



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante
Dr. Leopoldo Ardiles
Instituto de Medicina
Facultad de Medicina

**POTENCIAL EFECTO RENOPROTECTOR DEL SISTEMA
CALICREINA-CININA EN EL MODELO DE INJURIA RENAL
AGUDA POR CISPLATINO: ROL DE LA MODULACION DE LA
APOPTOSIS**

Tesis de Grado presentada como parte de
los requisitos para optar al grado de
Licenciado en Bioquímica y Título
Profesional de *Bioquímico*

AGUSTÍN ADOLFO BARRÍA GONZALEZ

VALDIVIA – CHILE

2011

A mis padres.

AGRADECIMIENTOS

Este momento en el cual estoy terminando una etapa tan importante en mi vida, me resulta inevitable agradecer a todas las personas que están detrás de este logro, y de las que sin ellas esto quizás no sería posible, ni muchas de las cosas positivas que me han ocurrido a lo largo de la vida.

En primer lugar, agradecer a mis padres Ruth y Agustín por toda la paciencia y el cariño incondicional que siempre han tenido hacia mí, por la oportunidad de estudiar, sus enseñanzas y por hacerme cada día feliz. A mis hermanos Pablo y Cristina por su forma de ser conmigo y la confianza y alegría que me dan. A mi abuelita Rosa y mi tío Juan por hacer tan acogedora mi estadía en su casa, por su preocupación en mis estudios y por hacerme siempre sentir como en casa.

Me gustaría agradecer de forma especial al Laboratorio nefrología del Hospital base de Valdivia, al Dr. Leopoldo Ardiles, a la Sra. María Eugenia Burgos, a la Sra. Graciela, a Don Henry y a toda la gente que allí trabaja quienes me abrieron las puertas, aceptándome y guiándome no sólo en el camino de mi formación como profesional, sino también personal. A mis compañeros tesisistas, Areli, Andres, Pao y Javi quienes fueron muy importantes en el desarrollo de mi tesis, gracias por su tiempo, sus consejos y su buena voluntad en ayudarme siempre. También por los buenos momentos que pasamos juntos sin ustedes nada hubiera sido lo mismo.

A mis amigos de la Universidad, Paly, Siber, Rodrigo, Jorgito y Marchant por todos los momentos que pasamos dentro de estos largos años universitarios, los consejos, las risas, las noches de estudio, gracias por todo.

A mis amigos de toda la vida, Gato, Pepe, Oya, Chita, Kitty, por los más de 17 años que nos conocemos, que somos amigos, y aunque no vivamos en la misma ciudad el contacto nunca se ha perdido, son parte de mi vida. Gracias por los consejos, por momentos de risa, de llanto, por las experiencias vividas junto a ustedes, nunca cambien y gracias ese animo que me impregnan cada vez hablamos.

A mi polola Natalia, por apoyarme en todo momento, y creer siempre en mí.

Al proyecto FONDECYT 1070245 por el financiamiento de esta tesis

ÍNDICE GENERAL

1. RESUMEN.	1
1.1. SUMMARY.	2
2. INTRODUCCIÓN.	3
2.1. Cisplatino.	3
2.2. Limitaciones en el uso de Cisplatino.	4
2.3. Daño renal agudo.	4
2.4. Apoptosis.	8
2.5. Caspasas.	9
2.6. Vías de activación de apoptosis.	13
2.7. Sistema Caliceína-Cinina.	18
2.8. Hipótesis.	20
2.9. Objetivo general.	20
2.10. Objetivos específicos.	20
3. MATERIALES Y MÉTODOS.	21
3.1. Materiales.	21
3.1.1. Equipos.	21
3.1.2. Reactivos.	21
3.1.3. Animales en Experimentación.	23

3.2. Metodos.	26
3.2.1. Inducción del Sistema Calicreina-Cininas.	26
3.2.2. Inducción del daño renal.	26
3.2.3. Recolección y almacenamiento de orina.	26
3.2.4. Preparación de fijadores e inclusión de las muestras	26
3.2.5. Sacrificio y obtención de suero y tejidos.	27
3.3. Estudio de suero y orina.	27
3.3.1. Determinación de electrolitos en orina.	27
3.3.2. Determinación de creatinina urinaria y Clearance de Creatinina	27
3.3.3. Determinación de la excreción de proteínas urinarias.	28
3.3.4. Analisis de creatinina y electrolitos en suero.	28
3.4. Estudio de tejidos.	29
3.4.1. Obtención corte de tejidos	29
3.4.2. Tinciones Histoquímicas para la evaluación del daño tisular por análisis histológico	29
3.4.3 Cálculo de Score Histopatológico	30
3.4.4. Inmunohistoquímica para citoqueratina 18.	30
3.4.5. Inmunohistoquímica para calicreina.	32
3.4.6. Cuantificación Inmunohistoquímica.	32
3.5. Western Blot de Caspasa 9	33

3.5.1. Extracción de proteínas.	33
3.5.2. Cuantificación de proteínas.	33
3.5.3. Separación electroforética en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE).	34
3.5.4. Electrotransferencia e inmunodetección.	34
3.5.5. Cuantificación de los resultados de Western Blot.	36
3.6. RT-PCR semicuantitativo para KIM-1	36
3.6.1 Diseño de Partidores	36
3.6.2. Extracción de RNA total con trizol.	37
3.6.3. Cuantificación de las muestras de RNA.	37
3.6.4. Digestión de trazas de DNA genómico con DNasa I.	38
3.6.5. Reacción de transcripción reversa.	38
3.6.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para KIM-1	39
3.6.7. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.	39
3.6.8. Cuantificación RT-PCR.	40
3.7. Analisis estadístico.	40
4. RESULTADOS.	41
4.1. Evaluación clínica de las ratas en estudio.	41
4.1.1 Peso corporal	44
4.1.2 Diuresis	46

4.1.3 Proteinuria	48
4.1.4 Electrolitos	50
4.1.5 Creatinina urinaria	52
4.1.6 Creatinina Sérica	54
4.1.7 Clearance de Creatinina	56
4.2. Estudio de tejidos.	58
4.2.1. Evaluación del daño histológico	58
4.2.2. Inmunohistoquímica de calicreina tisular.	62
4.2.3. Inmunohistoquímica de citoqueratina 18.	66
4.3. Western blot.	70
4.3.1. Cuantificación de proteínas totales.	70
4.3.2. Evaluación y análisis de blots.	75
4.4. RT-PCR semicuantitativo.	79
4.4.1. Cuantificación de RNA total.	79
4.4.2. Analisis de expresión de KIM-1 mediante RT-PCR.	84
5. DISCUSION	88
5.1. Demostrar la estimulación del SCC mediante una dieta rica en potasio, a través de la detección de calicreina tisular.	88

5.2. Evaluación de parámetros fisiológicos e histopatológicos involucrados en el modelo de cisplatino y el efecto que produce sobre ellos la estimulación del SCC renal con potasio.	89
5.3. Evaluación de la tasa de apoptosis y activación de Caspasa 9 implicadas en el modelo de cisplatino y el efecto del SCC sobre su modulación.	91
5.4. Evaluación del daño renal agudo mediante la detección del marcador de daño renal, KIM-1.	93
6. CONCLUSIONES	96
7. LITERATURA CITADA.	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Visión General de los eventos fisiopatológicos ocurridos en la nefrotoxicidad mediada por cisplatino.	6
Figura 2. Familia de Caspasas en mamíferos.	11
Figura 3. Visión general de las vías de la apoptosis.	17
Figura 4. Modelo Experimental utilizado para ambos grupos de ratas.	25
Figura 5. Peso Corporal de las ratas en el modelo experimental.	45
Figura 6. Diuresis de las ratas en el modelo experimental	47
Figura 7. Proteinuria de las ratas en el modelo experimental	49
Figura 8. Potasio Urinario de las ratas en el modelo experimental	51
Figura 9. Actividad de Calicreína Urinaria de las ratas en el modelo experimental	53
Figura 10. Creatininemia de las ratas en el modelo experimental	55
Figura 11. Clearance de Creatinina de las ratas en el modelo experimental	57
Figura 12. Análisis Histoquímico de la zona Corticomedular: Tinción PAS.	59
Figura 13. Score Histopatológico daño tubular agudo	60
Figura 14. Inmunohistoquímica de Calicreína Tisular.	63
Figura 15. Cuantificación de Calicreína Tisular.	64
Figura 16. Inmunohistoquímica de Citoqueratina 18.	67
Figura 17. Cuantificación de la proteólisis de Citoqueratina 18.	68
Figura 18. Detección Inmunoquímica de Caspasa 9 y GAPDH para cada una de las condiciones estudiadas.	76
Figura 19. Cuantificación de la activación de Caspasa 9.	77

Figura 20. Análisis electroforético de transcritos amplificados por RT-PCR.	85
Figura 21. Cuantificación de la expresión de KIM-1.	86

INDICE DE TABLAS

TABLA I. Parámetros fisiológicos analizados en las ratas del grupo CIS-N.	42
TABLA II. Parámetros fisiológicos analizados en las ratas del grupo CIS-K.	43
TABLA III. Score Histopatológico Daño Tubular Agudo de las ratas en el modelo experimental	61
TABLA IV. Cuantificación Inmunohistoquímica de Calicreina tisular (densidad/mm ²) en el modelo experimental.	65
TABLA V. Cuantificación Inmunohistoquímica de la proteólisis de Citoqueratina 18 (densidad/mm ²) en el modelo experimental.	69
TABLA VI. Cuantificación de extractos proteicos totales de tejido renal de rata por método de Bradford del grupo CIS-K al día 3.	71
TABLA VII. Cuantificación de extractos proteicos totales de tejido renal de rata por método de Bradford del grupo CIS-N al día 3.	72
TABLA VIII. Cuantificación de extractos proteicos totales de tejido renal de rata por método de Bradford del grupo CIS-K al día 7.	73
TABLA IX. Cuantificación de extractos proteicos totales de tejido renal de rata por método de Bradford del grupo CIS-N al día 7.	74
TABLA X. Cuantificación de la activación de Caspasa 9 detectada mediante Western Blot	78
TABLA XI. Razón A260/280 y concentración de las muestras de RNA del grupo CIS-Kd3	80

TABLA XI. Razón A260/280 y concentración de las muestras de RNA del grupo CIS-Nd3	81
TABLA XIII. Razón A260/280 y concentración de las muestras de RNA del grupo CIS-Kd7	82
TABLA XIV. Razón A260/280 y concentración de las muestras de RNA del grupo CIS-Nd7	83
TABLA XV. Cuantificación de la expresión de KIM-1 detectada mediante RT-PCR	87

LISTA DE ABREVIATURAS

AIF	Factor inductor de la apoptosis
BSA	Albúmina de suero bovino
CAD	Desoxirribonucleasa activada por caspasa
DAB	Diaminobencidina
dH ₂ O	Agua Destilada
DTT	1,4-ditiotreitol
EO	Stress Oxidativo
HRP	Peroxidasa de rábano picante
OD	Densidad Optica
PSA	Persulfato de amonio
PBS	Buffer Fosfato Salino
PVDF	Polifluoruro de Vinilideno
RNA	Acido Ribonucleico
RT-PCR	Transcripción reversa acoplada a la reacción de la polimerasa en cadena
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes
SSC	Sistema Calicreina-Cininas
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
TAE	Solución de Buffer que contiene Base Tris, Acido Acetico y EDTA
Tris	Tris-Hidroximetilamina

1. RESUMEN.

Cisplatino es uno de los fármacos más utilizados y más potente dentro de las drogas antitumorales, siendo altamente efectivo en distintos tipos de cáncer, como pulmonar, endometrial o testicular y con una eficacia de tipo dosis-dependiente. Su mecanismo de acción y toxicidad depende de su capacidad para unirse al DNA, atraído por su carga negativa, e inducir aductos y enlaces cruzados entre y dentro de sus hebras. Esta droga posee un alto grado de eficacia, alcanzando cerca del 90% en el caso de cáncer testicular, sin embargo, su uso se ve limitado por la capacidad de las células de adquirir resistencia a la droga y producir efectos secundarios en distintos tipos de tejidos. Entre ellos destaca la inducción de daño tubular e insuficiencia renal aguda en un 25% de los pacientes luego de una primera dosis, atribuido a la capacidad que tiene para gatillar el proceso apoptótico mediante la activación de Caspasas. Proponemos que el Sistema Calicreína-Cinina, sistema enzimático renoprotector con capacidad antioxidante, es capaz de atenuar este daño renal mediante la disminución de la tasa de apoptosis inhibiendo la activación de Caspasa 9.

En esta tesis se demuestra que cisplatino produce un aumento significativo en la activación de Caspasa 9, lo que se traduce en un aumento, de manera concomitante, en la tasa de apoptosis. Por otra parte, se observó que, la activación del SCC obtenido por una dieta rica en potasio produce una disminución del daño renal y de la tasa de apoptosis, probablemente mediante un mecanismo inhibitorio de la activación de Caspasa 9. Estos resultados muestran que el SCC puede influir sobre los mediadores del daño renal agudo inducido por cisplatino y de éste modo podría reducir este efecto adverso en pacientes en quimioterapia.

1.1. SUMMARY.

Cisplatin is one of the most widely used and most powerful antitumor drug, being used in different types of cancer, including lung, endometrial and testicular, having a dose-dependent effect. Its mechanism of action and toxicity depends on its ability to bind to DNA, attracted by its negative charge, and induce adducts and cross-links between and within its fibers. This drug has a high degree of effectiveness, reaching about 90% in the case of testicular cancer, however, its use is limited by the capacity of cells to acquire drug resistance and side effects in different kind of tissues, highlighting the development of tubular damage and acute renal failure in 25% of patients after the first dose, which is attributed to its ability to trigger the apoptotic process activating caspases. We propose that the kallikrein-kinin system, a renoprotective enzymatic system with an antioxidant capacity, is capable to reduce the renal damage by reducing the rate of apoptosis by the inhibition of caspase 9 activation.

This thesis demonstrates that cisplatin produces a significant increase in Caspase 9 activation, resulting on an increase, concomitantly, on the apoptotic rate. We also showed that SCC activation by a high potassium diet produces a decrease on the induced renal damage and on the apoptotic rate possibly through an inhibitory mechanism on Caspase 9 activation. These results suggest that the SCC can influence on acute renal injury mediators induced by cisplatin and thus reduce the side effects in chemotherapy patients.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Cisplatino

Una de las drogas causantes de daño renal agudo, caracterizado por muerte celular tubular, es cisplatino (Pabla N y col. 2008). Este compuesto es una potente droga antitumoral usada en distintos tipos de cáncer, ya sea testicular, cervical, endometrial, pulmonar entre otros (Marie H y col. 2003), teniendo un alto grado de eficacia, alcanzando cerca del 90% en el caso de cáncer testicular (Arany I y col. 2003).

En mamíferos, alrededor de la mitad de la captación celular de cisplatino ocurre mediante difusión pasiva a través de la membrana plasmática (Gately DP y col. 1993) y la otra mitad es incorporada mediante el transportador de cobre Ctr 1 (Ishida S y col. 2002). Este transportador es altamente expresado en células del túbulo proximal (Kuo YM y col. 2006), las cuales resultan ser las más dañadas debido a acumulación de la droga, principalmente las del segmento S3 (Leibbrandt y col. 1995). En tejido renal, los transportadores de cationes orgánicos (OCTs) han sido implicados en la captación celular de cisplatino (Yonezawa A y col. 2005) el que una vez dentro, desplaza los iones cloruro permitiendo la formación de la especie acuosa, la que representa la forma activa intracelular de este compuesto (Chu G. y col. 1994).

El mecanismo de acción de cisplatino consiste en su capacidad de unión al DNA atraído por su carga negativa, induciendo aductos de DNA y enlaces cruzados entre y dentro de las hebras, siendo principalmente uniones entre purinas (Yang D y col. 1997). Evidencia experimental indica que los aductos DNA-platino son las lesiones que provocan la toxicidad en células en división (Eastman y col. 1999) al provocar una detención en la síntesis y división celular (N Pabla y col. 2008).

2.2. Limitaciones en el uso de Cisplatino

A pesar de su eficacia, su uso está limitado principalmente por dos factores; la capacidad de adquirir resistencia a cisplatino por parte de las células tumorales y el hecho de provocar efectos secundarios en distintos tipos de tejidos, los que pueden traducirse en náuseas, vómitos, ototoxicidad, neurotoxicidad y nefrotoxicidad (N Pabla y col. 2008). Este último, es uno de los efectos más comunes y ocurre en 25-30% de los pacientes luego de la primera dosis de cisplatino manifestándose como una injuria renal aguda (Manchang Liu y col. 2006).

Un protocolo de hidratación fue desarrollado para reducir los niveles de nefrotoxicidad y permitir una administración acorde a la escala terapéutica, sin embargo, un tercio de los pacientes tratados con esta droga mostraba un aumento en los niveles de nitrógeno ureico sanguíneo (BUN) o alguna otra evidencia de daño renal a los días posteriores al tratamiento (Marie H y col. 2003). El daño fue observado a los 10 días post-tratamiento, manifestándose por una disminución en la tasa de filtración glomerular, aumento en los niveles séricos de creatinina y disminución en los niveles séricos de magnesio y potasio (N Pabla y col. 2008).

2.3. Daño renal agudo

El epitelio renal del túbulo proximal es particularmente sensible al daño causado por hipoxia, isquemia, químicos, y drogas (Bonventre y col. 1993, 1998). Este daño se caracteriza por una deficiencia funcional en el manejo de agua y sal, incapacidad para excretar metabolitos tóxicos y una respuesta inflamatoria (Thadhani y col. 1996). La exposición de las células tubulares a cisplatino activa complejas vías de señalización que llevan a daño y muerte celular, gatillando además una importante respuesta inflamatoria que aumenta el daño del tejido renal. Cisplatino puede también inducir daño en la vasculatura renal resultando en una disminución en

el flujo sanguíneo y daño isquémico en los riñones, contribuyendo con el decaimiento en la tasa de filtración glomerular. Estos eventos en conjunto culminan en la pérdida aguda de la función renal (N Pabla y col. 2008). (**Figura 1**)

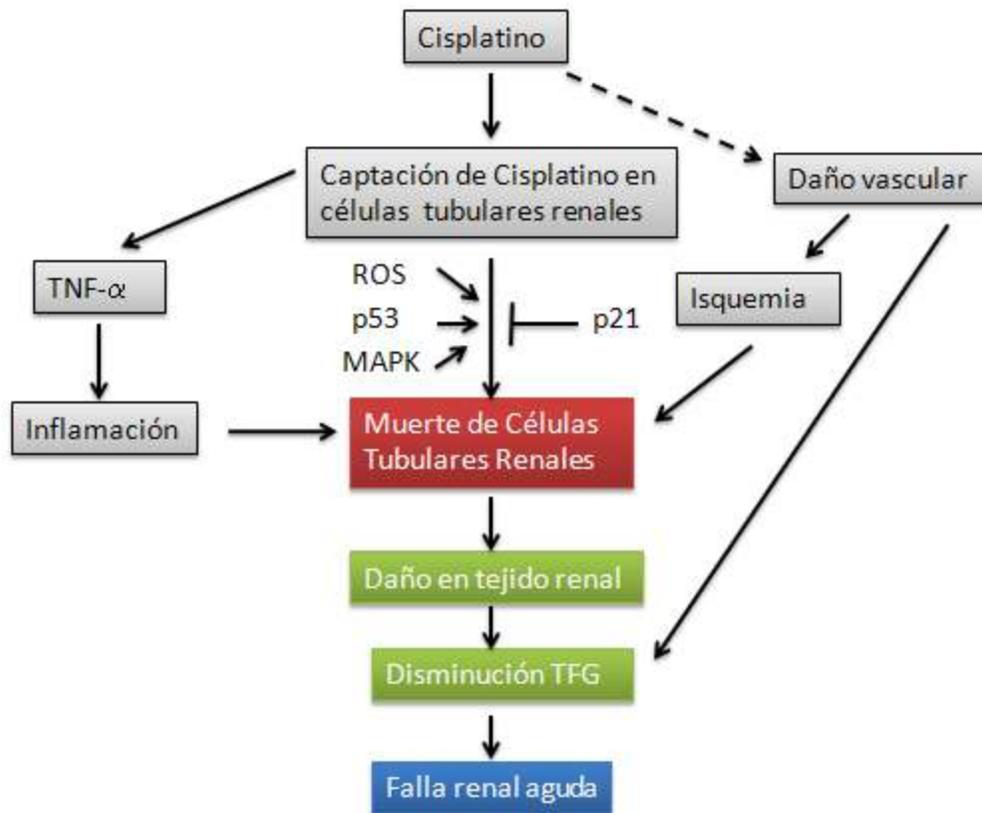


Figura 1. Visión General de los eventos fisiopatológicos ocurridos en la nefrotoxicidad mediada por cisplatino. Cisplatino entra a la célula renal mediante mecanismo pasivo y/o facilitado. La exposición de las células tubulares a cisplatino activa vías de señalización que son promotoras de la muerte celular (MAPK, p53, ROS, etc.) o citoprotectoras (p21). A la vez, cisplatino induce la producción de TNF- α en células tubulares, lo que gatilla una importante respuesta inflamatoria, además de contribuir al daño y muerte de células tubulares. Cisplatino también puede inducir daño renal a nivel vascular, produciendo muerte celular renal por isquemia y una caída en la tasa de filtración glomerular (TFG). Adaptación de N. Pabla y Z. Dong (2008).

Este daño renal agudo se atribuye a la capacidad que tiene cisplatino para formar especies reactivas de oxígeno (ROS), inducción de Caspasas, y provocar daño a nivel mitocondrial tanto *in vivo* como *in vitro* (Manchang Liu y col. 2006). Se ha observado que cisplatino se acumula principalmente a nivel de los túbulos proximales, lugar donde se aprecia mayor evidencia de daño (Moon Soo Park y col. 2002; Q wei y col. 2007).

