Nephrol.* 1:903-904.

Wang, C.Y.; Shie, S.S.; Tsai, M.L.; Yang, C.H.; Hung, K.C.; Wang, C.C.; Hsieh, I.C.; Wen, M.S. (2016) FTO modulates fibrogenic responses in obstructive nephropathy. *Sci Rep.* 6:18874.

**Wang, G.; Li, C.; Kim, S.W.; Ring, T.; Wen, J.; Djurhuus, J.C.; Wang, W.; Nielsen, S.; Frøkiaer, J. (2008)** Ureter obstruction alters expression of renal acid-base transport proteins in rat kidney. *Am J Physiol.* 295:F497-F506.

**Wang, S.J.; Mu, X.N.; Zhang, L.Y.; Liu, Q.Y.; Jin, X.B. (2012)** The incidence and clinical features of acute kidney injury secondary to ureteral calculi. *Urol Res.* 40:345-348.

**Wang, W.; Luo, R.; Lin, Y.; Wang, F.; Zheng, P.; Levi, M.; Yang, T.; Li, C. (2015)** Aliskiren restores renal AQP2 expression during unilateral ureteral obstruction by inhibiting the inflammasome. *Am J Physiol.* 308:F910-F922.

**Wasilewska, A.; Taranta-Janusz, K.; Dębek, W.; Zoch-Zwierz, W.; Kuroczycka-Saniutycz, E. (2011)** KIM-1 and NGAL: new markers of obstructive nephropathy. *Pediatr Nephrol.* 26:579-586.

**Weinberg, J.M.; Venkatachalam, M.A.; Roeser, N.F.; Saikumar, P.; Dong, Z.; Senter, R.A.; Nissim, I. (2000)** Anaerobic and aerobic pathways for salvage of proximal tubules from hypoxia-induced mitochondrial injury. *Am J Physiol.* 279:F927-F943.

**Xi, W.; Zhao, X.; Wu, M.; Jia, W.; Li, H. (2018)** Lack of microRNA-155 ameliorates renal fibrosis by targeting PDE3A/TGF- $\beta$ 1/Smad signaling in mice with obstructive nephropathy. *Cell Biol Int.* 42:1523-1532.

**Xie, Y.; Xue, W.; Shao, X.; Che, X.; Xu, W.; Ni, Z.; Mou, S. (2014)** Analysis of a urinary biomarker panel for obstructive nephropathy and clinical outcomes. *PLoS One.* 9:e112865.

**Xu, Y.; Ruan, S.; Wu, X.; Chen, H.; Zheng, K.; Fu, B. (2013)** Autophagy and apoptosis in tubular cells following unilateral ureteral obstruction are associated with mitochondrial oxidative stress. *Int J Mol Med.* 31:628-636.

**Yachantha, C.; Hossain, R.Z.; Yamakawa, K.; Sugaya, K.; Tosukhowong, P.; Ogawa, Y.; Saito, S. (2009)** Effect of potassium depletion on urinary stone risk factors in Wistar rats. *Urol Res.* 37:311-316.

**Yang, C.H.; Glover, K.P.; Han, X. (2009)** Organic anion transporting polypeptide (Oatp) 1a1-mediated perfluorooctanoate transport and evidence for a renal reabsorption mechanism of Oatp1a1 in renal elimination of perfluorocarboxylates in rats. *Toxicol Lett.* 190:163-171.

**Yang, Y.; Hou, Y.; Wang, C.L.; Ji, S.J. (2006)** Renal expression of epidermal growth factor and transforming growth factor-beta1 in children with congenital hydronephrosis. *Urology.* 67:817-822.

**Yap, S.C.; Lee, H.T. (2012)** Acute kidney injury and extrarenal organ dysfunction: new concepts and experimental evidence. *Anesthesiology.* 116:1139-1148.