Aunque ha existido un gran progreso en el entendimiento de los mecanismos bioquímicos y moleculares del daño renal agudo en modelos animales, su uso terapéutico se ha visto retrasado debido a la falta de un biomarcador de daño eficiente. Los marcadores tradicionales como creatinina serica, nitrógeno ureico sanguíneo, o estudios urinarios carecen de la sensibilidad y especificidad para detectar adecuadamente la nefrotoxicidad previo a una pérdida importante de la función renal (Vishal y col. 2010). KIM-1 (Kidney Injury Molecule) es una proteína de transmembrana tipo-I que posee un dominio de tipo inmunoglobulina y mucina, la cual no es detectable en tejido renal sano, pero es expresada en altos niveles en células epiteliales del túbulo proximal renal luego de daño por isquemia, drogas, sobrecarga de proteínas o ambiente (Vishal y col. 2010; Ichimura y col. 1998), siendo propuesto como un nuevo biomarcador para nefrotoxicidad al presentar una mayor especificidad, sensibilidad y temporalidad temprana en comparación a marcadores convencionales y además por su rol en la reparación de células epiteliales (Ichimira y col. 2004; Bonventre 2006).

Al menos dos mecanismos distintos pueden ser responsables de la muerte de células renales posterior al daño, dependiendo de la extensión y la gravedad; mientras que un daño extenso puede llevar a muerte celular por necrosis, lesiones renales menos graves y más comúnmente encontradas en la clínica moderna están asociadas con la apoptosis (Ueda N y col. 2000). La muerte de células renales se ha visto que depende de la concentración de cisplatino a la

cual han sido expuestas: altas concentraciones inducen necrosis, en cambio a bajas concentraciones se produce muerte celular mediada por apoptosis (Wilfred Lieberthal y col. 1996).

2.4. Apoptosis

La muerte celular programada, o apoptosis, es un fenómeno biológico genéticamente regulado, descrito por primera vez en 1972 por Kerr y col. cumpliendo múltiples funciones en el desarrollo y remodelación tisular (Lodish,. 2005). Es un proceso dependiente de energía y que tiene como función, en conjunto con la mitosis, la regulación del número de células (Green DR y col. 2005) tanto en condiciones normales como patológicas (Fuad S y col. 1999). Su activación puede ser iniciada o inhibida por una variedad de estímulos ambientales, fisiológicos o patológicos, que permiten la realización de eventos fundamentales, tales como la embriogénesis, el desarrollo de un sistema inmune maduro y efectivo, y el recambio y envejecimiento celular. Apoptosis también se presenta como respuesta a factores externos como estrés, radiación ionizante, compuestos químicos, mutagénicos (Cohen JJ y col. 1992), daño irreparable de DNA (Matsuzawa y col. 2001) y frente a infecciones como virales, bacterianas o parasitarias (Tan y col. 2007; Webster y col. 2010). Se ha observado que este tipo de muerte celular es vital en la homeostasis tisular y al estar alterada se producen enfermedades degenerativas como Alzheimer, Huntington, daño isquémico, desordenes autoinmunes y varios tipos de cáncer (Thompsons CB y col. 1995).

La apoptosis posee patrones morfológicos específicos entre los que se encuentran una condensación tanto plasmática como nuclear, pérdida de contacto con las células vecinas, fragmentación de la cromatina y ruptura de la célula en múltiples cuerpos apoptóticos (Lockshin

y col. 2004; Buja LM y col. 1993; Pittman SM y col. 1993); estos cuerpos sufren un incremento de N-acetilglucosamina y fosfatidilserina en la parte externa de la membrana sirviendo como señal para su rápida fagocitosis, evitando así una respuesta inflamatoria (Somersan S y col. 2001; Fado VA y col. 1992).

La inducción y ejecución de apoptosis requiere de la cooperación de una serie de moléculas entre las que se encuentran moléculas de señal, receptores, enzimas y factores de transcripción. Entre ellas, el sistema de señalización de las Caspasas, vital en el proceso de apoptosis, es regulado por un gran número de moléculas como la proteína inhibidora de apoptosis (IAP), proteínas de la familia Bcl-2, y calpaina (Launay S y col. 2005).

2.5. Caspasas

Las Caspasas (cistenil-aspartatoproteasa) son enzimas específicas que han surgido como uno de los efectores cruciales en el proceso de apoptosis al producir la mayoría de las características morfológicas y bioquímicas de la muerte celular mediada por esta vía (Moon Soo Park y col. 2002). A la fecha se han identificado 14 Caspasas perteneciendo todas a una familia de cisteín-proteasas específicas para aspartato; su sitio activo consta de un penpapéptido conservado y sus precursores son zimógenos que poseen una muy poca o nula actividad conocidos como procaspasas, las que al recibir la señal apoptogénica sufren un proceso proteolítico dando lugar a la enzima activa (Wilson KP y col. 1994; Kidd Vj y col. 1998). Todas estas enzimas poseen una estructura similar que consiste en un dominio altamente homologo que posee actividad proteasa y que puede ser dividido en dos subunidades: una subunidad larga central de aproximadamente 20 kDa, y una subunidad pequeña en el extremo carboxilo terminal de aproximadamente 10 kDa. Cada Procaspasa posee también un prodominio en su N-terminal de

una longitud variable. Según la función que poseen, las Caspasas se pueden dividir dentro de dos grandes subfamilias; La primera está involucrada en la maduración de citoquinas como la interleuquina-1 β e interleuquina-18 y también en promover funciones inflamatorias; los miembros de la segunda familia están involucrados en la vía de la apoptosis y se pueden subdividir según su estructura y su activación temporal durante la muerte celular en Caspasas iniciadoras y Caspasas efectoras (Marek Los y col. 1999).

Las Caspasas iniciadoras de apoptosis y las involucradas en la inflamación, contienen prodominios de cerca de 100 aminoácidos, en tanto que el prodominio de las Caspasas ejecutoras es más pequeño teniendo menos de 30 aminoácidos (Rotonda J y col. 1996; Walker NP y col. 1994). **(Figura 2)**

Las Caspasas iniciadoras son activadas por auto clivaje necesitando una dimerización de las mismas, esta dimerización esta mediada por la unión de sus prodominios a una molécula adaptadora, mediante sus dominios de reclutamiento de Caspasas (CARD) o los dominios de muerte (DD) en respuesta al estímulo apoptótico. Por otro lado, las Caspasas ejecutoras son convertidas en su forma activa mediante un clivaje en un residuo de aspartato producido por Caspasas iniciadoras permitiendo así el ensamblaje de heterotetrámeros compuestos por dos sub unidades largas y dos subunidades pequeñas, cuya actividad enzimática está encargada del desmantelamiento celular (Han Z y col. 1997; Boatright y col. 2003).

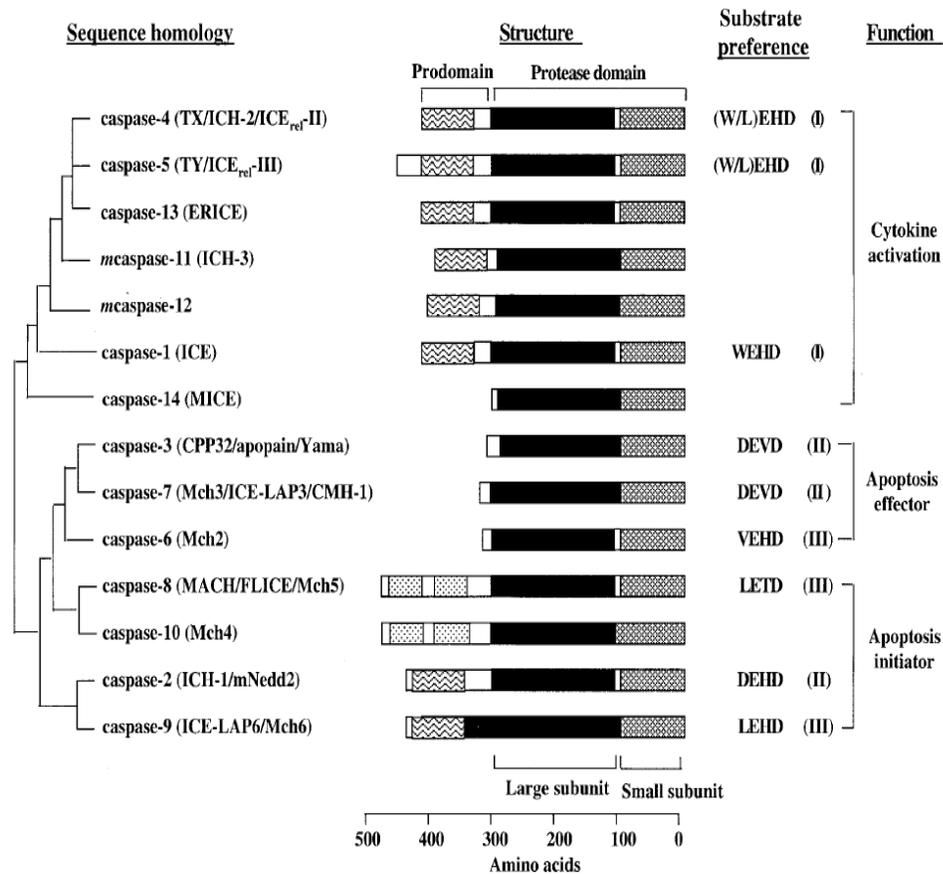


Figura 2. Familia de Caspasas en mamíferos. Todas las Caspasas de mamíferos están presentes en el ser humano, excepto las Caspasas 11 y 12 que poseen origen murino y que aun no se les identifica su contraparte en humanos. La relación filogenética esta basada en la similitud de secuencias dentro del dominio con actividad proteasa. Entre paréntesis se puede observar el nombre alternativo para cada Caspasa.  dominio DED;  dominio CARD. (Howard Y. Chang y Xiaolu Yang, 2000)

Durante la apoptosis estas enzimas son las encargadas de cortar un gran número de proteínas localizadas en la membrana celular, núcleo y citoplasma. La activación de CAD (Caspase-activated deoxyribonuclease) para facilitar la degradación de DNA (Enari M y col. 1998), y el clivaje de láminas nucleares para facilitar la contracción nuclear (Rao L y col. 1996) son algunas de las funciones mediadas por Caspasas en el proceso apoptótico. Todas las enzimas mediadoras de inflamación y las iniciadoras de apoptosis poseen un prodominio largo [30]. Este prodominio largo contiene un dominio de efector de muerte (DED) en la procaspasa 8 y 10 o un dominio de reclutamiento de Caspasa (CARD) en el caso de procaspasa 2 y procaspasa 9. Tanto DED como CARD, miembros de la familia de dominios de muerte, están envueltos en la activación de procaspasas y su regulación río abajo mediante una interacción proteína-proteína. Ambos dominios contienen una estructura tridimensional en común conocida como pliego de dominio de muerte (DD), compuesto por seis α -hélices antiparalelas organizadas en un motivo tipo llave griega (Yuan CQ y col. 2002).

La activación de Caspasas se realiza mediante un corte proteolítico en dos sitios consensos de la procaspasa, el primero produce la liberación del prodominio, y el segundo produce la separación de ambas subunidades. A pesar de que la subunidad grande es la que contiene el dominio catalítico, este se activa cuando se asocia a la subunidad pequeña. Estudios cristalográficos han revelado que las Caspasas activas son tetrámeros formados por la asociación de dos heterodímeros y por lo tanto contienen dos sitios catalíticos independientes. A la fecha se ha visto que esta activación puede proceder por autoactivación, transactivación o proteólisis por otras proteinasas (Wilson KP y col. 1994).

2.6. Vías de activación de apoptosis

Dos vías de señalización molecular convergentes entre sí pueden llevar a la activación de Caspasas, y la vía a la cual la célula se adapta esta altamente influenciada por el estímulo apoptótico inicial. La primera es la vía de señalización mediada por receptores de muerte la que es gatillada principalmente por señales extrínsecas, estos receptores poseen sus dominios de muerte en su región intracelular, para poder así, reclutar proteínas apoptóticas río abajo. La segunda vía es mediada por la mitocondria y gatillada principalmente por señales de estrés y de desarrollo (Jozsa N y col. 2002; Kaufmann SH y col. 2001). Estudios *in vitro* han sugerido además, un tercer mecanismo relacionado con el estrés del Retículo endoplásmico (Liu H y col. 2005).

En el caso de la primera, señales de muerte celular como ligando Fas (FasL) y el factor de necrosis tumoral (TNF)-2 pueden ser específicamente reconocidos por sus correspondientes receptores de muerte, como Fas, o el receptor TNF (TNFR)-1 y 2, estos receptores se trimerizan al estar unidos a su ligando y reclutan adaptadores específicos llamados dominio de muerte asociado a Fas (FADD) o dominio de muerte asociado a TNFR (TRADD) los que se unen a través de su propio dominio de muerte al extremo citoplasmático de los receptores agrupados. Esta unión produce que el DED ubicado en el N-terminal de los adaptadores quede expuesto para poder interactuar con el DED ubicado en el prodominio de la procaspasa 8 (Wang ZB y col. 2005), que es la Caspasa clave en el inicio de la cascada de señales dentro de la vía (Ashkenazi A y col. 1998), induciendo la oligomerización de la enzima. Esta oligomerización da como resultado la formación de un complejo inductor de la señal de muerte (DISC), que consiste en el receptor, su adaptador y procaspasa 8 lo que permite la activación de la enzima mediante un proceso autoproteolítico (Wang ZB y col. 2005). El mecanismo molecular que media la activación de la

enzima aun no se conoce, pero se cree que la gran proximidad que adquieren estas moléculas activaría la baja actividad proteasa intrínseca de procaspasa 8 (Muzio M y col. 1998).

La activación de las vías río abajo de Caspasa 8 varía según el tipo de célula. En algunas células del tipo linfocito, Caspasa 8 es altamente activada y puede directamente activar las procaspasas efectoras. En los demás tipos de células, Caspasa 8 es activada sólo medianamente y es incapaz de activar procaspasas efectoras. Sin embargo, tiene la capacidad de activar las vías mediadas por la mitocondria mediante el truncamiento de Bid, un miembro de la familia proapoptotica Bcl-2 en su forma activa tBid. tBid gatilla la activación de la vía mitocondrial: citocromo c, factor inductor de apoptosis (AIF), y otras moléculas son liberadas de la mitocondria induciendo la apoptosis, produciendo así, una comunicación entre ambas vías (Amoult D y col. 2003; Lü CX y col. 2003; Fu YF y col. 2003). Cultivos de células renales proximales humanas muestran una regulación positiva de Fas y FasL en presencia de cisplatino lo que se asocia a apoptosis, sin embargo no se ha establecido evidencia definitiva del rol de Fas en la muerte celular de células tubulares inducida por cisplatino. (Razzaque MS y col. 1999).

Por otro lado, la vía intrínseca o mitocondrial ha emergido como la principal vía en la nefrotoxicidad inducida por cisplatino. Esta vía consiste en la activación de proteínas proapoptóticas ubicadas en el citosol en respuesta a estrés celular, drogas citotóxicas, daño al DNA, glucocorticoides, perturbación en el balance redox y la restricción de factores de crecimiento. Basada en su estructura y función, estas proteínas se agrupan en una familia de proteínas llamada Bcl-2, pudiendo dividirse en miembro proapoptotico; Bax, Bak y Bok y miembro antiapoptotico; Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-2 Mcl-1 y A1 (Joza N y col. 2002). Las proteínas proapoptoticas son las encargadas de inducir la apertura de poros de permeabilidad transitoria en la membrana de la mitocondria (MPTPs), produciendo liberación de Citocromo c hacia el

citósol. Normalmente Citocromo c se ubica en el espacio que existe entre la membrana interna y la membrana externa de la mitocondria y su liberación esta regulada por proteínas de la familia Bcl-2 (Jurgensmeier, J y col. 1998).

A nivel citoplasmático, Citocromo c junto a dATP/ATP permiten la oligomerización, en octámeros, del factor activador de la proteasa de apoptosis (Apaf-1), el que junto con procaspasa 9 produce la formación de un gran complejo conocido como apoptosoma. El extremo N-terminal de Apaf-1 y el prodominio de la procaspasa 9 interaccionan mediante sus dominios CARDS los cuales poseen formas complementarias y cargas opuestas, formando un complejo en una relación 1:1. De esta manera, procaspasa 9 es atraída hacia Apaf-1 siendo activada mediante autoclivaje. En condiciones normales, Apaf-1 es incapaz de reaccionar con dATP debido a su baja capacidad de unión, la cual se ve aumentada en presencia de Citocromo c, similar actividad produce sobre Caspasa-9 (Jiang X y col. 2000). Citocromo c no es la única molécula nociva que se encuentra en la mitocondria, existiendo otros efectores como procaspasas 2, 3 y 9 liberados desde el espacio intermembrana (Susin, S. A y col. 1999), un factor inductor de apoptosis (AIF) capaz de translocar hacia el núcleo e inducir tanto la condensación de la cromatina como la fragmentación del DNA (Susin, S. A y col. 1999), y el coactivador de Caspasa Smac/DIABLO el cual promueve la activación de Caspasa 9 y 3 al unirse a las proteínas inhibitorias de la apoptosis (IAPs) y eliminar su efecto inhibitorio sobre las Caspasas (Du, C y col. 2000). El factor inductor de apoptosis también puede inducir la liberación de Citocromo c produciendo así muerte celular mediante la formación del apoptosoma. De este modo, la mitocondria participa en la vía apoptótica mediante al menos dos vías independiente, una en la que participa la activación de las Caspasas y la otra mediada por AIF (Susin SA y col. 1999).

Caspasa 9 activada puede luego activar tanto procaspasa 7 como procaspasa 3, esta última es capaz de activar a la procaspasa 9 produciendo una vía de activación de tipo feedback positivo (Arnoult D, y col 2003, Fan Tj y col. 2001). (**Figura 3**).

A la fecha se ha demostrado la existencia de más de 60 proteínas que son sustratos de una o más Caspasas en células de mamíferos (Stroh, C y col. 1998). Estos sustratos contienen uno o más sitios para su corte proteolítico dentro de sus secuencias de unión interdominios y están envueltos en un gran número de funciones dentro de la célula, como proteínas implicadas en el metabolismo del DNA, proteínas del citoesqueleto, reguladoras del ciclo celular, enzimas constitutivas, de reparación, y proteínas involucradas en vías de señalización. Las Caspasas no producen una degradación de los sustratos sino que el corte provoca una activación o inactivación de estos, lo que genera los cambios morfológicos característicos utilizados inicialmente para describir la apoptosis. Las Lamininas, proteínas consideradas andamios de la envoltura nuclear, son clivadas por las Caspasas efectoras produciendo contracción nuclear y fragmentación (Rao, L y col. 1997). La pérdida de la forma celular es probablemente causada por el clivaje de la proteína citoesqueletica fodrina (Kothakota, S y col 1996). El corte en los componentes del complejo de adhesión focal lleva a un desprendimiento de células en apoptosis de sus vecinas y de la membrana basal (Wen, L y col. 1997). El Clivaje de PAK2, miembro de la familia de las kinasas produce la formación de los cuerpos apoptoticos (Rudel, T y col. 1997).

La determinación de apoptosis se realizará mediante la cuantificación de la activación de Caspasa 9 al ser la enzima iniciadora de la vía mitocondrial, vía principal en la muerte celular mediada por cisplatino (Moon Soo Park y col. 2002).

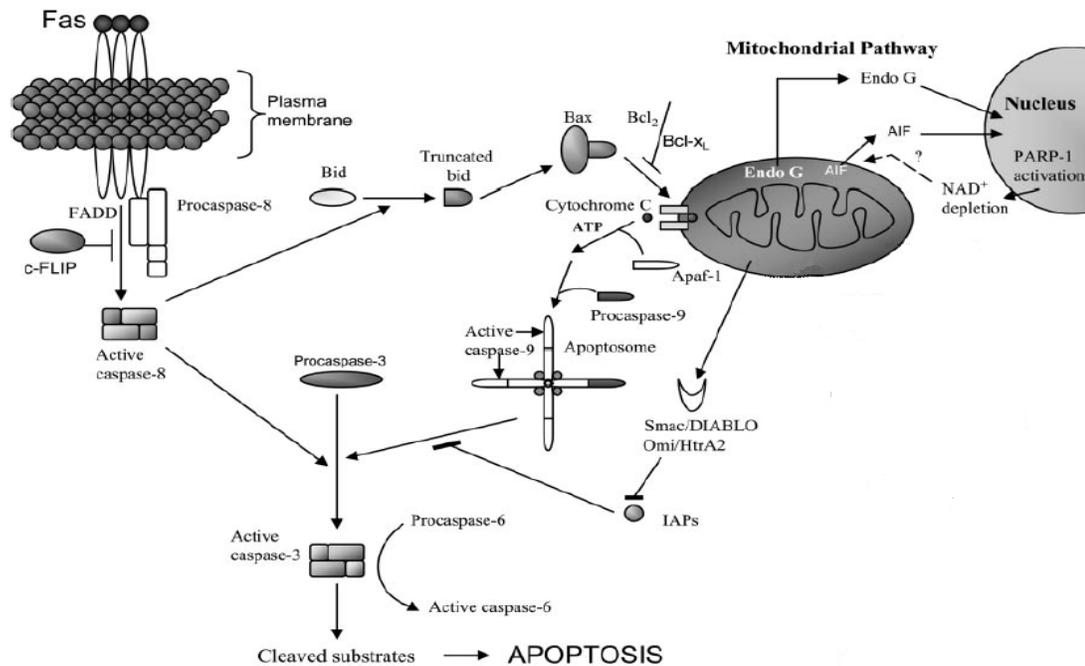


Figura 3. Visión general de las vías de la apoptosis. La vía de receptores de muerte (izquierda) es iniciada luego de la unión de un ligando (FasL) a su receptor lo cual resulta en el reclutamiento secuencial de FADD y procaspasa-8 (proceso inhibido por c-FLIP). Caspasa 8 puede activar mediante un corte proteolítico a procaspasa 3 o puede clivar Bid en su forma truncada (tBid) el cual se une a Bax y se integra dentro de la membrana mitocondrial para liberar citocromo c. La vía intrínseca mitocondrial es activada en respuesta a varios estímulos inducidos por estrés celular. Esta vía produce la translocación de moléculas proapoptóticas desde el citosol hacia la membrana mitocondrial lo que implica la posterior translocación de citocromo c hacia el citosol. Citocromo c reacciona con Apaf-1 y Caspasa 9 formando el apoptosoma y luego la activación de Caspasa 3. Desde la mitocondria también son liberadas otras moléculas como AIF y Endo G las cuales producen su efecto en el núcleo. (Babu J. Padanilam, 2003)

2.7. Sistema Calicreína-Cininas

El sistema calicreína-cinina (SCC) es uno de los principales sistemas vasodilatadores, participando también en la regulación del tono vascular y en la excreción de agua y sodio/potasio (Bhoola KD y col. 1992).

Es un sistema multienzimático complejo, que a nivel renal actúa de manera paracrina y autocrina favoreciendo la síntesis y liberación de cininas desde cininógenos a través de la actividad cininogenasa de la enzima calicreína. Los péptidos activos generados, bradiginina y Lys-bradiginina, son degradados por cininasas, como la enzima convertidora de angiotensina (ACE) generando péptidos inactivos. Las cininas ejercen sus efectos biológicos por la estimulación de dos receptores acoplados a proteína G con siete dominios de transmembrana, los receptores B1 (RB1) y B2 (RB2). El RB2 se expresa de forma constitutiva en varios tejidos, mientras que la expresión del RB1 es regulada por citoquinas proinflamatorias, el sistema renina-angiotensina (SRA) y el EO (Riad y col., 2007). Calicreína es sintetizada en células del túbulo conector del nefrón distal y es secretada al lumen tubular o al intersticio basolateral, liberando las cininas por clivaje de cininógenos sintetizados por células del ducto colector, torrente bajo en la nefrona (Bhoola y col., 1992).

La transferencia del gen calicreína tisular humana en ratas Sprague-Dawley mejora la función renal en el modelo de nefrotoxicidad inducida por gentamicina al bloquear vías de señalización activadas por EO que participan en la inflamación y apoptosis (Bledsoe y col., 2006).

Se ha demostrado que este sistema es altamente estimulable mediante una dieta rica en potasio provocando hipertrofia e hiperplasia de las células productoras de calicreína en el tejido renal aumentando la excreción de calicreína urinaria (Vio CP y col. 1987). Se ha observado que

una alta dosis de potasio incrementa la calicreina renal, los niveles de expresión de mRNA de RB2 y también las cininas a nivel urinario en ratas hipertensas (Jin L. y col. 1999).

A la fecha se postula una capacidad renoprotectora del sistema Calicreina-Cinina en diferentes modelos experimentales de daño renal agudo o crónico a través de diversos mecanismos. Este estudio pretende demostrar un potencial rol renoprotector de la estimulación del sistema Calicreina-Cinina con una dieta rica en potasio en un modelo de nefrotoxicidad agudo por cisplatino a través de la modulación de la apoptosis.

2.8. Hipótesis

La estimulación del sistema caliceína cininas renal mediante una dieta rica en potasio reduce el daño renal agudo inducido por cisplatino a través de la modulación de la apoptosis.

2.9. Objetivo General:

Determinar que la estimulación del sistema caliceína-cininas puede reducir los niveles de Caspasa 9 y con ello reducir la inducción de apoptosis en el modelo de injuria renal aguda por cisplatino

2.10. Objetivos específicos:

1. Evaluar la presencia de apoptosis a nivel del tejido renal frente al estímulo nefrotóxico de cisplatino.
2. Demostrar la activación de Caspasa 9 en concomitancia con la aparición de apoptosis como parte de la cascada patogénica del daño renal agudo post cisplatino.
3. Demostrar la activación del sistema Caliceína-Cinina renal mediante la administración de una dieta rica en potasio.
4. Evaluar el rol renoprotector de la estimulación del sistema Caliceína-Cinina a través de una reducción del fenómeno apoptótico.
5. Demostrar una reducción de la expresión de Caspasa 9 y la intensidad de apoptosis en relación con la estimulación del sistema caliceína cininas
6. Demostrar una reducción en la magnitud de daño renal agudo evidenciado por una disminución en la expresión del biomarcador de daño renal agudo KIM-1 en un modelo de cisplatino con estimulación del sistema caliceína cininas

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. Equipos

Espectrofotometro Shimadzu UV-120-11; Balanza Precisa XB 620C; Agitador magnético Nuova Stirrer Thermolyne; Analizador de electrolitos EasyLyte PLUS Na/K/Cl Analyzer; Espectrofotómetro Humalyzer 2000; pHmetro CG818; Microonda Amana RS591SS; Balanza Analítica electrónica Sartorius Analytic; Centrifuga refrigerada Heraeus Biofuga fresco; Termociclador Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400; Estufa Heraeus Function Line; Estufa LW Scientific, Inc; micropipetas Gilson P-5000, P-1000, P-200, P-100, P20; micropipetas Eppendorf P-1000, P-100, P-10; Estufa de cultivo EB-36; Microcentrífuga ALC 4214; Vortex Maxi Mix Plus Thermolyne; Microscopio Zeiss Axiolab Piramide; Centrifuga para tubos Falcon Jouan; Fuente de poder Bioproducts Biovolt 300V; Sistema de electroforesis y transferencia BioRad; Microtomo Microm HM 325; Transiluminador Arquimed; Sistema de electroforesis horizontal Biotec; Agitador Magnético YRN-360 Farmalatina; Fuente de poder Consort; Termociclador GeneAMP PCR System 2400 y 9700 Applied Biosystem; Pesa Analítica Sartorius; Centrifuga para tubos Biofuge Fresco Heraeus.

3.1.2. Reactivos

Los reactivos utilizados, y sus proveedores, fueron los siguientes:

- Arquimed: Alcohol Absoluto;
- Biorad: Acrilamida/Bisacrilamida 40%; TEMED; Azul de Comassie; Precision plus protein Kaleidoscope standars

- Calbiochem: IgG policlonal de conejo anti calicreina de ratón.
- Cell Signaling: IgG1 monoclonal de raton anti Caspasa 9 de rata
- Dakocytomation: LSAB2 System-HRP; Protein Block Serum Free
- EasyLyte: Kit de medición de electrolitos
- Fermentas: 100bp DNA ladder
- Human GmbH: Combina 3; Kit de medición de proteínas totales
- IDT: Los siguientes partidores:
- KIM-1 (Forward): 5' GGG GTG GTG GGT CAC CCT GT 3'
- KIM-1 (Reverse): 5' GTG GGC CTT GTG GTT GTG GGT 3'
- GAPDH (Forward): 5' TCC GCC CCT TCT GCC GAT G 3'
- GAPDH (Reverse): 5' CAC GGA AGG CCA TGC CAG TGA 3'
- Immobilon: Membrana PVDF
- Invitrogen: Trizol, Taq Polimerasa, Agarosa; Bromuro de etidio
- Kodak: Cassette
- Millipore: IgG1 monoclonal de raton anti GAPDH de rata
- Merck: Isopropanol; Acido acético (Glacial); Metanol; Acetona; Fenol; Tris; Azul de bromofenol
- Pierce: T-PER
- Polysciences inc.: Glutaraldehido 25%; Bouin
- Promega: MgCl₂; Random primers; Oligodt; Mix dNTPs; RNAsin; Transcriptasa Reversa; Agua libre de nucleasas; Buffer green GoTaq, DNA Taq Polimerasa
- Roche: IgG2b monoclonal de raton anti-Citoqueratina 18 clivada de

- Romil: Cloroformo
- Sentinel Diagnostics: Urine Proteins
- Sigma: Tris (hidroxi metil) amino metano; Persulfato de amonio; Tween 20; PBS; Acrilamida/Bisacrilamida 30%; Glicina; BSA; Revelador; Fijador; SDS
- Thermo Scientific: Super signal west femto maximum sensitivity substrate;films; Inhibidor de proteasas; Inhibidor de fosfatasas
- Vacuette: Tubos al vacío para obtención de suero.
- Vector Laboratories: IgG Biotinilada de caballo anti IgG de raton
- Wiener lab.: Kit para medición de Creatinina

3.1.3. Animales en experimentación

Se utilizaron 2 grupos de ratas machos de la cepa Sprague-Dawley cada uno constituido por 18 ratas de entre 10-12 semanas de edad, con un promedio de peso de 330 gramos, provenientes desde el Bioterio del Instituto de Histología y Patología de la Universidad Austral de Chile. Los animales se mantuvieron en salas con temperatura constante de 22°C y ciclos de luz oscuridad de 12 horas, alimentación con pellet normosódicos y agua de bebida *ad libitum*.

El grupo control (CIS-N) recibió una única inyección por vía intraperitoneal de cisplatino (7mg/kg). Los animales fueron sacrificados al día 3 y 7 posterior a la inyección. A este grupo se le administró agua de bebida normal durante todo el ensayo.

El grupo protegido (CIS-K), recibió KCl al 2% en agua de bebida durante 4 semanas para estimular el SCC (Ardiles y col. 2006) luego de esto, se les administró una inyección única (i.p.) de cisplatino (7mg/kg) y, de forma paralela, el potasio fue eliminado de la dieta siendo reemplazado por agua de bebida normal. Los animales fueron sacrificados al día 3 y 7 posterior a

la inyección. A cada rata se recolectó la orina de 24 hrs. en jaulas metabólicas el día previo, 1, 3 y 7 después de la inyección de Cisplatino (Figura 4).

Posteriormente, fueron sacrificadas por exsanguinización bajo anestesia, se obtuvieron muestras de suero y se extrajo ambos riñones, parte de ellos fueron fijados en bouin y formol-PBS al 4% para realizar análisis histopatológico, inmunohistoquímica de Calicreina tisular y Citoqueratina 18 y otra porción fue recolectada para estudios de Western-Blot para activación de Caspasa 9 y RT-PCR para KIM-1

Esquema Modelo Experimental

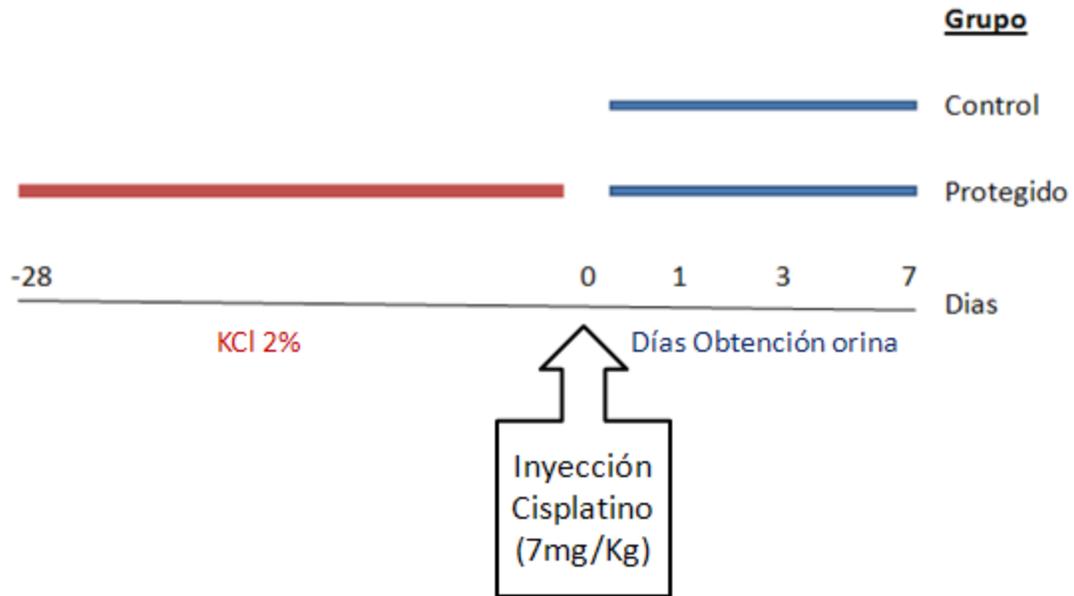


Figura 4. Modelo Experimental utilizado para ambos grupos de ratas. Se observa el esquema llevado a cabo en la realización del modelo experimental. Previa a la inyección de cisplatino (7mg/Kg) el grupo protegido fue tratado durante 4 semanas con una dieta con KCl al 2% para estimular el SCC. Posterior a la inyección, a ambos grupos de animales se les recolectó orina de 24 hrs. al día previo, 1, 3 y 7.

3.2. METODOS

3.2.1. Inducción Del Sistema Calicreina-Cininas

El sistema fue estimulado mediante una dieta rica en potasio administrada como KCl al 2% en el agua de bebida por un periodo de 4 semanas previo a la inducción del daño renal por cisplatino.

3.2.2. Inducción Del daño renal

El daño renal agudo se indujo mediante una inyección única de cisplatino a una dosis de 7mg/Kg de peso por vía intraperitoneal (ip). La concentración de solución de cisplatino utilizada fue de 1mg/ml de agua.

3.2.3. Recolección y almacenamiento de la orina

Para la recolección, las ratas fueron puestas en la caja metabólica el día previo a la inyección de cisplatino (día 0), y los días 1, 3 y 7 después de ésta, durante un periodo de 24 horas en el que recibieron solamente hidratación evitando el alimento sólido para reducir la contaminación fecal. Luego de su obtención, la orina fue centrifugada a 1800 rpm por 10 minutos, y el sobrenadante se almacenó a -20°C en alícuotas hasta el momento de los ensayos.

3.2.4. Preparación de fijadores e inclusión de las muestras.

Diferentes trozos de riñón obtenidos al momento del sacrificio, fueron fijados en formol al 4% en PBS y Bouin comercial, e incluidos en parafina.

3.2.5. Sacrificio y obtención suero y tejidos

La mitad de las ratas de cada grupo se sacrificó el día 3 (n=18), y los restantes animales al día 7 (n=18) posterior a la inyección de cisplatino. Para ello se administró anestésico que contiene una mezcla de 0.12mM de Clorhidrato de Ketamina (Ketostop), 0.007mM de Acepromacina de Maleato (Pacifor) y solución salina, se realizó punción cardíaca hasta exanguinizar y la sangre se depositó en un tubo con anticoagulante (Vacuette). Los riñones fueron extirpados, descapsulados y lavados en suero fisiológico, y cortados en secciones coronales. Se fijaron muestras para microscopía óptica en formol salino, Bouin, y una última fue almacenada a -80°C para análisis de Western Blot y RT-PCR.

3.3. Estudio de Suero y Orina

3.3.1. Determinación de Electrolitos en orina

Para la determinación de los niveles de electrolitos presentes en la orina, se utilizó el equipo EasyLyte Plus Na/K/Cl Analyzer. La orina fue diluida con Urine Diluent (Easylyte) a dilución inicial 1:10 utilizando diluciones mayores o menores según concentración.

3.3.2. Determinación de Creatinina Urinaria y Clearance de Creatinina

La determinación se hizo mediante método colorimétrico utilizando el Kit comercial Creatinina Wiener lab. La orina recolectada de los animales fue centrifugada a 1800rpm durante 10 minutos, luego el sobrenadante fue diluido en razón 1:50 con dH₂O. Se utilizó una solución blanco y un estándar de creatinina pura a 20mg/l (valor real).

Mezclados los reactivos, la solución fue agitada en vortex y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las mediciones se realizaron a 510nm y para obtener los valores reales de las muestras la concentración fue multiplicada por su factor de dilución (50).

El clearance de creatinina se determinó mediante la obtención de la tasa de filtración glomerular (TFG), de acuerdo a la siguiente formula: $TFG = U \times V/P$ donde

U = Concentración de Creatinina urinaria (mg/mL)

V = Cantidad de orina producida (mL/min)

P = Concentracion de Creatinina plasmática (mg/mL)

Los resultados obtenidos fueron expresados en $\mu\text{L}/\text{min}$.

3.3.3. Determinación de la excreción de proteínas urinarias

Se realizó primero un ensayo cualitativo/semicuantitativo con la tira reactiva Combina 3, para determinar la presencia o ausencia de proteína en la orina, lo cual se aprecia por un cambio de color en la misma, donde cada color representa un rango de concentración. Las muestras positivas fueron evaluadas de forma cuantitativa con el kit comercial Urine Proteins (Sentinel Diagnostics), conforme a las indicaciones del fabricante.

3.3.4. Análisis de creatinina y electrolitos en el suero

Para la determinación de Creatinina sérica se utilizó un método colorimétrico mediante el Kit Creatinina Wiener lab. Para ello, se centrifugó el tubo con sangre a 3000rpm por 10 minutos, y recolectando el suero obtenido. Se utilizó una microtécnica debido a que la cantidad de suero era en general insuficiente para hacerlo mediante el método común. El suero fue mezclado con Reactivo 1, agitando e incubando durante 10 minutos a t° ambiente. Finalizado el tiempo de

incubación se procedió a centrifugar la muestra a 3000rpm durante 10 minutos. Se extrajo una porción del sobrenadante obtenido para mezclarlo con Reactivo 2. Esta nueva solución se incubó durante 20 minutos para finalmente ser leída a 510nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-120-11. La solución Blanco y Estándar se prepararon de la misma manera que para el análisis de Creatinina urinaria. Para la medición, se llevó la absorbancia a 0 con el blanco. Para medir el estándar y las muestras, el rango del equipo se estableció para que los valores obtenidos fuesen entregados como concentración utilizando una concentración del estándar de 2mg/l.

En el caso de la determinación de electrolitos en suero (Sodio, Potasio y Cloro), las muestras fueron leídas de forma directa, sin realizarse ningún tipo de dilución, y en el mismo equipo utilizado para la obtención de electrolitos en orina.

3.4. Estudio de Tejidos

3.4.1. Obtención cortes de tejido

Los tejidos fijados en formalina fueron incluidos en parafina, de los bloques se obtuvo cortes de 4 μm de espesor con un micrótopo (Microm) los que fueron puestos sobre portaobjetos previamente silanizados, para incubarlos a 37°C durante toda la noche.

3.4.2. Tinciones histoquímicas para la evaluación del daño tisular por análisis histológico.

El análisis histoquímico, mediante técnica de PAS, se realizó sobre cortes de tejidos de rata fijados en formaldehído al 4% e incluidos en parafina. Se desparafinó el tejido en batería de alcoholes (Xilol durante 10 minutos (2 veces), alcohol 100% por 5 minutos, alcohol 96% por 5 minutos, y alcohol 70% por 5 minutos). Posteriormente se lavó con H₂O y se procedió a incubar

los cortes en Acido Peryódico 0.5% durante 10 minutos, para luego lavar nuevamente con H₂O enjuagar con dH₂O. Los cortes fueron ahora incubados en reactivo de Schiff durante 15 minutos en oscuridad, para luego ser lavados como en el paso anterior. Se hizo luego una tercera incubación durante 2 minutos con Metabisulfito de Potasio 0.55% y se lavó nuevamente. Para finalizar se hizo una última incubación, ésta vez con Hematoxilina de Harris 0.4% durante un minuto a t° ambiente y luego lavando con exceso de H₂O. Una vez lavadas las muestras se viraron con Borato de Sodio 1% por 1 minuto y se lavaron nuevamente con H₂O. Finalmente los cortes fueron deshidratados (incubando 1 minuto en alcohol 70% y 2 minutos en cada uno de los alcoholes restantes, 95% y 100% (2 veces) y en cada uno de los xiloles, xilol fenicado y xilol (2 veces)). Una vez deshidratadas las muestras se procedieron a montar con bálsamo de Canadá y se dejaron secar bajo campana toda la noche.

3.4.3 Cálculo de Score Histopatológico

Los riñones fueron examinados para evaluar el grado de esclerosis glomerular, presencia de cilindros y signos de daño tubular agudo, siendo cada parámetro cuantificado en una escala semicuantitativa: 0 normal, 1 leve, 2 moderado y 3 severo. Para minimizar influencias, las muestras fueron analizadas al azar y utilizando el método de doble ciego. Finalmente fueron calculados dos score promedio para cada rata y grupo.

3.4.4. Inmunohistoquímica para Citoqueratina 18

Los cortes de 4µm fueron desparafinados en batería de alcoholes (detallada en el punto 3.4.2), luego se inactivo peroxidasa endógena incubando las muestras en una solución de Metanol/H₂O₂ al 3% durante 10 minutos, luego de lo cual fueron lavadas 2 veces en dH₂O

durante 5 minutos cada lavado. Para desenmascarar los antígenos, se incubaron las muestras en buffer citrato 10mM pH 6.0 a 94°C en el microondas durante 15 minutos, dejándolas enfriar durante 3 horas a t° ambiente. Luego de enfriar, se lavaron las muestras en agitación con buffer de lavado (PBS con 0.1% Tween 20) 3 veces durante 5 minutos cada uno, en agitación. Posteriormente se procedió a bloquear sitios inespecíficos con buffer de lavado y 1% BSA por 10 minutos a 25°C, inmediatamente después, se incubó 1 hora con 100µl del Anticuerpo primario M30 Cytodeath monoclonal anti-Citoqueratina 18 clivada hecho en raton (Roche), diluido 1:50 en buffer de incubación, a la misma t°. Terminado el tiempo de incubación, se lavó 3 veces con PBS durante 5 minutos cada lavado y en agitación. Se utilizó el Anticuerpo secundario anti-IgG biotinilado BA 2000 diluido 1:200 en buffer de incubación, usando 200µl por muestra, e incubando a 37°C por 30 minutos. Nuevamente se hicieron 3 lavados en las mismas condiciones que se realizó anteriormente. Se preparó el complejo Estreptovidina-Peroxidasa, diluido en buffer de lavado, en razón 1:500 y se incubaron las muestras por 30 minutos a 25°C, luego se lavó nuevamente con PBS y se reveló con DAB. Una vez revelada las muestras, se realizó tinción de contraste con Hematoxilina por 1 minuto eliminando el exceso con H₂O para posteriormente virar con borato de sodio 1% durante 30 segundos. Finalmente se deshidrataron las muestras en batería de alcoholes y xiloles incubando durante un minuto en alcohol 70% y 2 minutos en alcohol 96%, alcohol 100%, alcohol 100% nuevamente, Xilol fenicado, Xilol y Xilol nuevamente. Una vez deshidratadas las muestras montaron con bálsamo de Canadá y se dejaron secar bajo campana toda la noche.