**Yokoyama, H.; Wada, T.; Kobayashi, K.; Kuno, K.; Kurihara, H.; Shindo, T.; Matsushima, K. (2002)** A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS)-1 null mutant mice develop renal lesions mimicking obstructive nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 17:39-41.

**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.* 287:F236-F244.

**Yu, L.; Zhou, L.; Li, Q.; Li, S.; Luo, X.; Zhang, C.; Wu, B.; Brooks, J.D.; Sun, H. (2018)** Elevated urinary lipocalin-2, interleukin-6 and monocyte chemoattractant protein-1 levels in children with congenital ureteropelvic junction obstruction. *J Pediatr Urol.* 15:44.e1-44.e7.

**Zhang, F.F.; Pajor, A.M. (2001)** Topology of the Na<sup>+</sup>/dicarboxylate cotransporter: the N-terminus and hydrophilic loop 4 are located intracellularly. *Biochim Biophys Acta.* 1511:80-89.

**Zhang, X.; Aggarwal, P.; Li, X.; Oakman, C.; Wang, Z.; Rodriguez, R. (2009)** The role of lithium carbonate and lithium citrate in regulating urinary citrate level and preventing nephrolithiasis. *Int J Biomed Sci.* 5:215-222.

**Zhang, Y.; Kohan, D.E.; Nelson, R.D.; Carlson, N.G.; Kishore, B.K. (2010)** Potential involvement of P2Y2 receptor in diuresis of postobstructive uropathy in rats. *Am J Physiol.* 298:F634-F642.

**Zhang, Y.; Sun, Y.; Ding, G.; Huang, S.; Zhang, A.; Jia, Z. (2015)** Inhibition of mitochondrial complex-1 prevents the downregulation of NKCC2 and ENaC $\alpha$  in obstructive kidney disease. *Sci Rep.* 5:12480.

**Zhu, W.; Xu, Y.F.; Feng, Y.; Peng, B.; Che, J.P.; Liu, M.; Zheng, J.H. (2014)** Prophylactic effects of quercetin and hyperoside in a calcium oxalate stone forming rat model. *Urolithiasis.* 42:519-526.

## AGRADECIMIENTOS

- ✚ *En primer lugar, quisiera agradecer a mi directora, la Dra. Adriana M. Torres, por haberme aceptado en su grupo de investigación y por acceder a dirigir este trabajo de Tesis. Gracias por contribuir diariamente a mi formación, por la paciencia y por la dedicación.*
  
- ✚ *Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), y a la Universidad Nacional de Rosario (UNR), por haberme otorgado la financiación económica y el espacio físico necesarios para la realización de este trabajo de Tesis.*
  
- ✚ *Al Prof. Dr. N. Anzai, del Departamento de Farmacología de la Universidad de Chiba, Japón, por el amable gesto de ceder los anticuerpos anti-Oat5 y anti-NaDC1, con los que se realizó gran parte de este trabajo de Tesis.*
  
- ✚ *A la Sra. Alejandra Martínez, del Área Morfología de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la U.N.R., por su contribución en la realización de los estudios histológicos.*
  
- ✚ *A mis compañeras de laboratorio: Romi, Hermi, Eva, Juli y Anabel; gracias por el apoyo diario, los consejos y la buena onda. Gracias por recordarme que en equipo, el trabajo ya no parece trabajo y es mucho más enriquecedor.*
  
- ✚ *A mis amigas, de acá y de allá, por el apoyo incondicional, las reuniones, los mates, las risas y las lágrimas compartidas. Gracias por ser parte de mi vida desde hace tantos años, y por dejarme ser parte de las suyas. Las quiero de a montones...*
  
- ✚ *A mi papá... sé que desde el cielo me estas cuidando y estarías orgulloso de mí.*
  
- ✚ *A mi familia, mamá y Gise. Gracias por la educación y crianza que me dieron, por el cariño y el apoyo constante que me brindan en cada proyecto en el que me embarco. Gracias por estar siempre!*

*Gracias...*