3.4.5. Inmunohistoquímica para calicreina

Luego de desparafinar, se inhibió la peroxidasa endógena con H₂O₂ 3% por 15 minutos. Se bloquearon las uniones inespecíficas con Protein Block Serum-Free (DakoCytomation) por 1 hora a 22°C. Inmediatamente, se colocó anticuerpo primario policlonal anti-Caliceína hecho en conejo (Calbiochem) diluido 1:1000 con BSA 1% toda la noche a 4°C, luego se incubó con el sistema LSAB System-HRP (DakoCytomation). Se reveló con DAB (Vector Laboratories) el cual actúa como sustrato de HRP, produciendo un precipitado de color marrón que indica la localización del anticuerpo primario. Se contrastó con hematoxilina. Al incubar con cada anticuerpo se realizaron 3 lavados de 5 minutos con TPS (Tris HCl pH 7,8) en constante agitación. Los controles negativos fueron realizados por omisión del anticuerpo anti-Caliceína y se reemplazó por buffer TPS o inmunoglobulina G de conejo no inmune 1:1000.

3.4.6. Cuantificación Inmunohistoquímica

La cuantificación de la inmunotinción para Caliceína tisular y Citoqueratina 18 fue realizada con el analizador KS 300 imaging system 3.0. Para cada inmunotinción se obtuvo un promedio de 20 campos analizados en cada corte a un aumento de 20x. Las lecturas se restringieron a regiones tubulointerciliales, con exclusión de vasos, y glomérulos en el caso de Caliceína tisular. Los resultados fueron expresados en densidad/mm² de tejido y se les realizó un análisis estadístico (Mann-Whitney-U-test).

3.5. Western blot de Caspasa 9

3.5.1. Extracción de proteínas

Los tejidos obtenidos luego del sacrificio fueron pesados en balanza analítica, agregando 10ml de buffer de lisis por cada gramo de tejido, incluyendo el coctel de inhibidores de proteasas (Proteasas de serina, cisteína y calpaína) , agregando 1µl por cada 100µl de buffer de lisis. Cada muestra fue homogenizada completamente en buffer de lisis, y se centrifugada a 10000rpm por 5 min. Se tomó una alícuota del sobrenadante obtenido para su cuantificación mediante método de Bradford. El resto del sobrenadante fue mezclado con buffer de carga 4x (Tris-HCl 0.25M pH 6.8, glicerol 40%, azul de bromofenol 0.04%, SDS 8%, DTT 0.5M), calentado a 97°C por 5 min. y almacenado a -80°C para la posterior electroforesis.

3.5.2. Cuantificación de proteínas

El sobrenadante obtenido se utilizó para determinar la concentración de proteínas extraídas mediante el método de Bradford (1976), que se basa en la afinidad de las proteínas por el colorante azul de Coomassie. Se construyó una curva de calibración a partir de un stock de BSA (250mg/ml). Las muestras a analizar fueron diluidas 20 veces para que los valores de absorbancia estuviesen dentro del rango de la curva. Cada dilución tuvo un volumen final de 100µl. El reactivo de Bradford fue diluido en razón 1:4, utilizando 1ml de esta dilución para cada análisis, para luego incubar por 15 min y leer la absorbancia a 595nm. Se utilizó un blanco con agua con el cual se llevó a la absorbancia a cero y otro blanco con el reactivo de lisis cuya absorbancia fue restada a la obtenida para cada muestra para tener el valor neto.

Para calcular la concentración de cada muestra de proteína se utilizó la siguiente fórmula

$$K \text{ (Constante de curva)} = A \text{ (Abs. 595nm)} / C \text{ (Concentración)}$$

Luego de obtener cada absorbancia y conociendo la concentración de cada punto de la curva de calibración, mediante los estándares, se obtuvo el K promedio. Con este valor se determinó la concentración de cada muestra desconocida y luego, multiplicando por el factor de dilución (20) se obtuvo la concentración final.

3.5.3. Separación electroforética en geles de Poliacrilamida-SDS (SDS- PAGE)

SDS es un detergente aniónico cuya función es desnaturalizar proteínas mediante su unión alrededor de la cadena de aminoácidos, confiriéndole una carga negativa proporcional a su longitud y en su presencia, la migración de las proteínas está determinada por su peso molecular. Para la separación electroforética de proteínas se utilizó un gel de poliacrilamida al 15%. Los geles separador y espaciador se prepararon de un grosor de 1,5mm a partir de una solución de Acrilamida/Bis-acrilamida al 30%. Se preparó gel separador (15%) partir de gua destilada, Acrilamida/Bisacrilamida, TRIS-HCl 1.5M pH 8.8, 10% SDS, PSA y TEMED. El gel espaciador (5%) se preparo a partir de las mismas soluciones excepto por la utilización de TRIS-HCl 1.0M pH 6.8 Se cargó 50µg de cada muestra por pocillo, previamente calentada a 40°C durante un minuto. El gel fue corrido durante 2 horas a 130V en buffer de corrida 1X (TRIS base 25mM, Glicina 192mM y 800µl SDS 10%).

3.5.4. Electrotransferencia e inmunodeteccion

Finalizada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF, la que fue previamente secada durante una hora a 37°C y luego activada en metanol por 15

segundos, agua destilada durante 2 minutos y buffer de transferencia (TRIS base 25mM, Glicina 192mM y 80 ml metanol pH 8,3) por 5 minutos. Se armó el sistema de transferencia, consistente de varias capas, empezando por una esponja embebida en el buffer de transferencia, seguida de un trozo de papel whatmann n°3, el gel de proteínas, la membrana de PVDF, otro papel filtro y una nueva esponja, todo fijado adecuadamente dentro de un soporte plástico. Este “sandwich” se colocó en la cámara de transferencia junto con el buffer, cuidando que el gel con las proteínas quede del lado del cátodo y la membrana de PVDF hacia el ánodo. La electrotransferencia se realizó a 50mA durante 14 horas a temperatura ambiente.

Una vez terminada la transferencia la membrana se activó nuevamente en metanol por 15 segundos y se bloquearon los sitios inespecíficos incubando con buffer de bloqueo (1% BSA, 0.05% Tween 20 y PBS pH 7,4) durante una hora a t° ambiente en agitación. Terminado el lavado se incubó una hora con el anticuerpo primario monoclonal anti Caspasa 9 isotipo igG1 hecho en raton (Cellsignaling) diluido 1:4000 en buffer de bloqueo, los anticuerpos unidos inespecíficamente se eliminaron lavando 3 veces con PBS pH 7,4 durante 10 minutos cada lavado. Posteriormente se incubó con anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa diluido 1:100000 en solución de bloqueo, durante una hora en agitación. Terminada la hora de incubación se lavó nuevamente con PBS pH 7,4 de la misma forma que la vez anterior. Luego del último lavado, se expuso la membrana a luminol contenido en buffer de peróxido de hidrógeno 1:1 incubando, en oscuridad, por 5 minutos a t° ambiente. Se eliminó el exceso de solución y la membrana fue llevada dentro de un cassette a una sala oscura (cuarto de revelado fotográfico), expuesta una película para luego ser incubada en solución de revelado y posteriormente en solución de fijación por un tiempo de 2 minutos en cada una.

El ensayo de detección de GAPDH se realizó de manera idéntica a la de Caspasa 9. El anticuerpo utilizando anticuerpo primario monoclonal anti GAPDH (Millipore) isotipo IgG1 hecho en raton, y con una dilución de 1:20000.

3.5.5. Cuantificación de los resultados de Western Blot

La cuantificación de Western Blot se realizó mediante el programa ImageJ, donde la imagen obtenida de los films se convirtió a escala de grises de 8-bits, eliminando el background, para luego invertir los colores. Cada banda fue delimitada y cuantificada de forma individual. Los valores obtenidos fueron expresados en densidad integrada. Una vez obtenidos los valores se obtuvo la razón entre la Caspasa inactiva y la activa, para finalmente sacar la razón entre este valor y GAPDH (Densidad Relativa).

3.6. RT-PCR Semicuantitativo para KIM-1

3.6.1. Diseño de partidores

Los oligonucleótidos KIM-1 (**forward** 5'GGG GTG GTG GGT CAC CCT GT 3' y **reverse** 5' GTG GGC CTT GTG GTT GTG GGT 3') fueron diseñados para amplificar un segmento de 371pb correspondiente a las posiciones 680-1051 (AF035963.1) obtenida en NCBI (National Center for Biotechnology Information). Los criterios a considerar para cada diseño fueron: tamaño del fragmento a amplificar, t° de alineamiento, existencia de secuencias palindrómicas, largo y porcentaje GC de cada oligonucleótido, y especificidad de cada uno, según Innis y col (1995). Las propiedades termodinámicas fueron analizadas a través del uso del

software NTI advance 10 (Invitrogen). La especificidad de unión se ensayó mediante el uso del programa de alineamiento BLAST, aplicación proporcionada por NCBI.

3.6.2. Extracción de RNA total con trizol

Los tejidos de riñón provenientes de cada grupo fueron sometidos al proceso de extracción de RNA total utilizando el método de extracción fenólica con Trizol. Cada trozo de tejido fue sumergido en trizol para luego ser homogenizado en hielo. La inactivación de las RNasas y destrucción de las membranas celulares, se realizó mediante la incubación de los homogenizados 5-10 min a temperatura ambiente. Por cada ml de solución de extracción se agregaron 200 µl de cloroformo y las muestras fueron mezcladas 15 segundos por inversión, luego incubadas a temperatura ambiente por 3 minutos y centrifugadas a 5 °C, 12000g, por 15 minutos. La fase superior, que contiene el RNA total, fue mezclada por inversión con alcohol isopropílico en razón 1:1, y se incubó 10 minutos a t°ambiente para lograr la precipitación del RNA. Se centrifugó a 5°C, 12000 g, por 10 min; se eliminaron los sobrenadantes y se lavaron los precipitados con etanol 75% (con agua DEPC), seguido de agitación breve en vortex y centrifugación a 5°C, 7500g, por 5 minutos. Se eliminó el nuevo sobrenadante y se dejó secar el precipitado de RNA a temperatura ambiente por 10 minutos. Los precipitados fueron resuspendidos cuidadosamente en 40µl de agua DEPC. Para ayudar a disolver el RNA cada resuspension fue incubada a 55°C por 5 minutos en Termomixer

3.6.3. Cuantificación de las muestras de RNA

Para determinar la concentración del RNA, se diluyó una alícuota de la muestra obtenida 1:250 y se procedió a leer su absorbancia a 260nm (ácidos nucleicos), también se realizó una

medición a 280nm (proteínas) y obtener la razón 260/280 la cual debe ser 1.8-2.0 para muestras de óptima calidad. Una unidad de absorbancia a 260nm corresponde a una concentración de 40 μ g/ml de RNA.

Cálculo de la concentración:

$$Abs. 260 \text{ nm} \times 40 \text{ (constante para RNA; } 1 \text{ } OD_{260} = 40 \text{ } \mu\text{g/mL}) \times 250 \text{ (factor de dilución)} = \mu\text{g/ml}$$

RNA

3.6.4. Digestión de trazas de DNA genómico con DNasa I

Para evitar la interferencia de trazas de DNA genómico y cationes divalentes en las muestras de RNA total, éstas fueron tratadas con DNasa I, DNA-*free*. La reacción se llevó a cabo mezclando RNA, buffer DNasa I 10X (100mM Tris-HCl (pH 7,5), 25mM MgCl₂, 5mM CaCl₂), rDNasa I y agua libre de nucleasas. Se incubó por 30 minutos a 37°C, después de lo cual se inactivó la DNasa I a través de la adición de reactivo específico para ese propósito. Luego se incubaron las muestras durante 2 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron por 2 minutos a 10000rpm. El sobrenadante fue almacenado para posterior retrotranscripción.

3.6.5. Reacción de Transcripción Reversa

Se obtuvo una alícuota del sobrenadante obtenido en el punto 3.6.3al cual se adicionó un mix de partidores al azar y oligodt, luego se incubó a 70°C durante 5 minutos y otros 5 minutos adicionales en hielo. Terminado el tiempo de incubación se realizó una centrifugación rápida por 30 segundos A la solución preparada se adicionó buffer RT 5x, MgCl₂ 25mM, mix de dNTPs, RNAsin, enzima transcriptasa reversa y agua libre de nucleasas, obteniendo un volumen final de

25µl. Este mix de reacción fue incubado durante una hora a 37°C, se finalizó la retrotranscripción inactivando la enzima mediante una incubación de 15 minutos a 75°C.

3.6.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para KIM-1

La reacción de polimerización en cadena (PCR) se basa en ciclos repetidos de tres etapas simples necesarias para cualquier reacción de amplificación de DNA: Denaturación, Alineamiento y Extensión. La síntesis de las hebras nuevas es llevada a cabo por la DNA polimerasa de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus* (*Taq* pol), amplificando exponencialmente una región definida del DNA molde (Delidow *et al.*,1996).

La mezcla de reacción de PCR contuvo buffer Green Gotaq 5X (7.5 mM MgCl₂, pH 8,5), mix de dNTPs 5mM, primer forward 10mM, primer reverse 10mM, Taq DNA polimerasa, cDNA y agua libre de nucleasas obteniendo un volumen final de 20µl, utilizando como control negativo mix de amplificación sin templado. La reacción de PCR consistió en un paso de denaturación inicial del DNA a 94°C por 5 minutos seguido por 26 ciclos de 94°C por 30 segundos, 57°C por 35 segundos y 72°C por 45 segundos; al término de los ciclos de PCR, las muestras fueron sometidas a una extensión final a 72°C por 5 minutos almacenando las muestras a 4°C. Se utilizó GAPDH como normalizador constitutivo, ya que este posee una gran estabilidad en cuanto a los niveles de transcripción y es utilizado también como normalizador en el Western-Blot.

3.6.7. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La visualización de los fragmentos obtenidos se realizó por electroforesis en geles horizontales de agarosa al 1,2% preparados en solución TAE y preteñidos con bromuro de etidio.

El gel se corrió por 50 minutos a 100V en TAE y se cargó 5µl de cada muestra de DNA. Al finalizar la separación se visualizó el DNA al exponer el gel bajo la luz UV en el transiluminador.

3.6.8. Cuantificación RT-PCR

La cuantificación relativa de RT-PCR se realizó mediante el programa ImageJ, para esto la imagen obtenida del gel se convirtió a escala de grises de 8-bits, luego mediante el mismo programa se eliminó el ruido de fondo para luego invertir los colores. Cada banda fue delimitada y cuantificada de forma individual y los valores obtenidos fueron expresados en densidad integrada. Una vez obtenidos los valores se obtuvo la razón entre KIM-1 y GAPDH

3.7. Análisis Estadístico

Un programa estadístico comercial (GraphPad InStat®, versión 3.01 para Windows 95/NT, San Diego CA, USA) fue utilizado para estos análisis. Los valores fueron expresados como la media \pm la desviación estándar. Se utilizó como nivel de significancia un $P < 0.05$. Para analizar las posibles diferencias entre dos grupos, y considerando el pequeño número de sujetos por grupo, se utilizó el test no paramétrico de Mann-Whitney.

4. RESULTADOS.

4.1. Evaluación Clínica de las ratas en estudio

Los parámetros fisiológicos analizados en orina y la evaluación estadística entre los distintos grupos con respecto a valores basales se resumen en las tablas I y II.

Tabla I. Parámetros fisiológicos analizados en las ratas del grupo CIS-N

	Día 0	Día 1	Día 3	Día 7
Peso	389,8 ± 41,11	366,87 ± 37,9	331,75 ± 33,9*	329 ± 59,24
Diuresis (ml/día)	23,32 ± 9,51	31,74 ± 11,93	16,72 ± 7*	13,22 ± 9,29*
Proteinuria (gr/l)	1.14 ± 0.36	0.82 ± 0.33*	1.19 ± 0.41	1.73 ± 0.37*
Na+ urinario mEq(l)	20,46 ± 10,13	24,49 ± 13,52	31,73 ± 19,91	19,62 ± 16,82
K+ Urinario (mEq/l)	47,35 ± 13,36	42,33 ± 18,5	72,97 ± 32,25*	35,1 ± 20,53
Cl- Urinario (mEq/l)	50,8 ± 19,97	38,94 ± 20,79	58,41 ± 33,68	78,82 ± 59,38
Creatinina Urinaria (mg/L)	92,28 ± 27,44	50,23 ± 26,65*	66,66 ± 27,47*	29,25 ± 9,1*
Creatinina Serica (mg%)	N.D.	N.D.	2,51 ± 0,38	5,13 ± 3,07
Clearance reatinina (µL/min)	N.D.	N.D.	363,7 ± 95,43*	54,97 ± 29,45*

*P <0.05 (vs CIS-N día 0)

N.D. No Determinado

Tabla II. Parámetros fisiológicos analizados en las ratas del grupo CIS-K

	Día 0	Día 1	Día 3	Día 7
Peso	323,2 ± 43,56	312 ± 20,97	290 ± 18,84*	298,5 ± 25,36
Diuresis (ml/día)	11,56 ± 4,76	5,97 ± 2,46*	10,83 ± 3,42	15,5 ± 6,38
Proteinuria (gr/l)	1.1 ± 0.46	0.96 ± 0.3	1.16 ± 0.42	1.16 ± 0.2
Na+ urinario mEq(l)	39,67 ± 28,87	88,33 ± 34,29*	73,5 ± 17,65*	32 ± 14,37
K+ Urinario (mEq/l)	246,99 ± 68,4	277,24 ± 81,46	81,47 ± 18,3*	64,83 ± 20,85*
Cl- Urinario (mEq/l)	260,57 ± 63,5	324,86 ± 76,54	93,93 ± 29,5*	73,67 ± 30,92*
Creatinina Urinaria (mg/L)	104,97 ± 35,6	170,39 ± 72,8*	68,43 ± 19,4*	71 ± 22,7*
Creatinina Serica (mg%)	N.D.	N.D.	4,29 ± 0,98	2,06 ± 0,93
Clearance reatinina (µL/min)	N.D.	N.D.	166,4 ± 77,2*	378,7 ± 163,7

*P <0.05 (vs CIS-K día 0)

N.D. No Determinado

4.1.1 Peso corporal

Se observó una disminución paulatina del peso corporal en el grupo control, sin embargo, esta reducción de peso se vió atenuada en más de la mitad dentro del grupo protegido (Figura 5; Tabla I y II). Para ambos grupos se observó una mayor reducción al día 3 ($P < 0,05$).

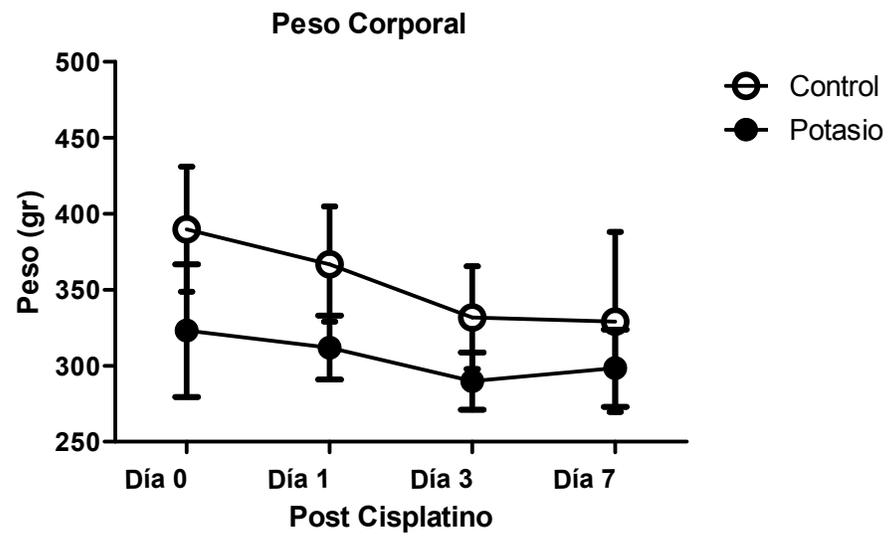


Figura 5. Peso Corporal de las ratas en el modelo experimental. Peso corporal promedio (gr.) y su desviación estándar para ambos grupos en estudio, al día previo y los días 1, 3 y 7 luego de la inyección de cisplatino. (n=8).

4.1.2 Diuresis

Las ratas del grupo sin pretratamiento experimentaron un aumento en la diuresis para luego disminuir de manera significativa los días 3 y 7 ($P < 0,05$). En las ratas del grupo pretratado, sólo se observó diferencia al día 1 ($P < 0,05$), siendo menor a la diuresis basal, para luego subir y alcanzar valores similares a los del día 0. Al comparar las diuresis de las ratas entre los grupos, al mismo día de tratamiento, se pudo observar diferencias significativas el día 1 y 3 ($P < 0,05$), siendo más abundantes en grupo control (Figura 6; Tabla I y II).

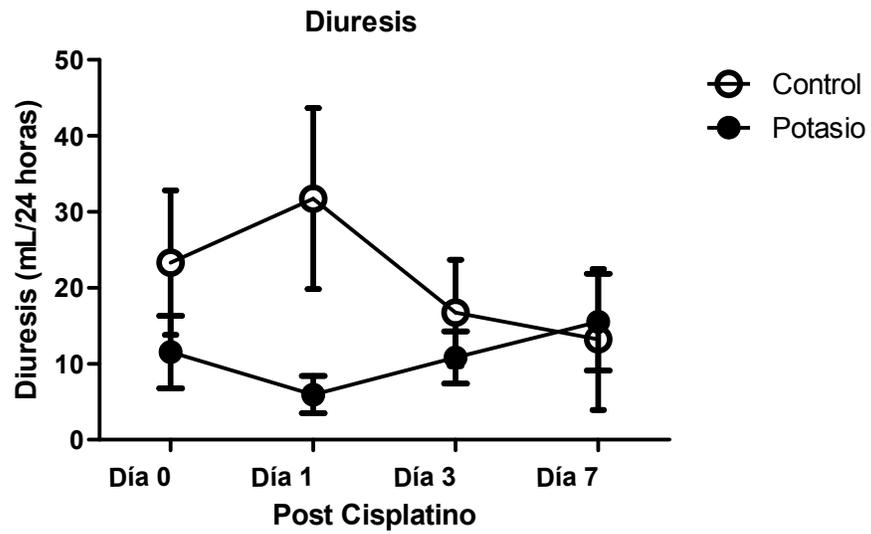


Figura 6. Diuresis de las ratas en el modelo experimental. Los niveles de orina de 24 horas fueron obtenidos al día previo y a los días 1, 3 y 7 post inyección para ambos grupos. Las mediciones fueron expresadas en mL (n=8).

4.1.3 Proteinuria

Dentro del grupo control, la proteinuria mostró un aumento paulatino con el paso de los días. Sin embargo, el grupo protegido con potasio, fue capaz de mantener los niveles de proteína urinaria, similar los basales durante todo el ensayo, sugiriendo una capacidad de protección importante. Al comparar los niveles de proteinuria entre ambos grupos, se pudo observar diferencias significativas al día 7, obteniendo valores inferiores en el grupo estimulado (Figura 7; Tabla I y II).

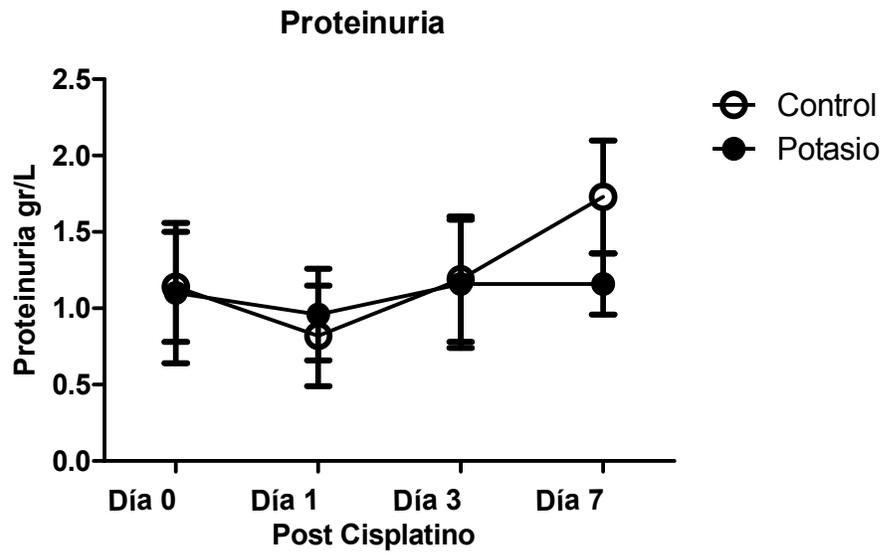


Figura 7. Proteinuria de las ratas en el modelo experimental. Se determinó la cantidad promedio de proteínas presente en la orina obtenidas para cada rata en los distintos días de ensayo (n=8).

4.1.4 Electrolitos

El grupo control no presentó mayor variación en sus niveles de electrolitos durante el transcurso del estudio para ninguno de los iones estudiados. (Tabla I y II).

El grupo protegido mostró niveles elevados tanto de K^+ como de Cl^- algo esperable considerando la dieta a la que fueron sometidos previamente, sin embargo sufrieron una disminución significativa desde el tercer día ($P < 0.05$) para ambos electrolitos. En el caso del Na^+ , no se detectaron diferencias importantes durante el ensayo.

Al comparar ambos grupos, los iones estudiados se presentaron en mayor proporción en el grupo sometido a pretratamiento con KCl durante todo el ensayo, observándose diferencias significativas al día 0, 1 y 3 para Na^+ y Cl^- . El K^+ fue el único ión que presentó una diferencia significativa también al día 7 (Figura 8) ($P < 0.05$).

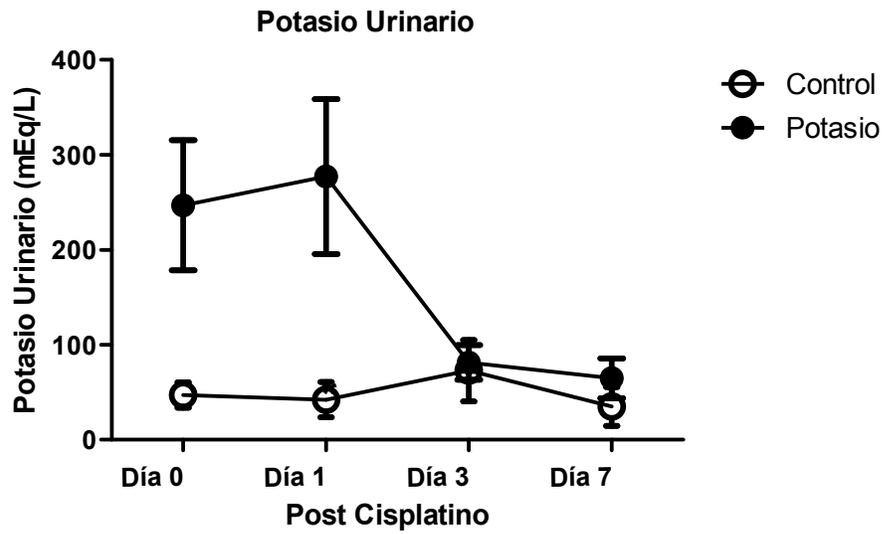


Figura 8. Potasio Urinario de las ratas en el modelo experimental. Los niveles de potasio urinario fueron obtenidos al día previo y a los días 1, 3 y 7 post inyección para ambos grupos. Las mediciones fueron expresadas en mEq/L (n=8).

4.1.6 Creatinina urinaria

Al analizar los niveles de creatinina urinaria, el grupo control presentó una disminución significativa posterior a la inyección de cisplatino, durante todos los días de estudio ($P < 0,05$). En tanto, dentro del grupo protegido se observó un aumento al día 1, para luego disminuir de manera significativa los días restantes ($P < 0,05$). Al comparar los valores entre ambos grupos, sólo se observó diferencias significativas los días 1 y 7, siendo mayor en ambos casos para el grupo tratado previamente con Potasio (Figura 9; Tabla I y II).

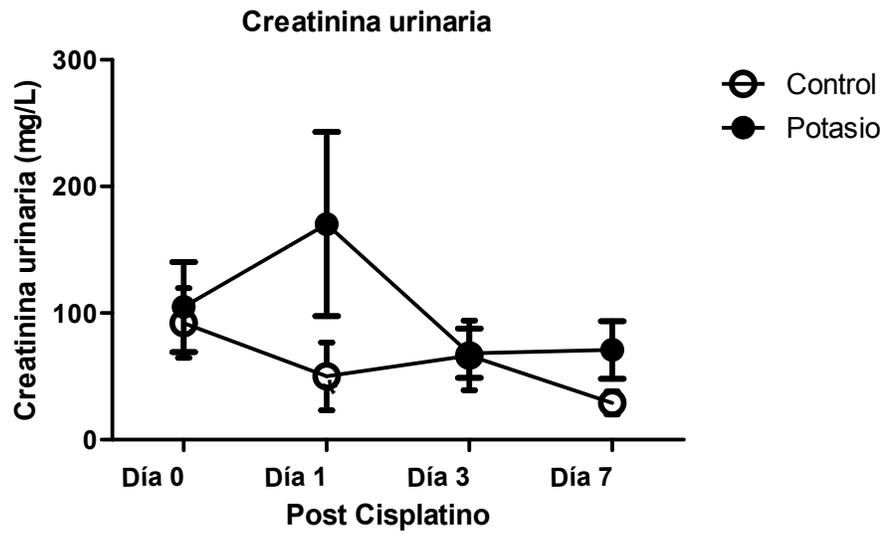


Figura 9. Actividad de Creatinina Urinaria de las ratas en el modelo experimental. Variación en la concentración de Creatinina urinaria tanto en ratas control como en las protegidas, los días previo y 1, 3 y 7 posterior a la inyección de cisplatino (n=8).

4.1.5 Creatinina Sérica

Los valores de Creatinina sérica, dentro del grupo control, estuvieron por sobre los valores de ratas sanas (0.5mg% datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Nefrología del Hospital Base de Valdivia), mostrando un aumento con el paso de los días.

En cambio, el grupo protegido mostró una reducción de la creatinemia durante el ensayo, observándose una tendencia de restauración hacia los valores normales.

Al comparar ambos grupos entre sí, el grupo protegido presentó una disminución importante en los niveles de creatinina sérica, disminución que no se presentó en el grupo control (Figura 10).

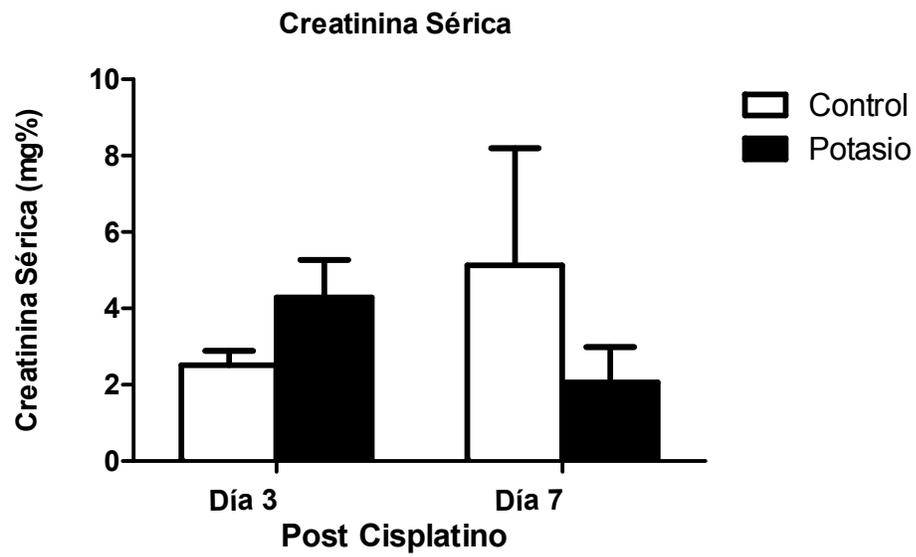


Figura 10. Creatininemia de las ratas en el modelo experimental. Variación en la concentración de Creatinina sérica tanto en ratas control como en las protegidas, los días 3 y 7 post inyección (n=5)

4.1.6 Clearance de Creatinina

Al analizar el Clearance de Creatinina del grupo control (Figura 11), los valores se encontraron disminuidos respecto a valores de ratas sanas, (700uL/min. datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Nefrología del Hospital Base de Valdivia), observándose una reducción significativa ($P > 0.05$) con el paso de los días.

El grupo protegido si bien presentó valores bajo los normales, mostró una recuperación importante del clearance con el paso de los días obteniéndose un máximo de éste al día 7, patrón que traduce en una importante protección en los animales cuyo Sistema Calicreína-Cininas fue estimulado.

Al comparar el clearance de creatinina entre ambos grupos, el grupo protegido mostró una tendencia a la restauración de valores clínicos normales durante el transcurso del ensayo, tendencia totalmente opuesta a la observada en el grupo control, el cual mostró una disminución del mismo.

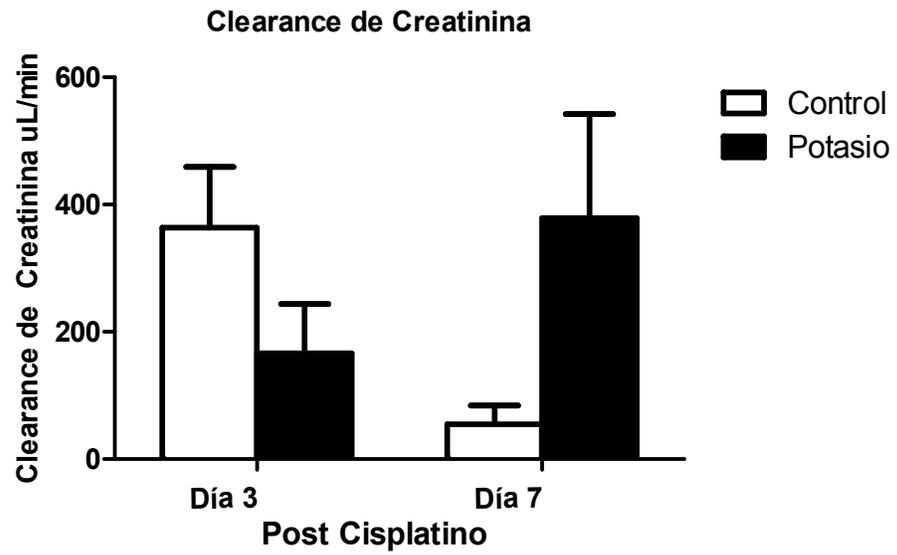


Figura 11. Clearance de Creatinina de las ratas en el modelo experimental. Se determinó el Clearance de Creatinina para ambos grupos de ratas los días 3 y 7 posterior a la inyección de Cisplatino, estos valores fueron expresados en uL/min (n=5).

4.2. Estudio de tejidos

4.2.1. Análisis Histoquímico

El análisis histopatológico permitió apreciar los cambios ocurridos en el tejido renal para cada grupo durante el transcurso del estudio.

En el día 0, tanto en el grupo control como en el que recibió potasio, se observó glomérulos, túbulos proximales y distales de morfología normal en la región cortical y cortico-medular (Figura 12 a y b). Al día 3 ya fue posible observar algunos indicios de daño en ambos grupos mediante la presencia de cilindros hialinos en el lumen de algunos túbulos distales (Figura 12 c y d). En el último día, en ambos grupo se pudo observar un aumento considerable del daño a nivel tubular, caracterizado por una extensa dilatación y aplanamiento de células, abundantes túbulos renales con cilindros hialinos, vacuolización epitelial, pérdida del reborde en cepillo de los túbulos proximales y descamación de células epiteliales (Figura 12 e y f). Al comparar los valores de score histopatológico de daño tubular agudo entre el grupo control y el grupo protegido con potasio, al mismo día de tratamiento, no fue posible observar diferencias significativas en los días de estudio (Figura 13; Tabla III).

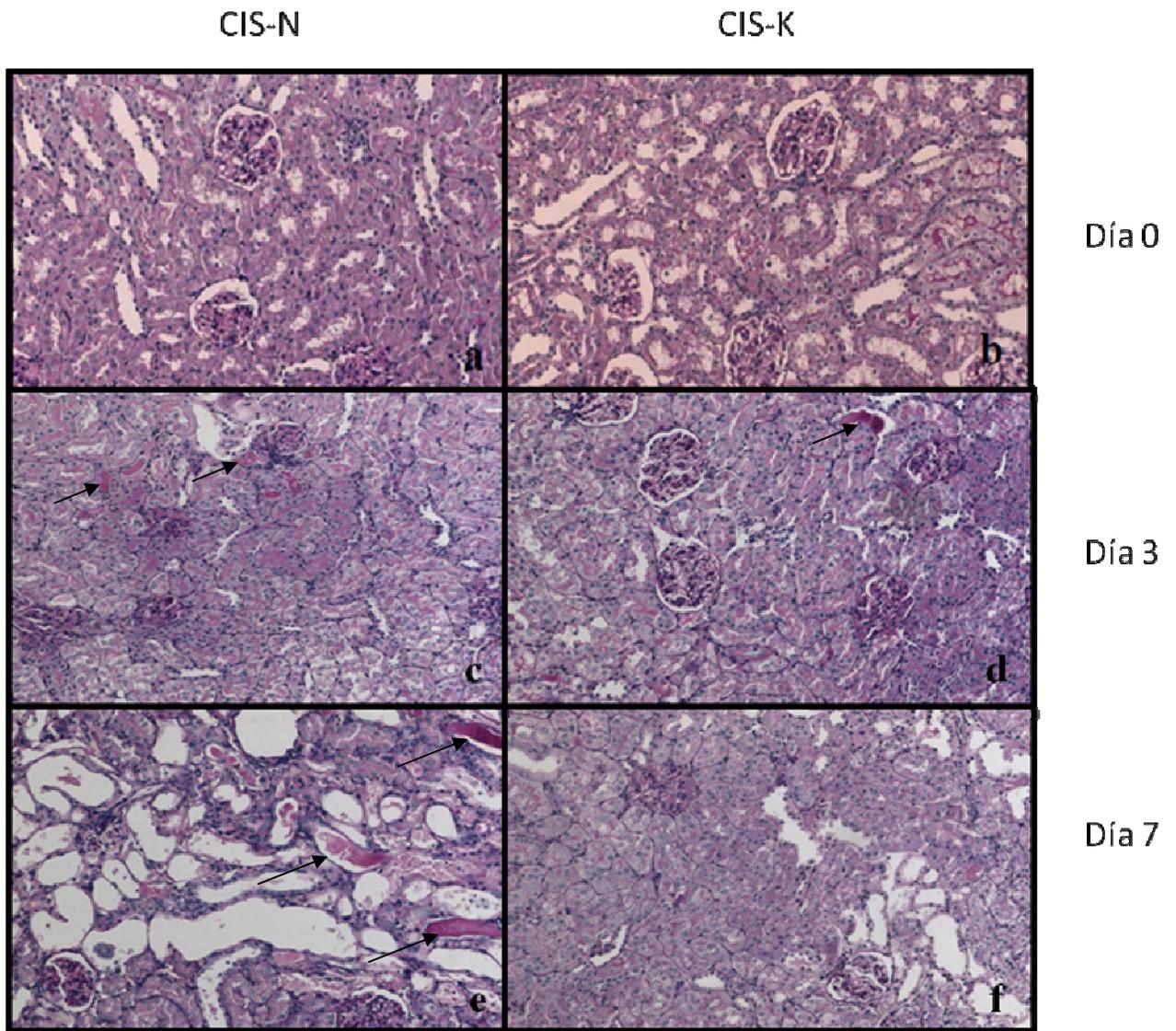


Figura 12. Análisis Histoquímico de la zona Corticomedular: Tinción PAS. Riñones de ratas del grupo CIS-N a los 0 (a), 3 (c), y 7 (e), días después de la inyección de cisplatino. Riñones de ratas del grupo CIS-K a los 0 (b), 3 (d), y 7 (f), días después de la inyección de cisplatino y previo al tratamiento por 4 semanas con KCl 2%. Magnificación 20x. Las flechas indican presencia de cilindros hialinos.

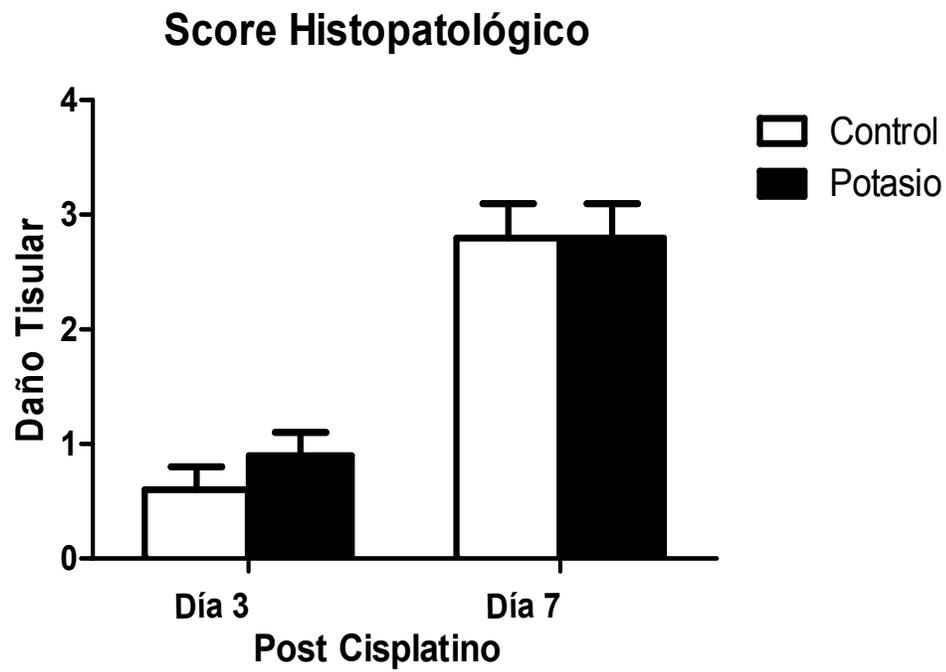


Figura 13. Score Histopatológico daño tubular agudo. Se presentan los valores obtenidos luego de la evaluación, y cuantificación semicuantitativa, del nivel de daño tisular expuesto por ambos grupos durante el modelo experimental (n=8).

Tabla III. Score Histopatológico Daño Tubular Agudo de las ratas en el modelo experimental

	Día 0	Día 3	Día 7
CIS-N	0,0 ± 0,0	0,6 ± 0,2*	2,8 ± 0,3*
CIS-K	0,0 ± 0,0	0,9 ± 0,2#	2,8 ± 0,3#

*P < 0,05 (vs grupo control día 0)

#P < 0,05 (vs grupo tratado día 0)

En la Tabla III se puede observar los valores del score histopatológico de daño tubular agudo para ambos grupos a lo largo del experimento. Tanto en el grupo control como en el grupo tratado, se pudo observar un aumento significativo de daño histológico los días 3 y 7 ($P < 0,05$) con respecto a valores basales.

4.2.2. Inmunohistoquímica de Calicreína Tisular

Se pudo observar inmunotinción de calicreína en el nefrón distal de la región cortical y cortico-medular, correspondientes a células del túbulo conector, característico de un riñón de rata normal (Figura 14a). Los animales del grupo CIS-N una baja expresión de Calicreína tisular desde el primer día, disminuyendo significativamente con el paso de los días ($P < 0,05$), (Figura 14c y e; Figura 15; Tabla IV). Por su parte, las ratas del grupo pretratado con potasio mostraron un alto nivel de expresión de calicreína tisular durante todo el experimento (Figura 14b, d, f; Figura 15; Tabla IV).

Al realizar un análisis comparativo entre ambos grupos, el grupo pretratado presentó valores significativamente superiores a los obtenidos en el grupo control desde el día 0 hasta el final del estudio.

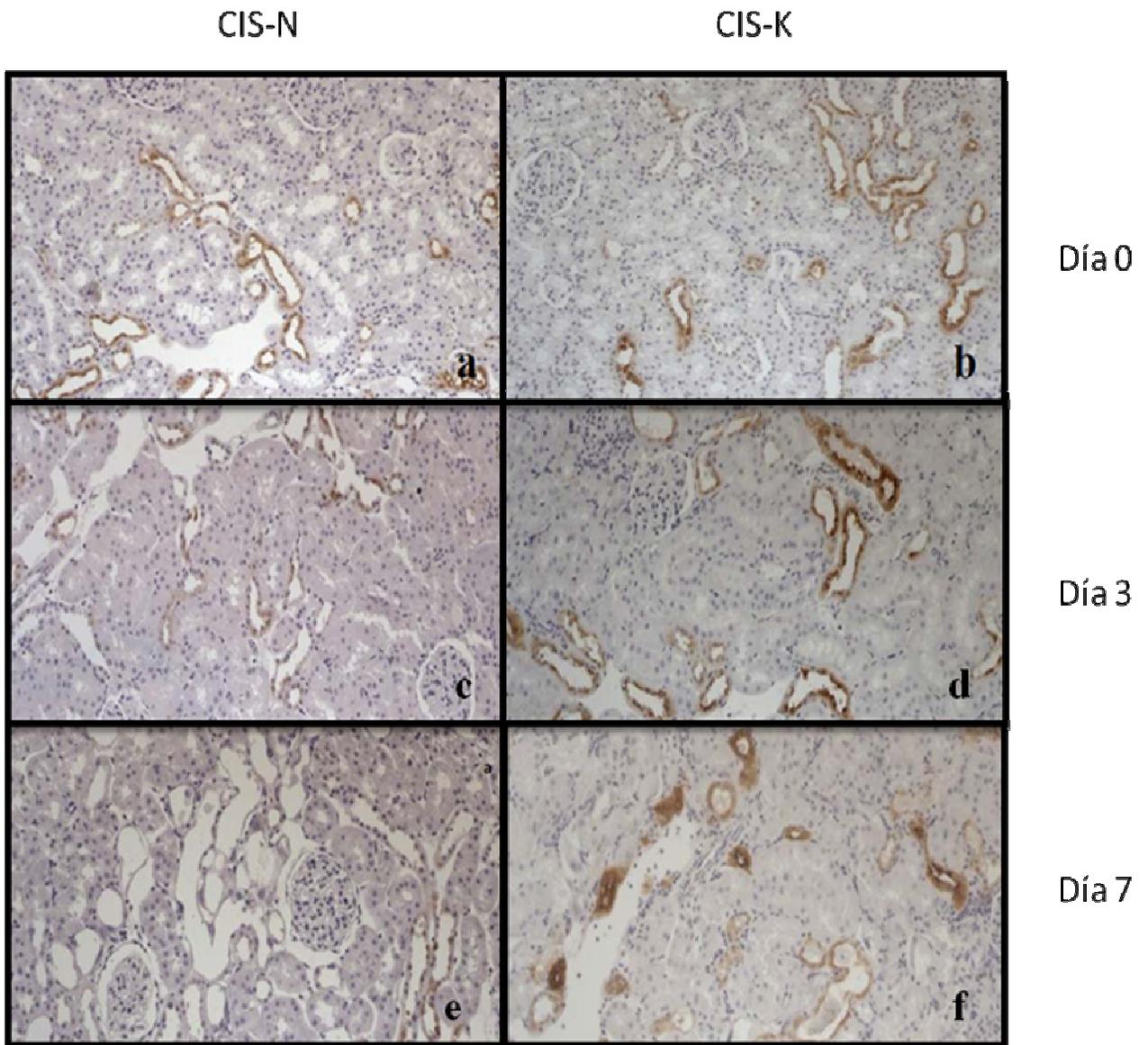


Figura 14. Inmunohistoquímica de Calicreína Tisular Riñones de ratas del grupo CIS-N a los 0 (a), 3 (c), y 7 (e), días después de la inyección de cisplatino. Riñones de ratas del grupo CIS-K a los 0 (b), 3 (d), y 7 (f), días después de la inyección de cisplatino y previo al tratamiento por 4 semanas con KCl 2%. Magnificación 20x.

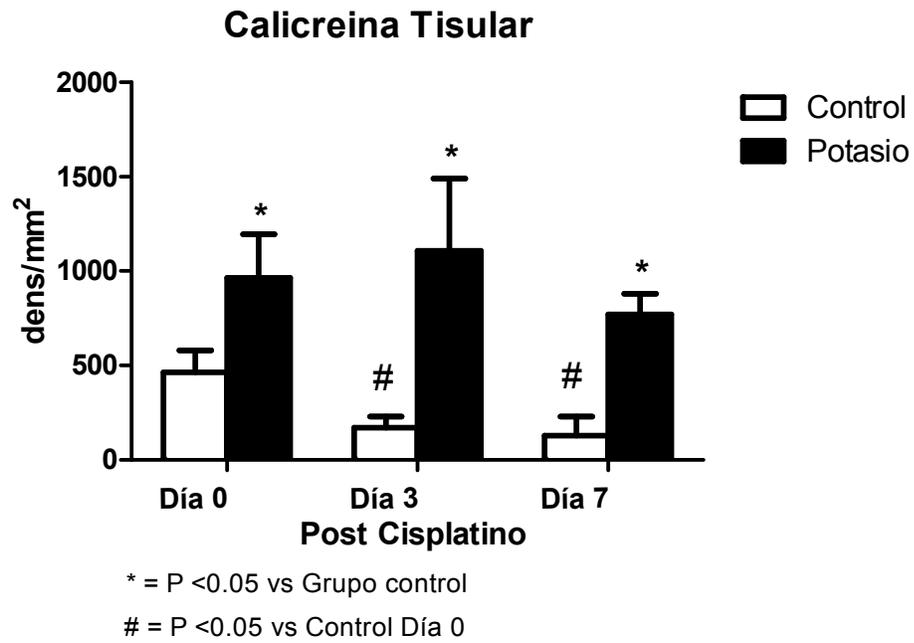


Figura 15. Cuantificación de Caliceína Tisular. Se obtuvo los valores de la expresión de caliceína tisular cuantificado mediante el analizador KS 300 imaging system 3.0. Se midió un promedio de 20 segmentos para cada corte a un aumento de 20x, los resultados fueron expresados en densidad/mm² de tejido (n=8)

Tabla IV. Cuantificación Inmunohistoquímica de Calicreína tisular (densidad/mm²) en el modelo experimental

	Día 0	Día 3	Día 7
CIS-N	464,8 ± 116,5	171,3 ± 57,2	129,3 ± 100
CIS-K	963,6 ± 231,5	1108 ± 383,2*	771,1 ± 109,6*

*P < 0,05 (vs CIS-N)

Al comparar los valores de calicreína renal entre ambos grupos al mismo día, se pudo observar que las ratas que recibieron KCl 2% en agua presentaron valores significativamente superiores los días 0, 3 y 7 con respecto a las ratas control (Figura 15). El tratamiento con potasio en las ratas protegidas permitió estimular el SCC y observar células hipertrofiadas con una mayor intensidad de expresión de calicreína comparadas a las ratas del grupo control (Figuras 14b, d, f).

4.2.3. Inmunohistoquímica de Citoqueratina 18

Citoqueratinas son proteínas fibrosas, las cuales forman los filamentos intermedios del citoesqueleto celular. Se ha visto que durante la muerte celular estas proteínas son clivadas posibilitando la unión de antígenos, que previamente no tenían la capacidad de unirse a estas proteínas. La proteólisis de la citoqueratina 18 genera un epítoto asequible para la detección temprana de la apoptosis, de manera indirecta, mediante un anticuerpo específico para este sitio (M30), pudiendo detectarse incluso previamente a otras técnicas como anexina V o TUNEL (Mathie y col. 1999). La tinción obtenida es de tipo granular tiñiendo la porción citoplasmática tanto de las células tubulares como glomerulares.

La inmunohistoquímica para proteólisis de Citoqueratina 18 permitió observar una tinción en la zona cortico-medular del riñón. En el grupo control, se observó un aumento de la tinción durante el transcurso del ensayo, exhibiéndose tanto a nivel tubular, glomerular, y en células que se encuentran en proceso de descamación. Dentro del grupo protegido, la cuantificación de la tinción se mantuvo constante a través del modelo, obteniéndose valores de señal menor a los del grupo control, la que principalmente se encontró a nivel de células tubulares (Figura 16).

Al comparar ambos grupos, el grupo protegido presentó valores de tinción menores en comparación a los obtenidos en el grupo control, situación que se mantuvo durante todo el ensayo, estas diferencias se vuelven significativas al día 7 ($P < 0.05$) (Figura 17; Tabla V)

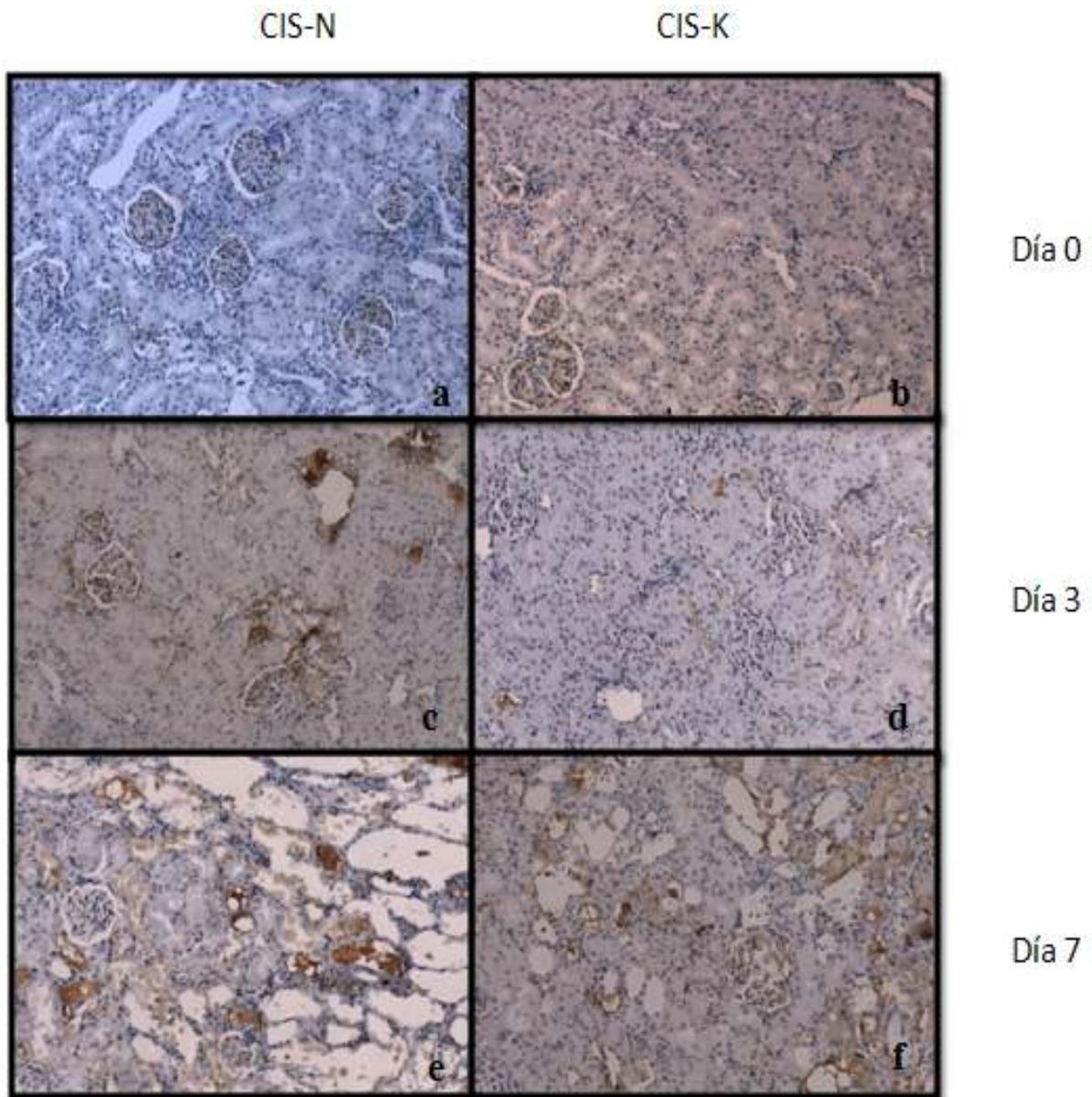


Figura 16. Inmunohistoquímica de Citoqueratina 18. Riñones de ratas del grupo CIS-N a los 0 (a), 3 (c), y 7 (e), días después de la inyección de cisplatino. Riñones de ratas del grupo CIS-K a los 0 (b), 3 (d), y 7 (f), días después de la inyección de cisplatino y previo al tratamiento por 4 semanas con KCl 2%. Magnificación 20x.

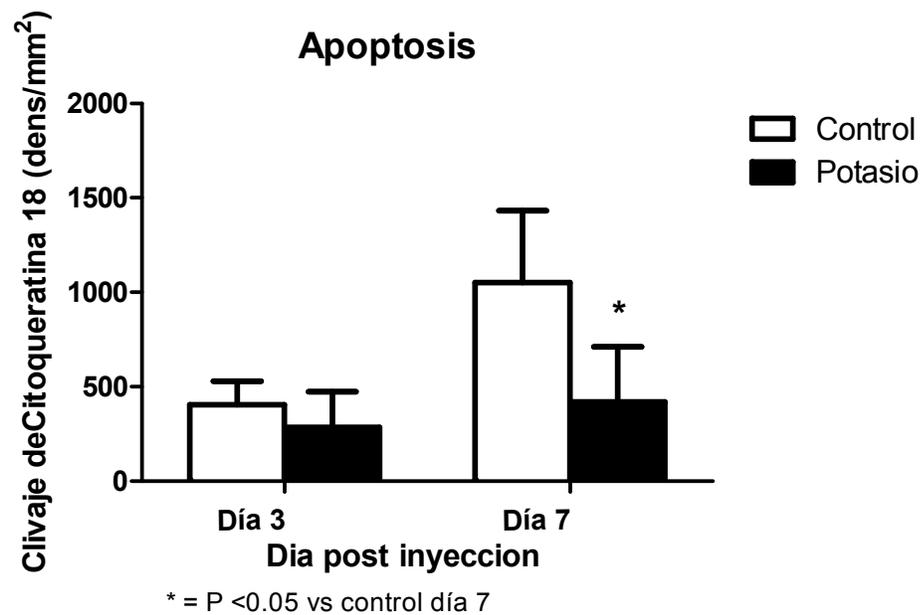


Figura 17. Cuantificación de la proteólisis de Citoqueratina 18. Se detectó de manera indirecta la tasa de apoptosis presente en el tejido renal a mediante inmunohistoquímica, se obtuvo los valores mediante la cuantificación de la señal utilizando el analizador KS 300 imaging system 3.0. Se midió un promedio de 20 segmentos para cada corte. Los resultados fueron expresados en densidad/mm² para luego realizarles un análisis estadístico (Mann-Whitney-U-test.) (n=8)

Tabla V. Cuantificación Inmunohistoquímica de la proteólisis de Citoqueratina 18 (densidad/mm²) en el modelo experimental.

	Día 3	Día 7
CIS-N	404,5 ± 124	1053,3 ± 378,5
CIS-K	286,16 ± 187,7	420,4 ± 291*

*= p < 0,05 (vs CIS-N día 7)

Al analizar los valores de la proteólisis de Citoqueratina 18 entre ambos grupos, se pudo observar que las ratas tratadas con KCl 2% presentaron una menor intensidad de señal tanto al día 3 como al día 7 con respecto al grupo sin protección. Dentro del grupo control, la señal aumentó con el paso de los días obteniéndose un máximo de intensidad al día 7, siendo significativamente mayor que el valor obtenido al día 3 en el mismo grupo. Al comparar ambos grupos entre sí, en ambos días el daño es mayor en el grupo sin protección, haciéndose estadísticamente significativo al día 7.

4.3. Western Blot

4.3.1. Cuantificación de proteínas totales

Los resultados de la cuantificación de proteínas método de Bradford, para los distintos grupos, se muestra en las siguientes tablas (Tabla VI, VII, VIII, IX).

Tabla VI. Cuantificación de extractos proteicos totales de tejido renal de rata por método de Bradford del grupo CIS-K al día 3

Rata	A595	Concentración $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
CIS-K1	0,31	3,3
CIS-K2	0,37	5,7
CIS-K3	0,34	3,75
CIS-K4	0,42	6,3
CIS-K5	0,43	4,65
CIS-K6	0,49	5,25
CIS-K7	0,47	5,1
CIS-K8	0,4	3,35
Promedio	0,4	4,68
D.S	0,062	1,12

Tabla VII. Cuantificación de extractos proteicos totales de tejido renal de rata por método de Bradford del grupo CIS-N al día 3

Rata	A595	Concentración $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
CIS-N1d3	0,29	3,15
CIS-N2d3	0,28	3
CIS-N3d3	0,45	4,95
CIS-N4d3	0,44	4,8
CIS-N5d3	0,4	4,35
CIS-N6d3	0,51	5,55
CIS-N7d3	0,27	3
CIS-N8d3	0,57	6,3
CIS-N9d3	0,21	2,25
Promedio	0,38	4,15
D.S	0,12	1,29

Tabla VIII. Cuantificación de extractos proteicos totales de tejido renal de rata por método de Bradford del grupo CIS-K al día 7

Rata	A595	Concentración $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
CIS-K1	0,78	13,35
CIS-K2	0,36	6,15
CIS-K3	0,57	9,75
CIS-K4	0,61	10,5
CIS-K5	0,2	3,6
CIS-K6	0,2	3,6
CIS-K7	0,2	3,6
Promedio	0,42	7,22
D.S	0,24	3,98

Tabla IX. Cuantificación de extractos proteicos totales de tejido renal de rata por método de Bradford del grupo CIS-N al día 7

Rata	A595	Concentración $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
CIS-N1	0,33	5,7
CIS-N3	0,5	8,5
CIS-N4	0,49	8,4
CIS-N6	0,42	7,2
CIS-N7	0,51	8,7
CIS-N8	0,21	3,6
Promedio	0,41	7,02
D.S	0,12	2,03

4.3.2. Evaluación y Análisis de blots

Como se aprecia en la figura 18 para cada uno de los grupos tratados se detectó, mediante Western blot, las proteínas Caspasa 9 tanto en su forma inactiva como en su forma activada, y Gliceraldehido 3-Fosfato Deshidrogenasa (GAPDH) en extractos de proteínas totales de tejido renal.

Es posible distinguir notoriamente los distintos estados en los que se encuentra Caspasa 9, ya sea en su forma inactiva como activa, mediante las diferencias en su peso molecular (51 y 39 kDa respectivamente). También es posible observar la diferencia existente en los niveles de expresión de Caspasa 9 entre los distintos grupos que fueron tratados con cisplatino con respecto al control sano (Figura 19; Tabla X)

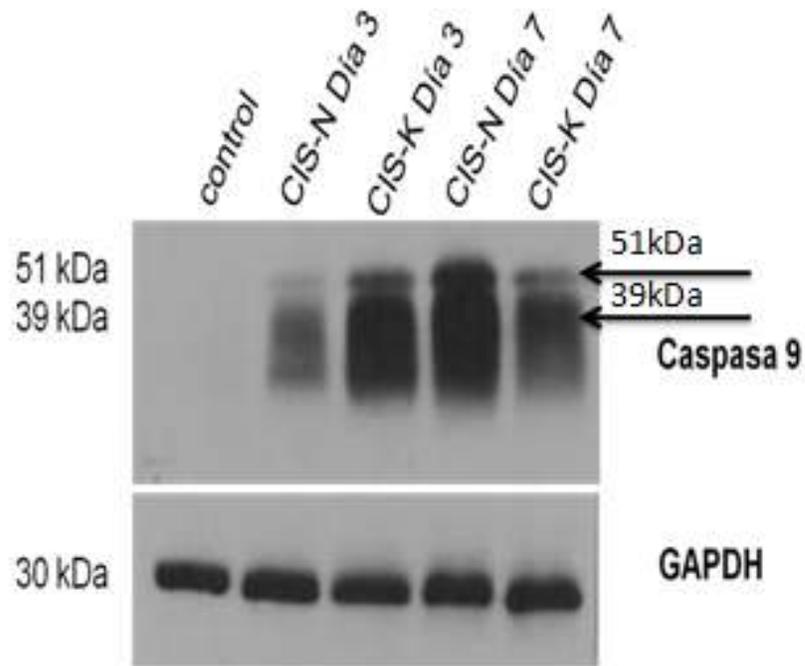


Figura 18. Detección Inmunoquímica de Caspasa 9 y GAPDH para cada una de las condiciones estudiadas. Se analizaron mediante Western- Blot los niveles de proteínas de Caspasa 9 en su forma inactiva (51kDa) y activa (39kDa), también se observa los niveles de expresión de su control endógeno GAPDH. Cada carril contiene 50 μ g de extracto de proteínas totales de riñón. **Control** Muestra de individuo sano

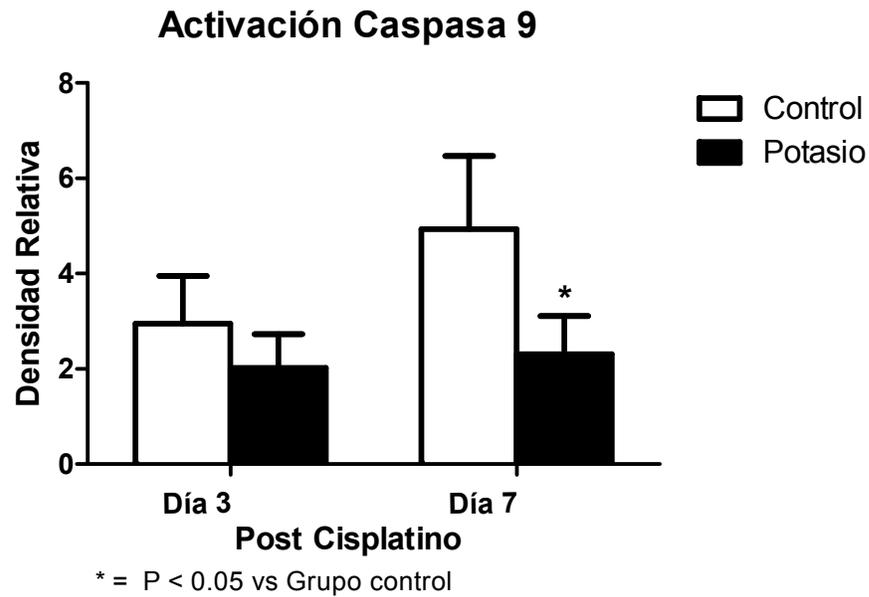


Figura 19. Cuantificación de la activación de Caspasa 9. Se observan los valores de la activación de Caspasa 9 obtenidos mediante el analizador de imágenes ImageJ. Cada banda fue delimitada y cuantificada de forma individual, de los valores resultantes se obtuvo la razón entre la Caspasa 9 inactiva y activa, valor que luego fue dividido por el valor de GAPDH, obteniendo así la densidad relativa. Finalmente este valor fue analizado estadísticamente mediante el test de Mann-Whitney-U-test. La activación al día 0 fue mínima por lo que los valores fueron omitidos. (n=4)

Tabla X. Cuantificación de la activación de Caspasa 9 detectada mediante Western Blot

	Día 3	Día 7
CIS-N	2,951 ± 0,998	4,928 ± 1,540
CIS-K	2,023 ± 0,709	2,308 ± 0,799*

*= p < 0,05 (vs control al día 7)

El grupo control presentó un aumento considerable en la activación de Caspasa 9 durante el transcurso del modelo, en tanto que el grupo protegido fue capaz de mantener constante la activación de la enzima durante el transcurso del ensayo. Mediante una comparación entre ambos grupos, se pudo establecer que las ratas que fueron protegidas mediante una dieta rica en potasio, presentaron una menor activación de la enzima tanto al día 3 como al día 7 con respecto al grupo sin protección. Esta diferencia se torna estadísticamente significativa al día 7 post inyección.

4.4. RT-PCR Semicuantitativo

4.4.1. Cuantificación de RNA total

Los resultados de la cuantificación de RNA obtenidos mediante espectrofotometría (extraído con reactivo de TRIZOL), para los distintos grupos, se muestra en las siguientes tablas (Tabla XI, XII, XIII, XIV). Las razones de absorbancia 260/280 nm (rango óptimo 1,8-2,0; indica la pureza del RNA) y las concentraciones en μg de RNA/ μl .

Tabla XI. Razón A260/280 y concentración de las muestras de RNA del grupo CIS-Kd3

Rata	A260/280	Concentración
CIS-K1	1,73	3,52
CIS-K2	1,67	4,14
CIS-K3	1,77	4,54
CIS-K4	1,82	5,33
CIS-K5	1,73	1,47
CIS-K6	1,74	7,76
CIS-K7	1,74	3,28
CIS-K8	1,71	7,11
Promedio	1,74	4,64
D.S.	0,044	2,06

Tabla XII. Razón A260/280 y concentración de las muestras de RNA del grupo CIS-Nd3

Rata	A260/280	Concentración
CIS-N1	1,7	2,28
CIS-N2	1,72	4,85
CIS-N3	1,62	2,57
CIS-N4	1,67	3,33
CIS-N5	1,73	3,16
CIS-N6	1,7	3,77
CIS-N7	1,78	2,98
CIS-N8	1,67	3,72
CIS-N9	1,73	4,07
Promedio	1,7	3,41
D.S.	0,046	0,788

Tabla XIII. Razón A260/280 y concentración de las muestras de RNA del grupo CIS-Kd7

Rata	A260/280	Concentración
CIS-K1	1,69	2,21
CIS-K2	1,69	1,76
CIS-K3	1,79	1,11
CIS-K4	1,63	3,59
CIS-K5	1,71	1,95
CIS-K6	1,69	3,32
CIS-K7	1,71	4,58
Promedio	1,7	2,65
D.S.	0,047	1,22

Tabla XIV. Razón A260/280 y concentración de las muestras de RNA del grupo CIS-Nd7

Rata	A260/280	Concentración
CIS-N1	1,78	1,39
CIS-N3	1,7	4
CIS-N4	1,7	1,6
CIS-N6	1,69	1,52
CIS-N7	1,75	3,84
CIS-N8	1,73	3,19
Promedio	1,73	2,59
D.S.	0,035	1,22

4.4.2. Análisis de expresión de KIM-1 mediante RT-PCR

A fin de estudiar las diferencias en los niveles de expresión de mRNA de KIM-1 entre los distintos grupos, se realizó una amplificación de éste mediante la técnica de RT-PCR, a partir del RNA extraído de cada grupo.

En la figura 20 se muestra el resultado de este análisis. Se observa que en el control sano sin tratamiento se presentó la menor expresión de KIM-1 en comparación a los grupos tratados con cisplatino. Para el caso de las muestras de ratas inyectadas con cisplatino, no se observa un patrón claro de expresión de mRNA de KIM-1, sin embargo, es evidente el aumento de ésta en comparación a la observada en el control sano.

Los niveles de expresión de KIM-1 fueron cuantificados y corregidos en función de la expresión génica de GAPDH, de esta manera los resultados fueron expresados como valores de Densidad Relativa para cada uno de los grupos (Figura 21; Tabla XV).

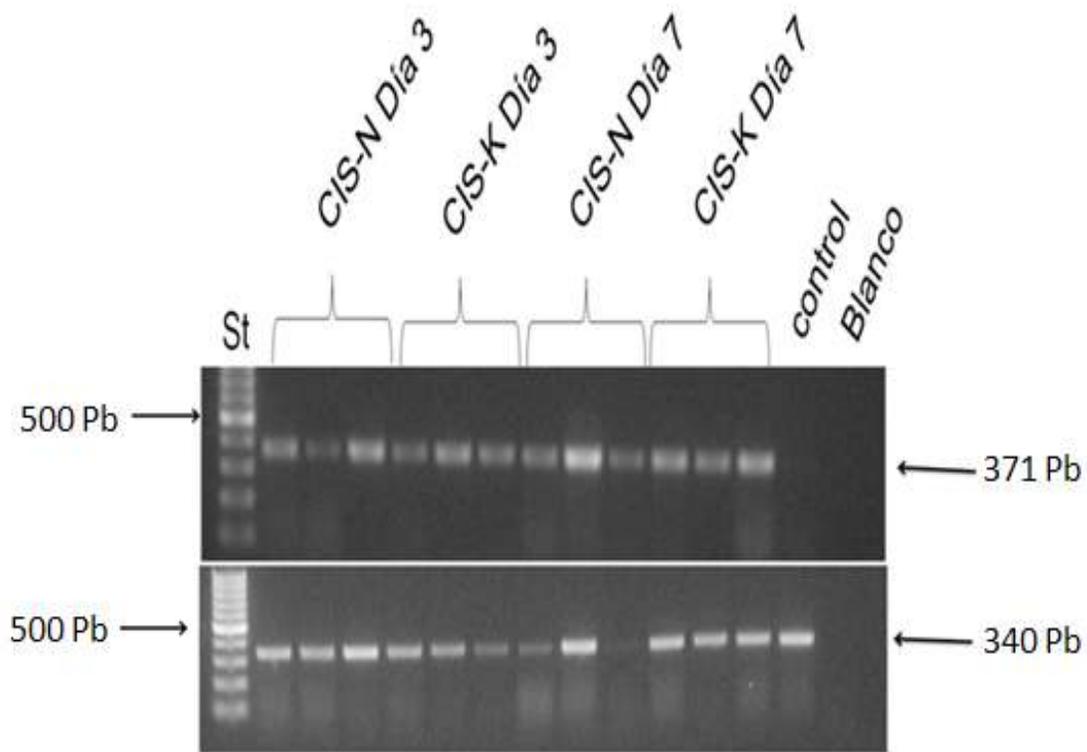


Figura 20. Análisis electroforético de transcritos amplificados por RT-PCR. Imagen digital monocromática de geles de agarosa al 1,2% preteñidos con bromuro de etidio. Para cada grupo analizado se realizó tres amplificaciones de muestras distintas. En la imagen superior se observa la amplificación de KIM-1, obteniéndose una banda del tamaño esperado de 371 pb. En la imagen inferior se observa la amplificación de GAPDH, las bandas se encuentran a una altura de 340 pb según lo esperado. **St** estándar de Peso Molecular. **Control** Muestra de individuo sano. **Blanco** Mix de reacción sin cDNA

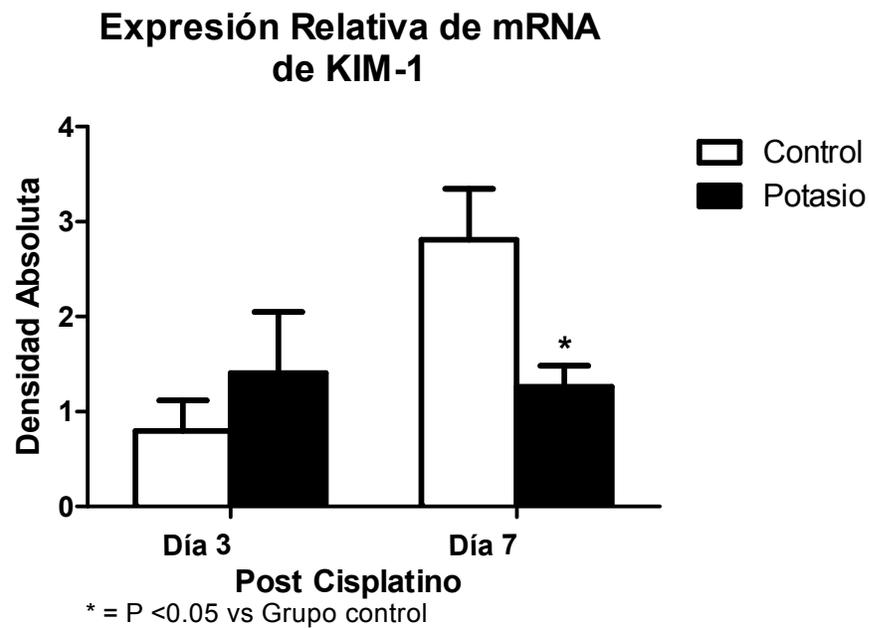


Figura 21. Cuantificación de la expresión de KIM-1. Se obtuvo los valores de la expresión de KIM-1 mediante el analizador de imágenes ImageJ. Los valores fueron obtenidos como densidad absoluta, luego de esto se les realizó un análisis estadístico (Mann-Whitney-U-test). La expresión de KIM-1 al día 0 fue mínima por lo que los valores fueron despreciados (n=3).

Tabla XV. Cuantificación de la expresión de KIM-1 detectada mediante RT-PCR

	Día 3	Día 7
CIS-N	0,795 ± 0,323	2,807 ± 0,539
CIS-K	1,405 ± 0,643	1,261 ± 0,219*

*= p < 0,05 (vs CIS-N día 7)

Dentro del grupo control, la cuantificación de KIM-1 mostró un incremento significativo en su expresión génica con el paso de los días. En cambio el grupo protegido no presentó este incremento, manteniendo sus niveles de expresión constantes durante el transcurso del ensayo. Al comparar ambos grupos, el grupo previamente estimulado presentó una reducción en la expresión de KIM-1 durante el transcurso del modelo experimental, tornándose menor en relación al grupo control, siendo esta diferencia significativa al día 7.

5. DISCUSIÓN.

Los resultados obtenidos respaldan un rol protector de la estimulación del SCC en el daño renal agudo inducido por cisplatino, a través de una modulación del fenómeno de apoptosis.

5.1. Demostrar la estimulación del SCC mediante una dieta rica en potasio, a través de la detección de calicreína tisular.

Se analizaron dos grupos de ratas: el grupo control (CIS-N), ratas tratadas sólo con cisplatino, y el grupo protegido (CIS-K), a quienes se les dio una dieta de 28 días de KCl 2% para estimular al SCC previo a la inyección de cisplatino y así poder evaluar el posible rol protector de este sistema multienzimático sobre la nefrotoxicidad por cisplatino.

La capacidad de una dieta rica en potasio de estimular el sistema calicreína cininas fue evidenciado por un significativo aumento en la expresión de la enzima calicreína, detectada mediante inmunohistoquímica, presentando niveles basales previo a la inyección de cisplatino y que se mantiene significativamente elevada por sobre los valores del grupo que no recibió potasio durante todo el experimento, tal como señalan otros investigadores (Ardiles y col., 2006).

La disminución de calicreína tisular puede ser consecuencia del daño renal agudo evidenciado en ambos grupos de ratas, ya que el tratamiento con cisplatino, además de afectar el tubulo proximal, puede provocar daño a nivel del tubulo distal y colector (Orfila y Col. 1993), estructuras tubulares productoras de calicreína (Bhoola y col. 1992). Orfila y col. (1993) estudiaron el efecto del cisplatino (4 mg/kg i.p.) sobre la inmunolocalización renal de calicreína, observando que la concentración de la enzima disminuía y además cambiaba de localización a lo largo del experimento. En ese trabajo, previo a la inyección de cisplatino, la calicreína pudo ser detectada sólo en células del túbulo conector en tanto que después a los días 1 y 3, además de

presentarse en el túbulo colector se vio también en el túbulo proximal y glomérulos; en animales al día 6 y 10 post inyección se observó una intensa expresión en células descamativas en el lumen del túbulo distal para decaer al día 21. En nuestros análisis, existen diferencias con respecto al anterior, observando la inmunotinción en células del tubulo conector y no en glomérulos, tampoco se observó expresión de la enzima en células descamativas, lo cual podría obedecer a una mayor intensidad en el daño renal por la mayor dosis de cisplatino administrada.

5.2. Evaluación de parámetros fisiológicos e histopatológicos involucrados en el modelo de cisplatino y el efecto que produce sobre ellos la estimulación del SCC renal con potasio.

El peso corporal mostró una disminución progresiva a través del modelo en ambos grupos, evidenciando el proceso de enfermedad renal aguda nefrotóxica, sin embargo, esta reducción fue notoriamente menor en el grupo protegido, alcanzando un 8% en contraste al 15% de pérdida observado en el grupo control. Al no observar aumento de peso, se descarta presencia de edema en ambos grupos de animales.

Los valores de diuresis mostraron variaciones con el paso de los días en ambos grupos, sin un patrón claro sugerente.

El nivel de electrolitos urinario alcanzados dentro del grupo CIS-K fue significativamente superior a los obtenidos en el grupo control dentro de los primeros días del ensayo para el caso del K^+ y Cl^- , manifestando la correcta captación de los iones suministrados en la dieta. No fue posible observar diferencias significativas en los niveles de Na^+ obtenidos.

En el caso de la proteinuria, un marcador poco específico pero sensible de daño renal, el grupo control (CIS-N) presentó un aumento en sus valores, en cambio la estimulación del

sistema calicreina cininas se vió acompañada por una reducción, durante todo el periodo de observación, alcanzando valores estadísticamente significativos al día 7 post inyección.

La función excretora renal, determinada mediante la medición de los niveles de creatinina urinaria, mostró una importante conservación dentro del grupo previamente estimulado (CIS-K), al mantener un 75% de la capacidad basal preinyección, en contraste al 40% logrado en el grupo control.

La creatinina sérica sufrió un aumento continuo en el grupo control. Por su parte, en el grupo protegido se observó un patrón de disminución aunque sin llegar a valores estadísticamente significativos, sin embargo, esta tendencia es sugerente de algún grado de protección renal.

El grupo protegido sufrió una recuperación importante de su funcionamiento renal, determinado mediante el clearance de creatinina, en contraste a la pérdida sustancial que se observó dentro del grupo control, situación que refuerza un mejor funcionamiento renal en el grupo previamente estimulado.

El análisis histopatológico revela que la nefrotoxicidad por cisplatino causa lesiones túbulo-intersticiales evidentes. Es así, como en nuestro estudio el daño observado afectó principalmente a los túbulos proximales, aún cuando otros investigadores señalan adicionalmente otras localizaciones de daño como son el túbulo distal y los ductos colectores (Orfila y col., 1993). Nuestro estudio mostró que el daño fue aumentando paulatinamente en ambos grupos, siendo posible observar un incremento en el daño renal mediante la presencia de cilindros hialinos, descamación de células epiteliales y una extensa dilatación tubular. Ambos grupos mostraron un máximo nivel de daño histológico al día 7, sin diferencias significativas entre ambos. Es posible que la magnitud del daño y el corto período de observación no hayan permitido apreciar cambios histológicos significativos en cuanto a protección tisular.

Por otra parte, algunos investigadores han realizado estudios similares bajo distintas condiciones: Matsushima y col. (1998) y Amin y col (2006) utilizaron 5mg/kg i.v. en ratas Sprague Dawley; Chirino y col. (2004) con 7,5mg/kg i.p. en ratas Wistar; y el grupo de Zhou y col. (2006) utilizó 6mg/kg i.v. en ratas Sprague Dawley, obteniendo signos de daño en los primeros días post inyección, señalando extensa dilatación y necrosis tubular, cilindros intratubulares en la porción externa de la médula externa, vacuolización citoplasmática, edema intracelular y formación de complejos proteicos especialmente en la pars recta del tubulo proximal, denotando la importancia de la cepa de las ratas, la dosis y la vía de administración de la inyección única de cisplatino.

Dentro de los parámetros fisiológicos más relevantes para estudiar la función renal como lo son la creatinina urinaria y el clearance de creatinina, ambos presentaron una disminución drástica dentro del grupo control al final del estudio, denotando la reproducibilidad del modelo de injuria renal aguda por cisplatino.

5.3. Evaluación de la tasa de apoptosis y activación de Caspasa 9 implicadas en el modelo de cisplatino y el efecto del SCC sobre su modulación.

Citoqueratina 18 es uno de los principales blancos de las Caspasas, particularmente de la Caspasa 6, la que luego de la lisis expone nuevos epítopes los cuales no se encuentran disponibles en condiciones viables o en el proceso necrótico. (Caulin y col. 1997; Leers y col. 1999). Uno de estos epítopes (M30) ha sido propuesto como un nuevo marcador de apoptosis representando una herramienta única para la determinación fácil y confiable de este proceso (Grassi y col. 2004).

El análisis de apoptosis mediante TUNEL puede dar resultados falsos positivos debido a que bajo ciertas condiciones no apoptóticas, es posible que ocurra la denaturación de DNA de doble

hebra, proceso en el que se fundamenta este método, por su parte la detección del epítotope M30 de la citoqueratina 18 muestra una mayor especificidad al ocurrir únicamente en el proceso de apoptosis (Walker y col. 2001).

Al cuantificar la tasa de apoptosis obtenida por inmunohistoquímica, mediante la medición del clivaje de Citoqueratina 18, se pudo observar que el grupo CIS-N presentó un aumento progresivo significativo durante el transcurso del ensayo. Por su parte, el grupo protegido no presentó este aumento durante el transcurso del experimento, observándose diferencia significativa entre ambos grupos al día 7, indicando una capacidad de protección importante por parte del SCC en la modulación de la tasa de apoptosis.

Park y col. (2002) estudiaron la principal vía por la que cisplatino produce apoptosis en células renales in vitro, observando que la activación de Caspasa 9 aumenta de una manera dosis-dependiente, en contraste a Caspasa 8, sugiriendo así la vía mitocondrial como responsable de la muerte celular por cisplatino.

Nuestro estudio permitió observar que la activación de Caspasa 9 dentro del grupo control, sufrió un incremento durante el transcurso del experimento, alcanzando valores cinco veces superiores por sobre los obtenidos en animales sanos. Esta activación se vio drásticamente disminuida en el grupo CIS-K, el cual mantuvo sus valores constantes durante el transcurso del ensayo, observándose valores de cuantificación en la activación de Caspasa 9 dos veces superior a la observada en animales sanos. Esta diferencia en los niveles de activación de Caspasa 9 entre ambos grupos, sugiere que la vía mitocondrial de la apoptosis puede verse influida como parte de la protección renal inducida por estimulación del SCC.

También fue posible observar que ambos procesos se encuentran gatillados de manera concomitante, lo que respalda la idea de que el proceso apoptótico observado, se encontraría mediado por la vía mitocondrial en este modelo de daño renal agudo.

5.4. Evaluación del daño renal agudo mediante la detección del marcador de daño renal, KIM-1.

Los niveles de mRNA de KIM-1, luego de iniciado el daño renal agudo, se encuentran elevados por sobre otros genes cuantificados en especies como pez zebra, roedores, perros, primates y humanos (Amin y col. 2004; Ichimura y col. 1998). Esta proteína se ubica en células epiteliales del tubulo proximal renal, siendo también posible detectar una fracción de ella en la orina en el caso de roedores y humanos, permitiendo una medición de tipo no invasiva (Ichimura y col. 1998; Chaturvedi y col. 2009).

Al analizar la expresión de KIM-1, el grupo control presentó un aumento constante durante el transcurso del ensayo con un máximo al día 7. Este incremento fue atenuado en el grupo pretratado con potasio, traducido en una menor intensidad de daño renal. Esta diferencia, al día 7, fortalece la idea de renoprotección en el grupo protegido. Por otro lado, respaldando la validez del método utilizado, se pudo observar que en los animales sin daño renal, la expresión de KIM-1 no es posible detectarla.

Similar patrón de expresión fue obtenido por Amin y col. (2006) en riñones expuestos a cisplatino, el cual mediante ensayos de Western-Blot, qRT-PCR e inmunohistoquímica en tejido renal, observó que los animales sin tratamiento poseían una expresión de KIM-1 difícil de detectar y esta aumentaba significativamente desde el día 1 post inyección. Mukherjea y col. (2006) demostraron la inducción que produce cisplatino sobre la expresión de KIM-1 en tejido

renal de rata y también en células HK-2 sugiriendo que su expresión se ve gatillada por la generación de ROS mediante el aumento de NOX3, isoforma de NADPH oxidasa y fuente de generación de ROS el cual al ser inhibido mediante ácido lipoico no gatillo la expresión de KIM-1

Por su parte, Jun Zhang y col. (2008) no observaron expresión de KIM-1 en células epiteliales en ratas sin tratamiento, sin embargo, al inducir un daño renal por gentamicina, su expresión se localizó principalmente en los segmentos S1 y S2 del túbulo proximal, concordante con los segmentos que resultan más afectados por el daño producido por este antibiótico (Spandiarri y col. 2007). Por otra parte, se ha demostrado que el daño por cisplatino se ubica específicamente en la porción S3 del túbulo proximal, tanto en ratas Sprague-Dawley (Spandiarri y col. 2007) como en Wistar (Cristofori y col. 2007); más aún, esta molécula se expresa de manera predominante en modelos de daño renal en el que el segmento S3 es el más afectado (Ichimura y col. 2004; Amin y col. 2006; Vaidya y col. 2006). Este incremento precoz en la expresión de KIM-1 posterior al daño renal, es propuesto como un mecanismo de protección y proliferación celular, lo que puede explicar la mayor expresión en el grupo protegido al día 3. Billy y col. (2002) le confieren un rol fundamental en el proceso de regeneración celular al colocalizar con marcadores de proliferación. Ichimura y col. (1998) han propuesto que la regeneración del epitelio del túbulo proximal requiere una desdiferenciación y posterior proliferación por parte de las células renales que limitan con el área dañada, y que esta transición está mediada por KIM-1. Posteriormente, los mismos autores (2008) demostraron que KIM-1 confiere características fagocitarias a células epiteliales renales, limitando así, la respuesta autoinmune en situaciones de daño renal.

Nuestros resultados apoyan la validez de este biomarcador de daño renal en el modelo de daño agudo por cisplatino y confirman la capacidad protectora del SCC en este modelo, más aún, los

niveles de mRNA de KIM-1 observados, se correlacionan con la tasa de apoptosis cuantificada en los distintos grupos lo que refuerza la postulada renoprotección.

. Los niveles de mRNA de KIM-1, la activación de Caspasa 9 y la tasa de apoptosis, poseen idéntico patrón de desarrollo durante el transcurso del estudio. En etapas tempranas de la injuria renal, no existen diferencias importantes entre ambos grupos, sin embargo, desde el 3er día estas diferencias se tornan significativas. En las tres variables mencionadas, se observó evidencias del potencial rol renoprotector de la estimulación del SCC, evidenciado por una mejor capacidad de respuesta frente al agente nefrotóxico.

Estos resultados sugieren fuertemente una capacidad protectora importante por parte del SCC, al ser capaz de reducir la expresión de un marcador de daño renal en relación con la administración de una droga nefrotóxica. Esta protección posee una importante proyección a futuro ya que sienta las bases para explorar medidas destinadas a estimular o preservar el SCC como una medida de renoprotección de insuficiencia renal aguda adquirida en circunstancias de uso de esta droga nefrotóxica utilizada habitualmente en quimioterapia.

6. CONCLUSIONES.

- Se logró la estimulación del SCC por una dieta rica en potasio, lo cual se evidenció por el aumento en los niveles de calicreína tisular en las ratas pretratadas con potasio, en comparación al grupo sin tratamiento, lo que se mantuvo después del insulto nefrotóxico inducido por cisplatino.
- Mediante el análisis de los parámetros fisiológicos, histológicos, y niveles de KIM-1 es posible confirmar el modelo de daño renal agudo, mediante inyección única de cisplatino.
- El SCC es capaz de disminuir el daño renal agudo producido por cisplatino, lo cual se observa mediante la tendencia a la normalización de los parámetros fisiológicos y la disminución significativa de la expresión de mRNA de KIM-1.
- La estimulación del SCC reduce significativamente la expresión de Caspasa 9 en el modelo de cisplatino lo que podría tener un efecto importante en la modulación de la apoptosis, sin embargo se necesita un mayor número de estudios para su confirmación.
- Tanto la activación de Caspasa 9, como la tasa de apoptosis medida mediante inmunohistoquímica, muestran un patrón temporal similar, aumentando durante el desarrollo del modelo y siendo mayor en el grupo sin protección, lo que sugiere a la vía mitocondrial como mediadora de apoptosis en el daño renal agudo por cisplatino.
- La estimulación del SCC con una dieta rica en potasio fue capaz de reducir la expresión de KIM-1, un marcador eficiente de daño renal agudo, la activación de Caspasa 9 y la tasa de apoptosis, pudiendo por lo tanto, ser una alternativa de renoprotección en la nefrotoxicidad inducida por cisplatino.

- No se demostraron evidencias de proteccion histológica, probablemente por la gran magnitud del daño y el corto periodo de observacion.

7. LITERATURA CITADA.

Amin RP, Vickers AE, Sistare F, Thompson KL, Roman RJ, Lawton M, Kramer J, Hamadeh HK, Collins J, Grissom S, Bennett L, Tucker CJ, Wild S, Kind C, Oreffo V, Davis JW II, Curtiss S, Naciff JM, Cunningham M, Tennant R, Stevens J, Car B, Bertram TA, Afshart CA. (2004). Identification of putative gene based markers of renal toxicity. *Environ Health Perspect.*, 112, 465–479

Arnoult D, Gaume B, Karbowski M, Sharpe JC, Cecconi F, Youle RJ. (2003). Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *EMBO J.*, 22, 4385–4399

Arany I, Safirstein RL. (2003). Cisplatin nephrotoxicity. *Semin Nephrol.*, 23, 460–464.

Ardiles, L. G., F. Loyola, P. Ehrenfeld, M. E. Burgos, C. A. Flores, G. Valderrama, I. Caorsi, J. Egidio, S. A. Mezzano, and C. D. Figueroa. (2006). Modulation of renal kallikrein by a high potassium diet in rats with intense proteinuria. *Kidney Int.*, 69, 53-59.

Ashkenazi A and Dixit VM. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281, 1305–1308.

Bailly, V., Zhang, Z., Meier, W., Cate, R., Sanicola, M., and Bonventre, J. V. (2002). Shedding of kidney injury molecule-1, a putative adhesion protein involved in renal regeneration. *J. Biol. Chem.*, 277, 39739–39748.

Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. (1992) Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev.*, 44, 1–80.

Bledsoe, G., S. Crickman, J. Mao, C. Xia, H. Murakami, L. Chao, and J. Chao. (2006). Kallikrein/kinin protects against gentamicin-induced nephrotoxicity by inhibition of inflammation and apoptosis. *Nephrol Dial Transplant*, 21, 624-633.

Boatright, K. M., and G. S. Salvesen. (2003). Mechanisms of caspase activation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 15, 725–731.

Bonventre JV, Brezis M, Siegel N, Rosen S, Portilla D, and Venkatachalam M. (1998). Acute renal failure. I. Relative importance of proximal vs distal tubular injury. *Am J Physiol Renal Physiol.*, 275, 623–632.

Bonventre JV. (1993). Mechanisms of ischemic acute renal failure. *Kidney Int.*, 43,1160–1178.

Buja LM, Eigenbrodt ML, and Eigenbrodt EH. (1993). Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death. *Arch Pathol Lab Med.*, 117, 1208–1214.

Caulin C, Salvesen SG, Oshima RG. (1997) Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *J Cell Biol.*138:1379-1394.

Chaturvedi S, Farmer T, Kapke GF. (2009). Assay validation for KIM-1: human urinary renal dysfunction biomarker. *Int J Biol Sci.*, 5, 128–134

Chu G. (1994) Cellular responses to cisplatin. *J. Biol. Chem.*, 269, 787-790

Cohen JJ, Duke RC, Fado VA, Sellins KS. (1992). Apoptosis and programmed death in immunity. *Ann Rev Immunol.*, 10, 267-293

Cristofori P, Zanetti E, Fregona D, Piaia A, Trevisan A. (2007) Renal proximal tubule segment-specific nephrotoxicity: an overview on biomarkers and histopathology. *Toxicol Pathol.*, 35, 270–275.

Cummings, BS, and Schnellmann, RG. (2002). Cisplatin-Induced renal cell apoptosis: Caspase 3-dependent and –independent pathways. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 302, 8–17.

Du, C., M. Fang, Y. Li, L. Li, and X. Wang. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 102, 33–42.

Eastman, A. (1999). The mechanism of action of cisplatin: From adducts to apoptosis. In: Lippert, B., (ed) *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*: 111-135 Wiley-VCH; New York.

Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, and Nagata S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, 391, 43–50,

Espandiari P, Zhang J, Rosenzweig BA, Vaidya VS, Sun J, Schnackenberg L, Herman EH, Knapton A, Bonventre JV, Beger RD, Thompson KL, Hanig J. (2007). The utility of a rodent model in detecting pediatric drug-induced nephrotoxicity. *Toxicol Sci.*, 99, 637–48.

- Fado VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of Apoptotic lymphocytes trigger specific recognition and removal by Macrophages. *J Immunol.*, 148, 2207-2216.
- Fan TJ, Xia L, Han YR. (2001). Mitochondrion and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin.*, 33, 7-12.
- Fuad S, Shihab, Takeshi F. Andoh, Amie M. Tanner, Hong Yi, and William M. Bennet (1999). Expression of apoptosis regulatory genes in chronic cyclosporine nephrotoxicity favors apoptosis. *Kidney International*, 56, 2147-2159.
- Fu YF, Fan TJ. (2002). Bcl-2 family proteins and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin.*, 34, 389-394.
- Gately DP, Howell SB. (1993). Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. *Br J Cancer*, 67, 1171-1176.
- Grassi A, Susca M, Ferri S, Gabusi E, D'Errico A, Farina G, Maccariello S, Zauli D, Bianchi FB, Ballardini G. (2004) Detection of the M30 neopeptide as a new tool to quantify liver apoptosis: timing and patterns of positivity on frozen and paraffin-embedded sections. *Am J Clin Pathol.* 121: 211-219
- Green DR, Kroemer G. (2005). Pharmacological manipulation of cell death: Clinical applications in sight? *J. Clin. Invest.*, 115, 2610-2617.

Han Z, Hendrickson EA, Bremner TA, and Wyche JH. (1997). A sequential two-step mechanism for the production of the mature p17:p12 form of caspase-3 in vitro. *J Biol Chem.*, 272, 13432–13436.

Ichimura T, Bonventre JV, Bailly V, Hession CA, Cate RL, Sanicola M. (1998). Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *J Biol Chem.*, 273, 4135–4142.

Ichimura T, Hung CC, Yang SA, Stevens JL, Bonventre JV. (2004). Kidney injury molecule-1: a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury. *Am J Physiol.*, 286, 552–563.

Ichimura, T., Asseldonk, E. J., Humphreys, B. D., Gunaratnam, L., Duffield, J. S. and Bonventre, J. V. (2008). Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells. *J Clin Invest.*, 118, 1657-1668.

Innis, M.A., and Gelfand, D.H., Optimization of PCRs, in *PCR protocols, A Guide to Methods and Applications*. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., and White, T.J., Ed., CRC Press, London, 1994, 5-11.

Ishida S, Lee J, Thiele DJ, Herskowitz I. (2002). Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 14298–14302.

- Jin L, Chao L, Chao J. (1999). Potassium supplement upregulates the expression of renal kallikrein and bradykinin B2 receptor in SHR. *Am J Physiol.*, 276, 476–484
- Jiang X, Wang X. (2000). Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to apaf-1. *J Biol Chem.*, 275, 31199–31203
- Joza N, Kroemer G, and Penninger JM. (2002). Genetic analysis of the mammalian cell death machinery. *Trends Genet.*, 18, 142–149.
- Jurgensmeier, J. M., Z. Xie, Q. Deveraux, L. Ellerby, D. Bredesen, and J. C. Reed. (1998). Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 95, 4997–5002.
- Kaufmann SH and Hengartner MO. (2001). Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol.*, 11, 526–534.
- Kidd VJ. (1998). Proteolytic activities mediate apoptosis. *Annu Rev Physiol.*, 60, 533-73.
- Kothakota, S., T. Azuma, C. Reinhard, A. Klippel, J. Tang, K. Chu, T. J. McGarry, M. W. Kirschner, K. Kohts, D. J. Kwiatkowski, and L. T. Williams. (1997). Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science.* 278, 294–298.
- Kuo YM, Gybina AA, Pyatskowitz JW. (2006). Copper transport protein (Ctr 1) levels in mice are tissue specific and dependent on copper status. *J. Nutr.*, 136, 21-26
- Launay S, Hermine O, Fontenay M, Kroemer G, Solary E, Garrido C. (2005). Vital functions for lethal caspases. *Oncogene.* 24, 5137–5148.

Leers MP, Kölgen W, Björklund V, Bergman T, Tribbick G, Persson B, Björklund P, Ramaekers FC, Björklund B, Nap M, Jörnvall H, Schutte B. (1999) Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *J Pathol.*, 187:567-572.

Leibbrandt MEI, Wolfgang GHI, Metz AL, Ozobia AA, Haskins JR. (1995). Critical subcellular targets of cisplatin and related platinum analogs in rat renal proximal tubule cells. *Kidney Int.*, 48, 761–770

Liu H, Baliga R. (2005). Endoplasmic reticulum stress-associated caspase 12 mediates cisplatin-induced LLC-PK1 cell apoptosis. *J Am Soc Nephrol.*, 16, 1985–1992.

Lockshin, R. A., and Z. Zakeri. (2004). Apoptosis, autophagy, and more. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 36, 2405–2419.

Lodish Harvey, Berk Arnold, Zipursky S. Lawrence, Matsudaira Paul, Baltimore David, and Darnell James. (2005). *Molecular Cell Biology*. Quinta edición; editorial Médica Panamericana. Pág 18.

Lü CX, Fan TJ, Hu GB, Cong RS. (2003). Apoptosis-inducing factor and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin.*, 35, 881–885

Manchang Liu, Chu-Chun Chien, Melissa Burne-Taney, Roshni R. Molls, Lorraine C. Racusen, Robert B. Colvin, and Hamid Rabb. (2006). A Pathophysiologic Role for T Lymphocytes in Murine Acute Cisplatin Nephrotoxicity. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 17, 765-774.

Marek Los, Sebastian Wesselborg, and Klaus Schulze-Osthoff. (1999). The role of caspasas in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice. *Immunity*, 10, 629–639

Marie H. Hanigan and Prasad Desvarajan. (2003). Cisplatin Nephrotoxicity: Molecular Mechanisms. *Cancer Ther.*, 1, 47-61.

Mathie P. G. Leers, Wendy Kölgen, Viveka Björklund, Tomas Bergman, Gordon Tribbick, Bengt Persson, Peter Björklund, Frans C. S. Ramaekers, Bertil Björklund, Marius Nap, Hans Jörnvall and Bert Schutte. (1999). Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *J. Pathol.*, 187, 567–572

Matsuzawa, A. and Ichijo, H. (2001). Molecular mechanisms of the decision between life and death: regulation of apoptosis by apoptosis signal-regulating kinase 1. *Biochem. J.*, 130, 1-8.

Moon Soo Park, Maryely De Leon, and Prasad Devarajan. (2002). Cisplatin Induces Apoptosis in LLC-PK1 Cells via activation of Mitochondrial Pathways. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 13, 858-865

Mukherjea D, Whitworth CA, Nandish S, Dunaway GA, Rybak LP and Ramkumar V. (2006). Expression of the kidney injury molecule 1 in the rat cochlea and induction by cisplatin. *Neuroscience*, 139, 733-740.

Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS, and Dixit VM. (1998). An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem.*, 273, 2926–2930.

Pabla N and Z Dong. (2008). Cisplatin Nephrotoxicity: Mechanism and renoprotective strategies. *Kidney International*, 73, 994-1007.

- Park MS, De Leon M, Devarajan P. (2002). Cisplatin induces apoptosis in LLC-PK1 cells via activation of mitochondrial pathways. *J Am Soc Nephrol.*, 13, 858–865
- Pittman SM, Geyp M, Tiñan SJ, Gramacho CM, Strickland DH, Fraser MJ. (1993). Tubulin in apoptotic cell. In: Lavin M, Watters D. (ed) Programed cell death: the cellular and molecular biology of Apoptosis: 315-323. Harwood Academic Publishers, Zwitzerland.
- Q wei, G Dong, J Franklin and Z Dong. (2007). The pathological role of bax in cisplatin nephrotoxicity. *Kidney international*, 72, 53-62
- Rao L, Perez D, and White E. (1996). Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol.*, 135, 1441–1455.
- Razzaque MS, Koji T, Kumatori A, Taquchi T. (1999). Cisplatin-induced apoptosis in human proximal tubular epithelial cells is associated with the activation of the Fas/Fas ligand system. *Histochem Cell Biol.*, 111, 359–365.
- Riad, A., J. L. Zhuo, H. P. Schultheissa, and C. Tschope. (2007). The role of the renal kallikrein–kinin system in diabetic nephropathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens.*, 16, 22-26.
- Rotonda J, Nicholson DW, Fazil KM, Gallant M, Gareau Y, Labelle M, Peterson EP, Rasper DM, Ruel R, Vaillancourt JP, Thornberry NA & Becker JW (1996). The three-dimensional structure of popain/ CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nature Structural Biology*, 3, 619-625.
- Rudel, T., and G. M. Bokoch. (1997). Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science*, 276, 1571–1574.

Somersan S and Bhardwaj N. (2001). Tethering and tickling: a new role for the phosphatidylserine receptor. *J Cell Biol.*, 155, 501–504.

Stroh, C., and K. Schulze-Osthoff. (1998). Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates. *Cell Death Differ.*, 5, 997–1000.

Susin, SA., H. K. Lorenzo, N. Zamzami, I. Marzo, C. Brenner, N. Larochette, M. C. Prevost, P. M. Alzari, and G. Kroemer. (1999). Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J. Exp. Med.*, 189, 381–394.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, and Kroemer G. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 397, 441–446.

Tan, Y.J., Lim, S.G. and Hong, W. (2007). Regulation of cell death during infection by the severe acute respiratory syndrome coronavirus and other coronaviruses. *Cell Microbiol.*, 9, 2552-2561.

Thadhani, R, Pascual, M., and Bonventre, JV. (1996). Acute Renal Failure. *N.Engl. J. Med.*, 334, 1448-1460.

Thompsons CB. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267, 1456-1462

Ueda N, Kaushal GP, Shah SV. (2000). Apoptotic mechanisms in acute renal failure. *Am J Med.*, 108, 403–415

Vaidya VS, Ramirez V, Ichimura T, Bobadilla NA, Bonventre JV. (2006). Urinary kidney injury molecule-1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury. *Am J Physiol Renal Physiol.*, 290, 517–529

Vio CP, Figueroa CD. (1987). Evidence for a stimulatory effect of high potassium diet on renal kallikrein. *Kidney Int.*, 31, 1327–1334.

Vishal S. Vaidya¹, Josef S. Ozer, Dieterle Frank, Fitz B. Collings, Victoria Ramirez, Sean Troth, Nagaraja Muniappa, Douglas Thudium, David Gerhold, Daniel J. Holder, Norma A. Bobadilla, Estelle Marrer, Elias Perentes, André Cordier, Jacky Vonderscher, Gérard Maurer, Peter L. Goering, Frank D. Sistare, and Joseph V. Bonventre (2010) Kidney Injury Molecule-1 Outperforms Traditional Biomarkers of Kidney Injury in Multi-site Preclinical Biomarker Qualification Studies. *Nat Biotechnol.* 28(5): 478–485

Walker JA and Quirke P. (2001) Viewing apoptosis through a “TUNEL”. *J Pathol.* 95: 275-276.

Walker NP, Talanian RV, Brady KD, Dang LC, Bump NJ, Ferez CR, Franklin S, Ghayur T, Hackett MC, Hammill LD, Herzog L, Hugunin M, Houy W, Mankovich JA, McGuinness L, Orlewicz E, Paskind M, Pratt CA, Reis P, Summani A, Terranova M, Welch JP, Xiong L, Möller A, Tracey DE, Kamen R & Wong WW (1994). Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell*, 78, 343-352.

Wang ZB, Liu YQ, Cui YF. (2005). Pathways to caspase activation. *Cell Biol Int.*, 29, 489–496.

Webster, S.J., Daigneault, M., Bewley, M.A., Preston, J.A., Marriott, H.M., Walmsley, S.R., Read, R.C., Whyte, M.K. and Dockrell, D.H. (2010). Distinct cell death programs in monocytes

regulate innate responses following challenge with common causes of invasive bacterial disease.

J Immunol., 185, 2968-2979.

Wei, Q., Dong, G., Franklin, J., and Dong, Z. (2007). The pathological role of Bax in cisplatin nephrotoxicity. *Kidney Int.*, 72, 53–62

Wen, L. P., J. A. Fahrni, S. Troie, J. L. Guan, K. Orth, and G. D. Rosen. (1997). Cleavage of focal adhesion kinase by caspases during apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 272, 26056–26061.

Wilfred Lieberthal, Veronica Triaca, and Jerrold Levine. (1996). Mechanism of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. necrosis. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol.*, 270, 700–708.

Wilson KP, Black J-AF, Thomson JA, Kim EE, Griffith JP, Navia MA, Murcko MA, Chambers SP, Aldape RA, Raybuck SA and Livingston DJ (1994). Structure and mechanism of interleukin-1b converting enzyme. *Nature*, 370, 270-275

Yonezawa A, Masuda S, Nishihara K, Yano I, Katsura T, Inui K. (2005). Association between tubular toxicity of cisplatin and expression of organic cation transporter rOCT2 (Slc22a2) in the rat. *Biochem Pharmacol.*, 70, 1823–1831.

Yang D. Z. and Wang A. H. J. (1997) Structural studies of interactions between anticancer platinum drugs and DNA. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 66, 81–111.

Yuan CQ, Ding ZH. (2002). Structure and function of caspases. *Guowai Yixue Fenzi Shengwuxue Fence*, 24, 146–151